

# **Abschlussbericht zur Forschungsförderung der Deutschen Wirbelsäulenstiftung zum Bewilligungsbescheid vom 19.12.2016**

## **Antragsteller:**

### **Dr. Cornelia Neidlinger-Wilke**

Wissenschaftliche Angestellte  
Institut für Unfallchirurgische Forschung und Biomechanik  
Zentrum für Traumaforschung Ulm (ZTF)  
Universitätsklinikum Ulm  
Helmholtzstraße 14  
D-89081 Ulm  
Tel: +49 (0)731-500-55319  
Fax: +49 (0)731-500-55302  
E-Mail: cornelia.neidlinger-wilke@uni-ulm.de

Nebenantragstellerin

### **Dr. Taryn Saggese**

Gast-Wissenschaftlerin  
Institut für Unfallchirurgische Forschung und Biomechanik  
Zentrum für Traumaforschung Ulm (ZTF)  
Universitätsklinikum Ulm  
Helmholtzstraße 14  
D-89081 Ulm  
Tel: +49 (0)731-500-55330  
Fax: +49 (0)731-500-55302  
E-Mail: tsaggese@gmail.com

## **Projektname:**

**Untersuchungen zum Pathomechanismus des Bandscheibenvorfalls durch Simulation von Entzündungsbedingungen und mechanischer Belastung im Zell- und Organkulturmodell des Anulus fibrosus**

**Projekt-Code Verwaltung: Verwendungszweck 38 120: D.5527**

**Datum Zuwendungsbescheid:** 19.12.2016

## **Einleitung:**

Der Pathomechanismus, der bei einem Bandscheibenvorfall zur Schwächung des Anulus fibrosus (AF) führt, ist noch weitgehend unbekannt. Unsere Studie befasste sich mit dem Einfluss degenerativer Stressfaktoren, die möglicherweise zu einer Beeinträchtigung des elastischen Fasernetzwerks des AF führen und damit zur Schwächung des Bandscheibengewebes beitragen könnten. Die Rolle dieses translamellären Fasernetzwerks (trans-lamellar bridging network, TLBN), das die Anuluslamellen verbindet und dem AF Elastizität und Dehnungswiderstand verleiht ist noch weitgehend unbekannt. Da in degenerierten Bandscheiben mechanische

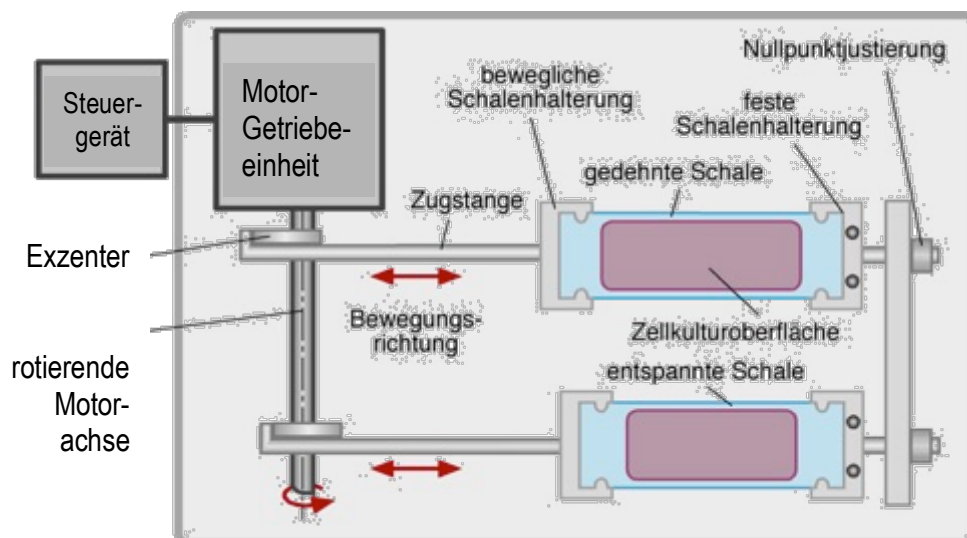
und inflammatorische Stressfaktoren zusammenspielen und zu einem verstärkten Abbau der Bandscheibenmatrix beitragen, untersucht wird in der vorliegenden Studie die Hypothese, dass die Bildung und Aufrechterhaltung der wichtigsten Bestandteile des TLBN durch Entzündungsprozesse beeinflusst wird und dieser Prozess durch mechanische Belastung moduliert wird und Auswirkungen auf die mechanischen Eigenschaften des Gewebes hat.

### **Zielsetzung:**

Ziel der vorliegenden Studie war es, die degenerativen Stressfaktoren mechanische Belastung und Entzündungsbedingungen in Zell- und Organkulturversuchen des Anulus fibrosus zu simulieren und den Einfluss dieser Faktoren auf AF-Zellen, Matrixbestandteile, Entzündungsfaktoren und die mechanischen Eigenschaften des Anulus fibrosus zu untersuchen. Dazu wurde mit Hilfe eines speziell dafür entwickelten belasteten AF-Organokulturmodells (AF-OC) der Einfluss zyklischer mechanischer Belastung unter Simulation von Entzündungsbedingungen sowohl auf Gewebeebene als auch durch zyklische Dehnung isolierter AF-Zellen (AF-CTS) untersucht. Die Effekte auf Bestandteile des TLBN, der Bandscheibenmatrix, Entzündungsfaktoren sowie auf die mechanischen Eigenschaften des AF wurden charakterisiert.

