

Aus der Klinik für Orthopädie und Rheumatologie
Direktorin: Univ.-Prof. Dr. Susanne Fuchs-Winkelmann
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg



„Die Bedeutung der Expression von CD44 und dessen Splice-Varianten CD44v5 und CD44v6 in hypertrophiertem Ligamentum flavum für die Ausprägung einer lumbalen Spinalkanalstenose“

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin
dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Raphael Schmid

aus Tegernsee

Marburg, 2014

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
am: 06.10.2014

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Prof. Dr. H. Schäfer

Referent: Prof. Dr. S. Fuchs-Winkelmann

1. Korreferent: PD Dr. B. Tackenberg

Originaldokument gespeichert auf dem Publikationsserver der
Philipps-Universität Marburg
<http://archiv.ub.uni-marburg.de>



Dieses Werk bzw. Inhalt steht unter einer
Creative Commons
Namensnennung
Keine kommerzielle Nutzung
Weitergabe unter gleichen Bedingungen
3.0 Deutschland Lizenz.

Die vollständige Lizenz finden Sie unter:
<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/de/>

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Rückenschmerzen als Geißel der Menschheit	1
1.2	Die Bedeutung der Ligamentum flavum-Hypertrophie	2
1.3	Der Oberflächenrezeptor CD44	3
1.3.1	Allgemeines	3
1.3.2	Liganden und Funktion	7
2	Fragestellung	10
3	Material und Methoden	11
3.1	Studiendesign	11
3.2	Ein- und Ausschlusskriterien	12
3.3	Patientenkollektiv	13
3.4	Ermittlung der radiologischen Parameter	17
3.5	Vorbereitung der Präparate	18
3.5.1	Fixierung	18
3.5.2	Einbettung	18
3.5.3	Anfertigung von Schnitten	19
3.6	Histologische Färbung	21
3.6.1	Allgemeines zur Immunhistochemie	21
3.6.2	Die Streptavidin-Biotin-Methode	22
3.6.3	Verwendete Antikörper	24
3.6.4	Färbeprotokolle	25
3.6.4.1	Tag 1	25
3.6.4.2	Tag 2	27
3.6.5	Herstellung TBS-HCL-Tween	31
3.6.6	Herstellung PBS	31

3.7	Auswertung	32
3.8	Statistik.....	32
4	Ergebnisse	33
4.1	Radiologische Erhebung	34
4.2	Histologie	41
4.3	Demographie.....	43
4.4	Zusammenfassung der Ergebnisse.....	44
5	Diskussion	45
5.1	Diskussion der Ergebnisse	45
5.2	Schlussfolgerung und Ausblick.....	56
6	Zusammenfassung	58
6.1	Deutsche Zusammenfassung.....	58
6.2	Englische Zusammenfassung	59
7	Literaturverzeichnis	60
8	Verzeichnis der akademischen Lehrer	74
9	Danksagung	75
10	Anhang	

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: schematische Darstellung der CD44-Genomstruktur [117]	4
Abb. 2: posttranslationale Modifikationen von CD44 [37]	5
Abb. 3: Magnetresonanztomographie des Segments L4/5 [110]	17
Abb. 4: direkte Methode der Immunhistochemie (Selbstentwurf)	21
Abb. 5: der Avidin-Biotin-Komplex (Selbstentwurf)	23
Abb. 6: Antikörperfärbung	29
Abb. 7: Boxplot LF-Dicke in beiden Gruppen	37
Abb. 8: Boxplot minimal Cross-Sectional Area in beiden Gruppen	37
Abb. 9: Scatterplot LF-Dicke versus mCSA	38
Abb. 10: Scatterplot Alter versus LF-Dicke	39
Abb. 11: Boxplot Alter in beiden Gruppen	40
Abb. 12: Boxplot CD44-Varianten versus Gruppe	41