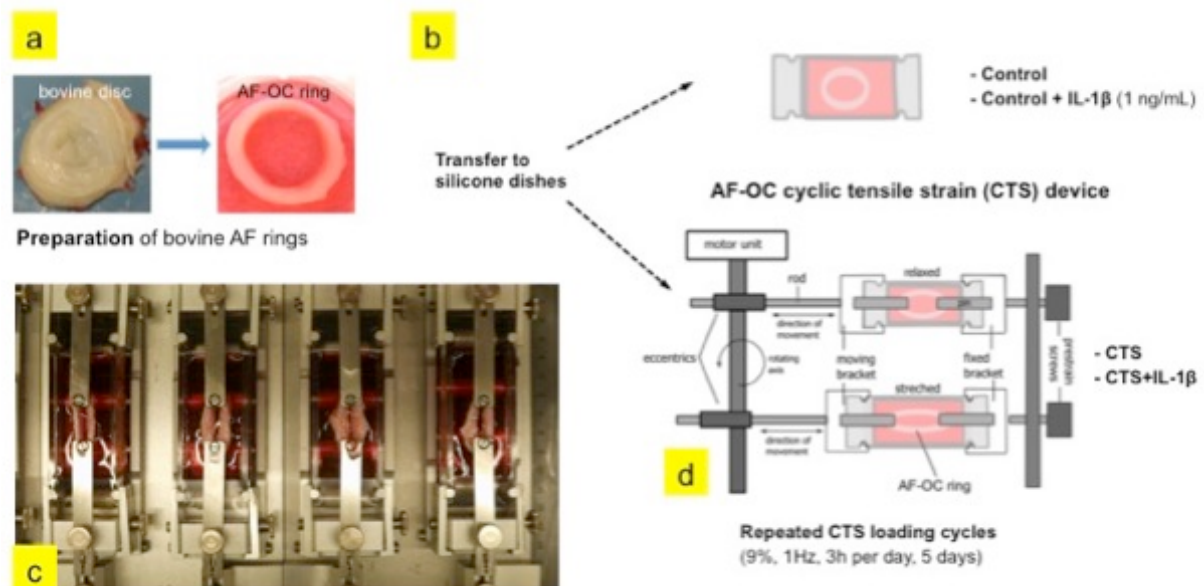
### **Material und Methoden:**

Die Untersuchung der Hypothese, dass Entzündungsbedingungen die Genexpression anaboler TLBN- und Matrixbestandteile, sowie kataboler Enzyme und Entzündungsmarker beeinflussen und diese Effekte durch mechanische Stimulation moduliert werden, erfolgte **an isolierten humanen AF- Zellen (WP1)** mit Hilfe unseres bewährten Zelldehnungsgerätes (Abb.1) sowie **auf Gewebe-Ebene an Organokulturstanzen des bovinen AF (WP2).**



**Abb.1:** Zur Applikation zyklischer Dehnung auf Zellen in Monolayerkultur wurden AF-Zellen in dehnbaren Silikonschalen durch zyklische Dehnung stimuliert. Die Methode ermöglicht die simultane Dehnung von 6 Kulturschalen. Die Dehnungsamplitude kann über die Exzenter an der rotierenden Antriebsachse variiert werden, die Frequenz wird über die Motor-Getriebeeinheit kontrolliert[1, 2].

Um den Einfluss des **Zusammenspiels von Entzündungsbedingungen und mechanischer Belastung** hinsichtlich Struktur und Zusammensetzung sowie biomechanischer Eigenschaften des AF zu untersuchen, dienten uns bovine Bandscheiben als Modell. Die Bandscheiben wurden aus der Schwanzwirbelsäule frisch geschlachteter Rinder isoliert und präpariert. Mit Hilfe speziell hergestellter Schneide- und Stanzgeräte wurden daraus unter sterilen Bedingungen ringförmige AF-Lamellenpräparate von definierter Größe gewonnen (**Abb.2a**), die dann als **AF-Organokulturen (AF-OC)** durch definierte zyklische Dehnung (**CTS**) mechanisch stimuliert wurden (**WP2**) (Versuchsaufbau siehe **Abb.2a**). Mit Hilfe des in **Abb.2c/d** gezeigten speziell entwickelten Stimulationsgerät (Modifikation der Methode aus **Abb.1**) konnten die AF-OC-Ringe durch definierte Dehnungen stimuliert werden.



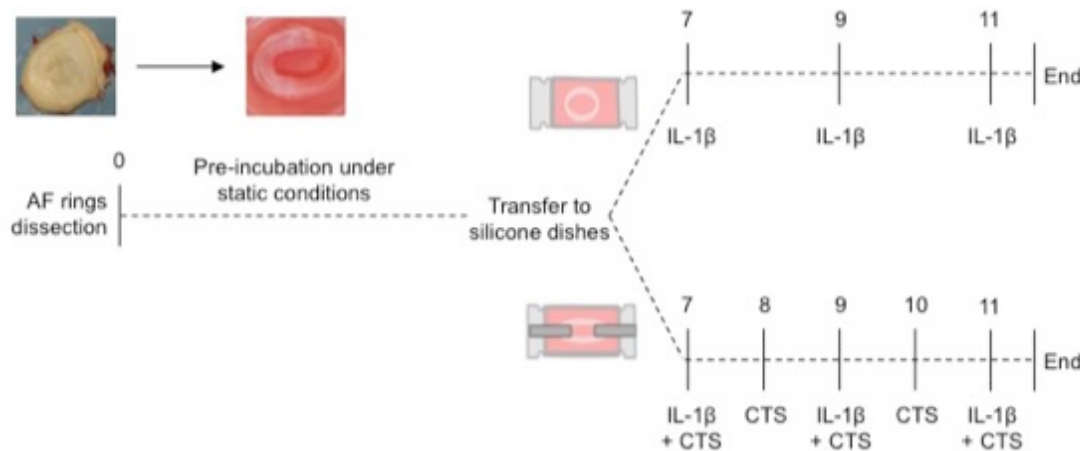
#### Versuchsgruppen ab Tag 7 (Ende der Vorinkubationszeit)

Ansatz:	CTS	IL-1 $\beta$
	(9%, 1Hz, 3 Std/Tag)	(1ng/mL)
Control	-	-
IL-1 $\beta$	-	+
CTS	+	-
CTS + IL-1 $\beta$	+	+

**Abb. 2:** Mit Hilfe speziell entwickelter Stanzen wurden aus bovinen Bandscheibenpräparaten standardisierte AF-Ringe präpariert (a). Diese wurden in unserem AF-OC-Gerät (c und d) durch definierte zyklische Dehnung (CTS) an fünf aufeinander folgenden Tagen mechanisch stimuliert. Parallelansätze ohne Dehnungsapplikation dienten als Kontrollen. In beiden Gruppen wurde zur Simulation des Entzündungsmilieus einem Teil der Ansätze IL-1 $\beta$  zugesetzt (e).

Das geeignete Stimulationsprotokoll für die Applikation zyklischer Dehnungen (CTS) wurde in unseren Vorarbeiten ermittelt. Die Untersuchungen erfolgten durch Vergleich der Gruppen mit/ohne Zusatz des Entzündungsfaktors IL-1 $\beta$  jeweils in mechanisch unbelasteten Kontrollen und Parallel-Ansätzen, die an fünf

aufeinanderfolgenden Tagen durch Applikation zyklischer Dehnungen (9% CTS, 1 Hz, 5 Tage) mechanisch stimuliert wurde (Versuchs-Ablauf siehe **Abb.3**):



**Abb. 3:** Darstellung des Versuchsablaufs der AF-Organokulturversuche (WP2): Versuchsgruppen (siehe Abb. 2e): unbelastete Kontrollen (oben) mit/ohne Zusatz von IL-1 $\beta$  bei jedem Mediumwechsel, oder Ansätze mit zyklischer Dehnung (CTS) mit/ohne Zusatz von IL-1 $\beta$  zugesetzt.

Als **anti-inflammatorischer Behandlungsansatz** wurde im Rahmen des Arbeitspakets **WP3** der Aspekt einer Entzündungshemmung durch Diclofenac-Zusatz und die anti-inflammatorische Wirkung des Sekretoms mesenchymaler Stammzellen inanalysiert. Diese Versuche wurden in Monolayerkulturen – und in ersten Experimenten auch im AF-Organokultur-Ansatz untersucht.

**Auswertungskriterien** in den verschiedenen Versuchsblöcken waren **Entzündungsmarker** (Prostaglandin E2, COX-2, IL-6), **Bestandteile der Matrix und des TLBN**, sowie **matrixabbauende Enzyme** (Elastin, Fibrillin, MMPs, Collagen Typ I), die immunhistochemisch und auf Genexpressionsebene analysiert werden. Die Bestimmung der **mechanischen Eigenschaften** erfolgte durch Messung der Delaminationskraft zwischen benachbarten AF-Lamellen mit Hilfe eines Peel-Tests (siehe **Abb.4**).



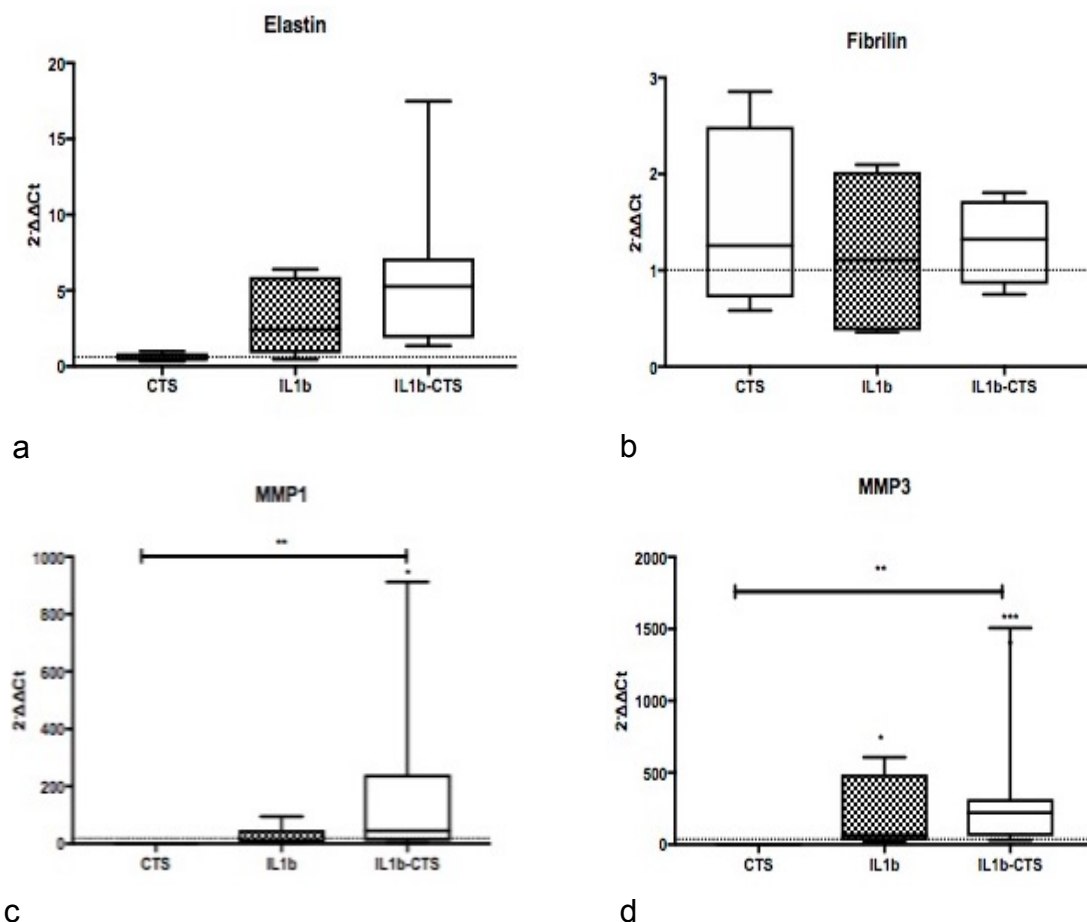
**Abb. 4:** Die Bestimmung der mechanischen Eigenschaften der AF-Präparate (a) in einer Hälfte eines AF-Ring-Präparates (b) mit Hilfe des sogenannten „**Peel-Force-Tests**“ (c). Die Delaminationskraft, die erforderlich ist, um benachbarte AF-Lamellen voneinander zu trennen, wurde analysiert. Dazu wurden die Proben zwischen zwei Lamellen Y-förmig mit einem Skalpell angeschnitten und die beiden Enden der Proben (Anular tabs) wurden mit Hilfe einer Materialprüfmaschine von einander getrennt (c).