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: CD44-Splicevarianten.....	4
Tab. 2: Patientenkollektiv.....	14
Tab. 3: Epidemiologie Kontrollgruppe.....	14
Tab. 4: Epidemiologie Hypertrophie-Gruppe.....	15
Tab. 5: Einbettung der Präparate.....	19
Tab. 6: Anfertigung von Schnitten.....	20
Tab. 7: Übersicht Materialien 1	20
Tab. 8: Übersicht Primärantikörper	24
Tab. 9: Übersicht Sekundärantikörper	24
Tab. 10: Färbeprotokoll Tag 1	26
Tab. 11: Färbeprotokoll Tag 2	28
Tab. 12: Übersicht Materialien 2	30
Tab. 13: deskriptive Statistik	33
Tab. 14: Patientendaten Bildgebung.....	34
Tab. 15: radiologische Erhebung	36
Tab. 16: lineare Regression LF-Dicke und mCSA	38
Tab. 17: Korrelationsanalyse mCSA, LF-Dicke und Alter.....	39
Tab. 18: CD44-, CD44v5- und CD44v6-Expression (in % positive Zellen)	41
Tab. 19: Quotenverhältnis CD44-Gruppen und Hypertrophie.....	42
Tab. 20: Geschlechterverteilung zwischen beiden Gruppen.....	43
Tab. 21: Geschlecht als variable Einflussgröße	43
Tab. 22: schließende Statistik.....	44

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
Abb.	Abbildung
CD	Cluster of differentiation
DAB	3-3'-Diaminobenzidin
ESI	Epidurale Steroidinfiltrationstherapie
HRP	Horseradish-Peroxidase
IL	Interleukin
kDa	Kilodalton
LF	Ligamentum flavum
Lig.	Ligamentum
Ligg.	Ligamenta
LSS	Lumbale Spinalkanalstenose
mCSA	Minimal Cross-Sectional Area
MMP	Matrixmetalloproteinase
MRT	Magnetresonanztomographie
NSAR	Nichtsteroidale Antirheumatika
PBS	Phosphate buffered saline
SFF	Shear force to failure
SKS	Spinalkanalstenose
Tab.	Tabelle
TBS	Tris-buffer saline

1 Einleitung

1.1 Rückenschmerzen als Geißel der Menschheit

Rückenbeschwerden zählen zu den führenden Gesundheitsproblemen der heutigen Zeit, die Prävalenz nimmt insbesondere in den industrialisierten Ländern der westlichen Welt stetig zu. Neben sozioökonomischen Konsequenzen durch Arbeitskraftverlust stehen aus ärztlicher Sicht die teils massiven individuellen Auswirkungen auf die Lebensqualität des Patienten im Vordergrund.

Allerdings sind Rückenschmerzen kein spezifisches Problem der modernen Gesellschaft, sondern so alt wie die Menschheit selbst. Den Grundstein legte die Entwicklung des aufrechten Gangs und die dafür notwendigen Modifizierungen der Wirbelsäulen Architektur vom stabilen und harmonischen Rundbogen hin zum aufrechten Doppel-S. Seit dieser Zeit stellen Patienten mit Rückenschmerzen eine medizinische Herausforderung dar.

Bereits Hippokrates (460-377 v. Chr.) erkannte die Wichtigkeit der Wirbelsäule für die Gesundheit des Menschen. Er vermerkte in seinem Corpus Hippocraticum, „Erlanget Wissen über das Rückgrat, denn von diesem gehen viele Krankheiten aus“ und beschrieb ein Hüftweh am Ende des Steißes und der Hinterbacken mit Ausstrahlung in den Schenkel, die er durch ein Aufhängen des Patienten an den Füßen zu lindern versuchte.