## Ergebnisse:

### Dehnungsversuche mit isolierten AF-Zellen mit/ohne und CTS (WP1):

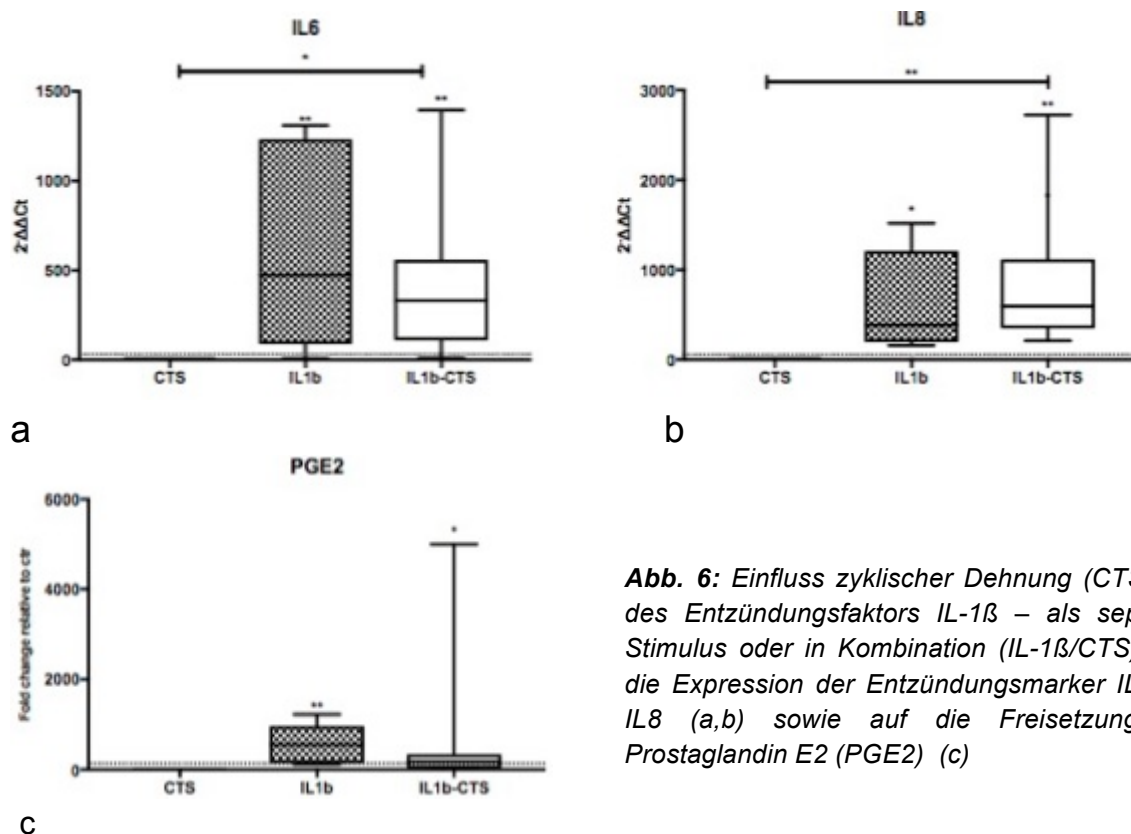
In **WP1** untersuchten wir die **Hypothese H1**, dass Entzündungsbedingungen die Genexpression anaboler TLBN Komponenten sowie kataboler Enzyme und Entzündungsmarker beeinflussen und diese Effekte durch mechanische Stimulation moduliert werden.

In Vorversuchen wurde dafür ein geeignetes Protokoll zur mechanischen Stimulation der AF-Zellen ermittelt. Die Applikation zyklischer Dehnung (cyclic tensile strain = CTS) erfolgte im unteren und oberen physiologischen Bereich (2% bis 8% CTS, 1 Hz, 3 Stunden/Tag, 3-5 Stimulationszyklen). Durch Zusatz von IL-1 $\beta$  im Nährmedium (Standard-Kulturmedium + 1 ng/ml IL-1 $\beta$ ) wurden in einem Teil der Parallelansätze pro-inflammatorische Bedingungen simuliert. Ansätze ohne mechanische Stimulation und IL-1 $\beta$  dienen als Kontrollen. Die nachfolgend dargestellten Ergebnisse zeigen die Effekte der verschiedenen Behandlungen auf die Expression der AF- und TLBN-Bestandteile Kollagen Typ I, Elastin und Fibrillin, Entzündungsmarker (Interleukin IL6 und IL8, Prostaglandin E2, sowie die Matrixmetalloproteinasen (MMP1, MMP3).



**Abb. 5:** Einfluss zyklischer Dehnung (CTS) und des Entzündungsfaktors IL-1 $\beta$  (IL1b) – separat oder in Kombination (IL1b-CTS) – auf die Genexpression der AF-Zellen. Ergebnisse von Elastin (a), Fibrillin (b) bzw. die matrix-abbauenden Metalloproteinasen MMP1 (c) und MMP3 (d).

Die Expression des Strukturproteins Kollagen Typ 1 (ohne Abbildung), sowie der wichtigsten TLBN-Bestandteile Elastin und Fibrillin (Abb. 5a, b) zeigte relativ hohe Schwankungen und wurde durch die verschiedenen Behandlungen nicht signifikant verändert. Die matrix-abbauenden Enzyme MMP1 und MMP3 wurden jedoch signifikant erhöht. Dieser Effekt war besonders ausgeprägt und hochsignifikant in der kombinierten Gruppe (IL-1 $\beta$ -CTS), was auf eine synergistische Verstärkung des Effekts hindeutet.



**Abb. 6:** Einfluss zyklischer Dehnung (CTS) und des Entzündungsfaktors IL-1 $\beta$  – als separater Stimulus oder in Kombination (IL-1 $\beta$ /CTS) – auf die Expression der Entzündungsmarker IL6 und IL8 (a,b) sowie auf die Freisetzung von Prostaglandin E2 (PGE2) (c)

Die Expression der Entzündungsmarker IL6 und IL8 und die Freisetzung von Prostaglandin E<sub>2</sub> wurde durch Stimulation mit IL-1 $\beta$  und die Kombination von IL-1 $\beta$  und CTS signifikant erhöht. Die Kombination beider Stimuli zeigte aufgrund der hohen Schwankungen zwischen den Versuchswiederholungen keinen signifikanten Unterschied. CTS alleine beeinflusste die Expression der Entzündungsmarker nicht. Um diese Ergebnisse auch auf Proteinebene zu verifizieren und zum Nachweis eventueller struktureller und funktioneller Veränderungen in den Gewebeproben, wurden in einem auf die AF-Zellkulturversuche angepassten Versuchsschema in WP2 Untersuchungen am AF-Organkulturmodell durchgeführt.

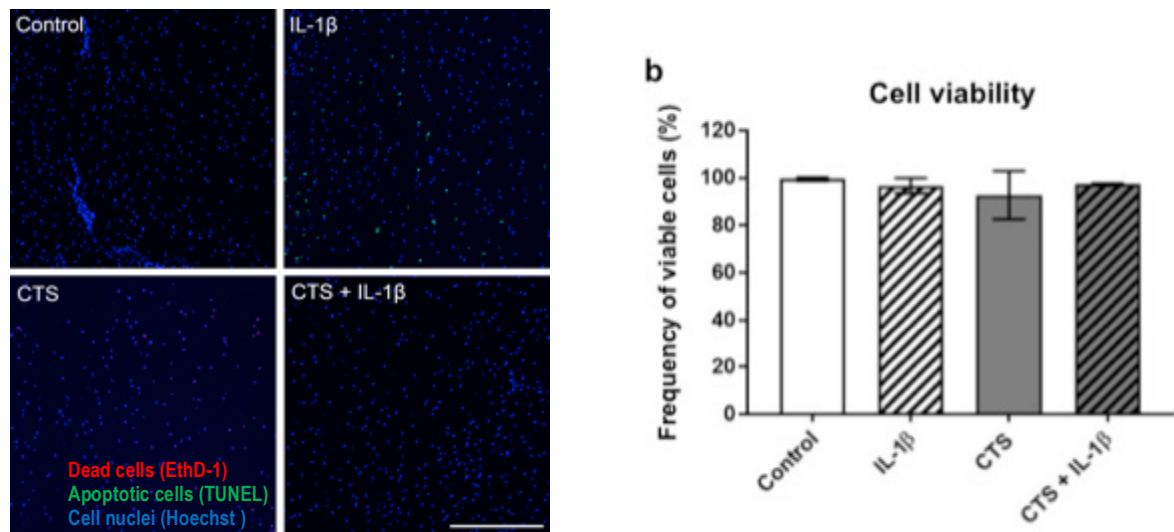
### Ergebnisse WP2: Dehnungsversuche am bovinen AF-Organkulturmodell:

Im Rahmen von WP2 wurde das Zusammenspiel von Entzündungsbedingungen und mechanischer Belastung hinsichtlich Struktur und Zusammensetzung sowie biomechanischer Eigenschaften des AF untersucht. Wir untersuchten die Hypothese, dass Entzündungsbedingungen und mechanische Belastung die Gewebeintegrität des AF stören und die mechanische Festigkeit des Gewebes schwächen.