Überliefert ist auch die Geschichte des pharaonischen Leibarztes, der die chronischen Rückenbeschwerden seines Herrschers mit dem Leben bezahlen musste. Er wurde zur Strafe für seine erfolglosen Therapieversuche auf dem Scheiterhaufen verbrannt. Vor seinem grausamen Ende hätte diesen hilflosen Vertreter der frühen ärztlichen Zunft wohl nur das Wissen seines um 500 v. Chr. praktizierenden Kollegen bewahren können. Der unbekannt ägyptische Mediziner hielt auf einem Papyrus akribisch Untersuchung und Diagnostik bei Rückenbeschwerden fest und formulierte Therapieansätze: „Du sollst ihn flach auf den Rücken legen und dann...“ tragischerweise enden die Ausführungen an dieser Stelle und die unfertigen Schriftrollen fanden ihre Bestimmung als Grabbeigabe ihres Verfassers. Dieses vorenthaltene Wissen mag ein Grund dafür

sein, dass die aktuelle Punkt-Prävalenz von Rückenschmerzen weltweit zwischen 20% und 40% beträgt, bei einer Jahresprävalenz von ca. 60% und einer Lebenszeit-Prävalenz von bis zu 84%. Darüber hinaus erleiden Patienten mit einmaligen Rückenbeschwerden zu 44-78% ein Rezidiv und in 23% der Fälle entwickeln sich chronische Rückenschmerzen [2, 88, 101].

1.2 Die Bedeutung der Ligamentum flavum-Hypertrophie

Als Auslöser spezifischer Rückenbeschwerden zeigen sich in erster Linie degenerative Erkrankungen verantwortlich. In Deutschland ist die degenerativ bedingte lumbale Spinalkanalstenose (LSS) die häufigste strukturelle Wirbelsäulenerkrankung des älteren Menschen und die führende Indikation für operative Eingriffe im Bereich der Lendenwirbelsäule [115].

Die Einengung des Spinalkanals führt durch Lumbalgien, radikuläre Schmerzen oder Gehstreckenverkürzung im Rahmen einer Claudicatio spinalis zu massiven Einschränkungen der Lebensqualität, insbesondere für körperlich aktive Menschen [10]. Ogikubo et al. konnten eine klare Korrelation zwischen der Lebensqualität des Patienten und dem Schweregrad seiner lumbalen Spinalkanalstenose aufzeigen [97].

Als ein entscheidender Faktor in der Genese der lumbalen Spinalkanalstenose konnte in verschiedenen Studien eine Hypertrophie des Ligamentum flavum (LF) detektiert werden [113]. Die zugrundeliegenden histologischen Veränderungen in Faserzusammensetzung und Struktur des Ligaments sowie diverse daran beteiligte Rezeptoren, Proteasen und Mediatoren waren bereits Gegenstand zahlreicher Untersuchungen. Auf Grundlage dieser Erkenntnisse kann davon ausgegangen werden, dass histologische Umbauten in der Binnenstruktur des Ligamentum flavum einen entscheidenden Anteil an dessen Hypertrophie und somit der Entstehung einer lumbalen Spinalkanalstenose haben.

Somit scheint, auch im Kontext einer durch die demographische Entwicklung zu erwartenden weiteren Zunahme der Bedeutung dieses Krankheitsbildes, eine nähere Betrachtung der verantwortlichen komplexen Interaktionen und Veränderungen auf inter- sowie intrazellulärer Ebene von hohem Interesse. Diesbezügliche Erkenntnisse könnten zur Etablierung einer kausalen oder sogar prophylaktischen Therapie der Spinalkanalstenose beitragen.

1.3 Der Oberflächenrezeptor CD44

1.3.1 Allgemeines

Als Cluster of differentiation (CD) wird eine Gruppe von Oberflächenproteinen bezeichnet. Sie sind ubiquitär auf allen Körperzellen vorhanden und werden aufgrund ihrer verschiedensten Funktionen und Strukturen aktuell in 339 Untergruppen eingeteilt.

Wichtige und bekannte Vertreter dieser membrangebundenen Glykoproteine sind die CD8- und CD4-Rezeptoren, welche an Zellen des Immunsystems exprimiert werden und essenziell für die Funktion von T-Helferzellen (CD4+) und zytotoxischen T-Zellen (CD8+) sind.