### **Einfluss auf die Zellviabilität**

Die Zellviabilität in den AF-OC-Ansätzen (Abb.7) wurde durch die unterschiedlichen Behandlungen nicht beeinträchtigt – es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den verschiedenen Behandlungs-Gruppen.

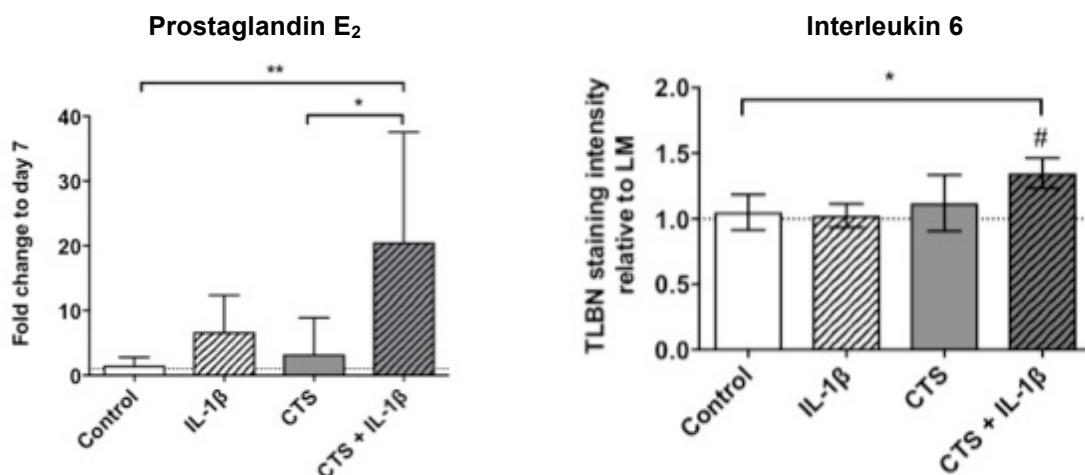


a

**Abb. 7:** Einfluss der Stimulation der AF-Organkulturen durch zyklische Dehnung (CTS) und/oder IL-1 $\beta$  auf die Zellviabilität im Gewebe (a) und quantitative Analyse der Zellviabilität (b)

### **Einfluss auf Entzündungsmarker**

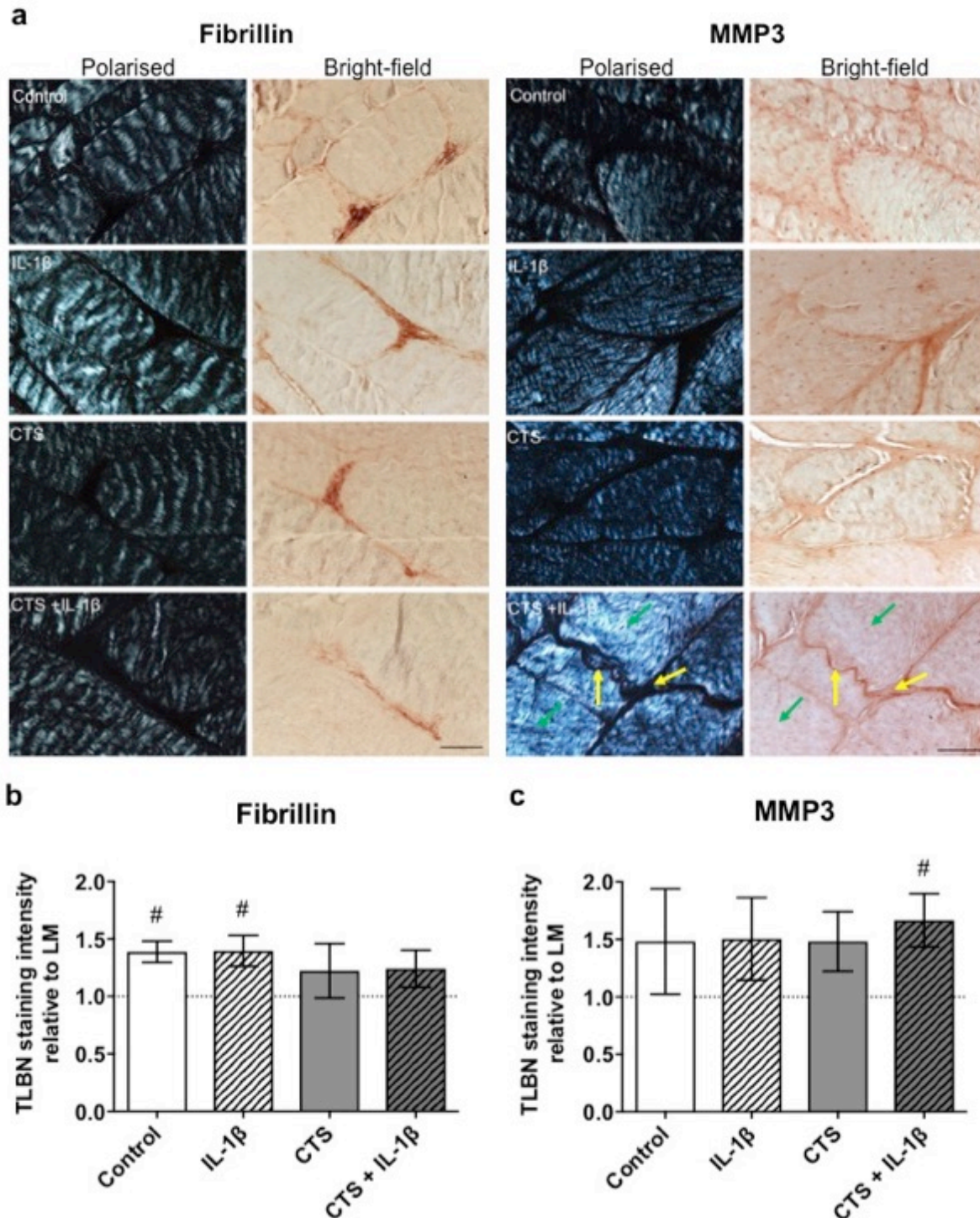
Die Kombination von CTS+IL-1 $\beta$  führte im Vergleich zu den Kontrollen zu einer 25-fachen Erhöhung des Entzündungsmarkers Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), ( $p < 0.05$ , Abb.8a). Die Genexpression der Entzündungsmarker COX-2 und Interleukin 6 konnte immunhistochemisch besonders ausgeprägt im TLBN nachgewiesen werden. Eine signifikante Erhöhung wurde in der kombinierten Gruppe (CTS+IL-1 $\beta$ ) nachgewiesen ( $p < 0.05$ , Abb.8b).