Die Untergruppe 44 wurde erstmals 1980 von Dalchau et al. [22] als ein Leukozytenoberflächenrezeptor in Form eines transmembranären Typ 1 Glykoprotein detektiert [128]. Bei anderen bis dahin bekannten transmembranären Proteinen mit verschiedensten Bezeichnungen wurde nachträglich erkannt, dass sie mit CD44 identisch sind. Es wurde festgestellt, dass Phagocytic Glycoprotein 1 (Pgp-1), Ly-24, Extracellular Matrix Receptor Type III (ECM-III), p80, p85, Homing Cell Adhesion Molecule (H-CAM) sowie Hermes- und HUTCH-1 Antigen ein und derselben Proteingruppe angehören [81, 92, 132]. Heute sind des Weiteren verschiedene Isoformen (Standardisoform CD44s sowie die Varianten CD44H und CD44E) und Splice-Varianten (CD44v1-10) bekannt.

Die genomische Zusammensetzung des CD44-Proteins konnte in den Jahren 1992 und 1993 erstmals durch Sreaton et al. beschrieben werden [116, 117].

Das CD44-Gen befindet sich beim Menschen auf dem kurzen Arm von Chromosom 11 (11p13) und enthält 20 Exons, wobei die Standardisoform nur Exon 1-5 und Exon 16-20 exprimiert. Die varianten Formen unterscheiden sich darin, welches der 10 ausgesparten inneren Exons, die variabel gespleißt werden können, zusätzlich exprimiert wird (Abb. 1).

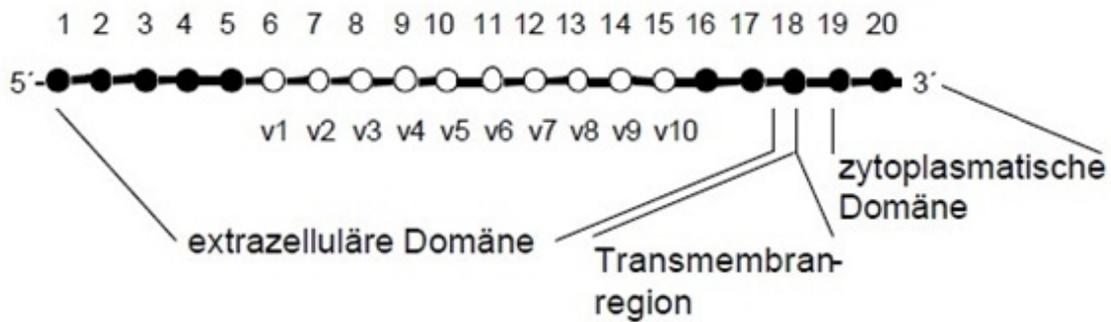


Abb. 1: schematische Darstellung der CD44-Genomstruktur [117]

Das Protein ist aus drei Teilen zusammengesetzt (Abb. 1). Es besteht aus einer extrazellulären Domäne (248 Aminosäuren), einer Transmembranregion (23 Aminosäuren) und einer intrazellulären Domäne (72 Aminosäuren) [37, 92]. Exon 1-5, 16 und 17 codieren den extrazellulären Bereich der Standardisoform und werden für die Splicevarianten durch zusätzliche Exons (6-15) ergänzt. Transmembranregion und Intrazellular-Domäne werden wieder in Gestalt der Standardisoform einheitlich durch Exon 18 bis 20 kodiert [92, 116, 117].

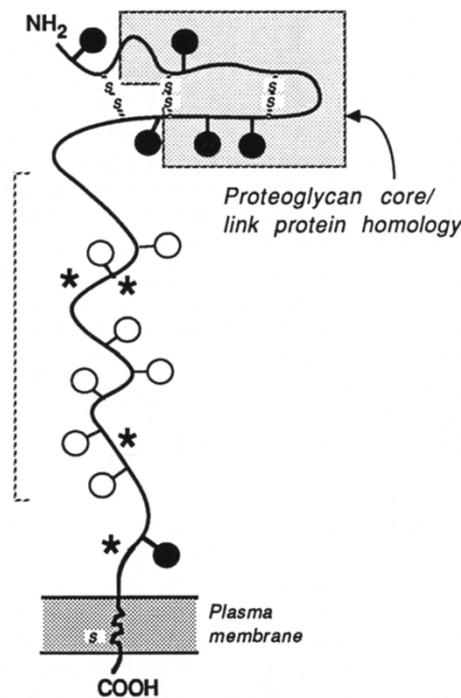
Die Splicevariante CD44v1 tritt beim Menschen nicht auf, da durch Transition von G nach A an Position 55 ein Stoppcodon entsteht und somit das Protein mit dem varianten Exon v1 nicht transkribiert wird [116]. Diese Form konnte nur aus Rattenzellen isoliert werden [123].