**Abb. 8:** Einfluss der Stimulation der AF-Organkulturen durch zyklische Dehnung (CTS) und/oder Zusatz von IL-1 $\beta$  auf die Entzündungsmarker Prostaglandin E<sub>2</sub> (im Kulturmedium) und Interleukin 6 (immunhistologische Auswertung der Färbung im TLBN relativ zur lamellären Matrix LM).

### **Einfluss auf Matrixproteine und Matrixmetalloproteinasen**

Immunhistochemischen Auswertungen zeigten im TLBN eine stärkere Färbungsintensität für Elastin, Fibrillin (Abb.9a) und MMP3 (Abb.9b) im Vergleich zur lamellären Matrix (LM). Die MMP3-Expression war in der kombinierten Gruppe (CTS+IL-1 $\beta$ ) signifikant höher (Abb.9c)

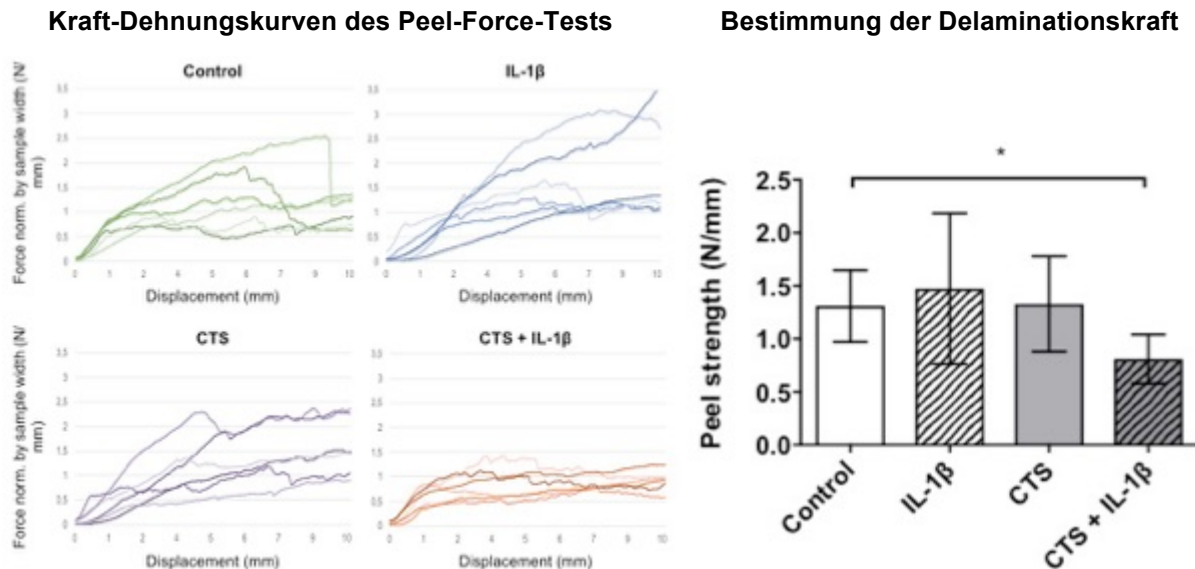


**Abb. 9:** Einfluss der Stimulation der AF-Organokulturen durch zyklische Dehnung (CTS) und/oder IL-1 $\beta$  auf die Entzündungsmarker Prostaglandin E2 (im Kulturmedium) und Interleukin 6 (immunhistologische Auswertung der Gewebeschnitte).



## ***Einfluss auf die mechanische Eigenschaften des Anulus fibrosus***

Zur Charakterisierung der mechanischen Eigenschaften wurden die AF-Hälften stimulierter Ansätze im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen biomechanisch getestet (siehe Abb.4). Die Bestimmung der Delaminationskraft zwischen benachbarten AF-Lamellen aus den Kraft-Dehnungskurven ergab eine signifikante Erniedrigung der Adhäsionskraft (N/mm) in der CTS+IL-1 $\beta$ -Gruppe im Vergleich zu den unstimulierten Kontrollen ( $p=0.02$ ).



**Abb. 10:** Kraft-Dehnungskurven des Peel-Force-Tests aus den verschiedenen Versuchsgruppen (a). Quantitative Bestimmung der Delaminationskraft.

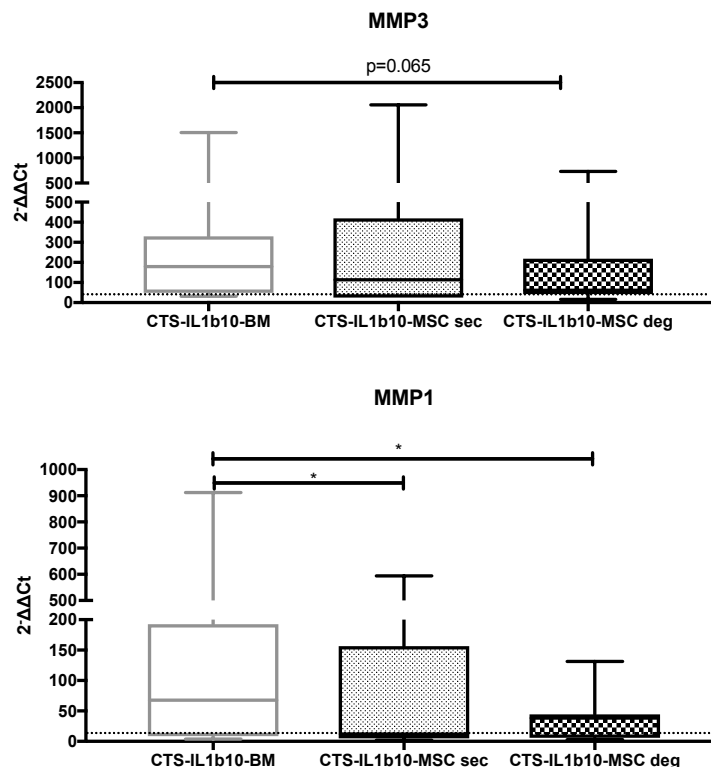
## **Ergebnisse WP3: anti-inflammatorische Behandlungsstrategien**

**Unsere dritte Hypothese** bezieht sich auf die Möglichkeit die Effekte der Entzündungsantwort, die durch IL-1 $\beta$  und zyklische Dehnungsbelastung induziert wurden, durch Zusatz einer Substanz mit bekannter anti-inflammatorischer Wirkung (Diclofenac) zu reduzieren (**H3**).

Dazu wurden in unserem AF-Organkultur-Modell weitere Versuchsgruppen eingeführt, die zusätzlich mit Diclofenac im Nährmedium behandelt wurden. In Ergänzung dazu wurden Ansätze mit dem Sekretom mesenchymaler Stammzellen behandelt, um die Möglichkeit einer anti-inflammatorischen Zelltherapie zu untersuchen.

Die Zugabe von Diclofenac führte in ersten Experimenten zu einer Erniedrigung von Entzündungsmarkern, allerdings konnten wir keine signifikante Änderung in der strukturellen und funktionellen Beschaffenheit des AF nachweisen. Hinsichtlich der Möglichkeit regenerativer Behandlungsstrategien wäre die immunmodulatorische und anti-inflammatorische Wirkung des Sekretoms mesenchymaler Stammzellen ein neuer erfolgsversprechender Ansatz. Zum Nachweis einer potentiellen Wirkung konditionierter Medienüberstände von mesenchymalen Stammzellen deuten erste Zellkulturversuchen auf eine Erniedrigung der Expression matrixabbauender Enzyme

hin (Abb.11). Weiterführende Studien, für die wir gegenwärtig finanzielle Unterstützung beantragen, sind erforderlich um diese Zusammenhänge aufzuklären.



**Abb. 11:** Anti-inflammatorische Behandlung mit dem Sekretom mesenchymaler Stammzellen. Dargestellt ist der Einfluss von CTS und IL1 $\beta$  in Standard-Basalmedium (CTS-IL1b10-BM) oder in Kombination mit MSC-Sekretom unter normalen (CTS-IL1b10-MSC sec) oder degenerativen Bedingungen (CTS-IL1b10-MSC deg).

### Diskussion:

Die Adhäsion benachbarter AF-Lamellen ist für die Integrität des Anulus fibrosus ein wichtiger Faktor. Unser neues belastetes AF-Organkulturmodell ermöglicht die Untersuchung des Zusammenhangs zwischen Struktur und Funktion des AF und TLBN. Unsere Auswertungen zeigen einen synergistischen Effekt von zyklischer Dehnungsbelastung und IL-1 $\beta$ . Die Ergebnisse unserer Studie deuten daraufhin, dass durch Kombination von zyklischer Dehnung und IL-1 $\beta$  pro-inflammatorische und katabole Faktoren im AF, vor allem im Bereich des elastischen Fasernetzwerks der TLBN-Matrix verstärkt werden und dadurch zu einer Schwächung dieser Gewebestruktur beitragen könnten. Unser AF-OC-Modell bietet neue Möglichkeiten, um zu einem besseren Verständnis des Pathomechanismus eines Bandscheibenvorfalles beizutragen und in weiterführenden Studien neue Therapieansätze – beispielsweise mit dem Sekretom mesenchymaler Stammzellen - zu untersuchen

### Publikationen:

Eine Publikation dieser Arbeit befindet sich im Review-Prozess des European Spine Journals. Auf verschiedenen nationalen (DWG) und internationalen Kongressen (ISSLS, eCM) wurden Ergebnisse dieser Studie vorgestellt (siehe Abstract-Anlagen).