Tab. 1: CD44-Splicevarianten

Splicevariante	Exon
CD44v1	6
CD44v2	7
CD44v3	8
CD44v4	9
CD44v5	10
CD44v6	11
CD44v7	12

Die Bezeichnung der Isoformen orientiert sich am exprimierenden Zelltyp, CD44H findet sich primär auf hämatopoetischen Stammzellen, CD44E auf Epithelzellen [92].

Zusätzlich zu den neun variabel spleißbaren Exons werden durch multiple posttranslationale Modifikationen, wie Sulfatbrückenbildung, O- bzw. N-gebundene Glykosylierung und Bindung von Glykosaminoglykanen (Mucopolysachcariden), wie Heparan-, Chondroitin-, Dermatan- und Keratansulfat, weitere Möglichkeiten der Variabilität geschaffen [37, 92, 141]. Mittlerweile sind über 40 verschiedene Formen des CD44-Proteins mit Molekulargewichten von 85 bis 230 Kilodalton (kDa) [92] bekannt [12, 28].



O : O-Glykosylierung, ● : N-Glykosylierung, ★ : Glykosaminoglykan, S-S: Disulfidbrücke

Abb. 2: posttranslationale Modifikationen des Oberflächenrezeptors CD44 [37]

Am extrazellulären N-terminalen Ende befindet sich eine Link-Domäne, die durch die Bildung von Disulfidbrücken stabilisiert wird und fünf Strukturen für potentielle N-glykosydische Bindungen aufweist. In der extrazellulären Stielregion des Rezeptors, in welcher auch die Translationsprodukte der variablen Exons zu finden sind, befinden sich sieben potentielle O-Glykosylierungs-

Punkte sowie ein zusätzlicher N-Glykosylierungs-Bereich. Des Weiteren sind vier Glykosaminoglykan-Bindungsstellen vorhanden (Abb. 2).

Das Molekulargewicht des Standardproteins beträgt 37 kDa [37], erreicht aber durch die posttranslationalen Glykosylierungen ein Gewicht von 85-95 kDa [92, 141]. Eine weitere Vergrößerung des Proteins erfolgt dann durch Glykosaminoglykanaddition, bis zu einem Gewicht von 230 kDa [129].

Je nach Glykosylierungsgrad können drei Aktivitätsstufen des CD44-Rezeptors unterschieden werden: aktiv, induzierbar und inaktiv. Ein aktiver Rezeptor bindet an seine Liganden ohne einen zusätzlichen externen Stimulus zu benötigen, der inaktive bindet auch im Falle solcher Stimuli nicht. Der induzierbare Rezeptor bindet nur schwach an seinen Liganden, kann aber durch externe Faktoren stimuliert werden [72]. Als solche wurden monoklonale Antikörper (mAbs) [45, 72], Zytokine (Interleukin-5, Interleukin-2, Tumornekrosefaktor- α , Interferon- γ) [45, 74, 82], Wachstumsfaktoren (Epidermal Growth Factor, Transforming Growth Factor- β 1, Oncostatin M) [17, 140] und das Kanzerogen Phorbol ester [92] identifiziert. Verantwortlich für den Rezeptorstatus ist die oben erwähnte posttranslationale N-Glykosylierung und Glykosaminoglykanaddition. Der inaktive Rezeptor weist die meisten Glykosid-Gruppen auf, der aktive die wenigsten und der induzierbare Rezeptor findet sich dazwischen [72, 107]. Lesley et al. konnten zeigen, dass durch ein Entfernen der Glykosylierungen durch Tunicamycin und der Glykosaminoglykanketten mittels p-Nitrophenyl β -D-Xylopyranosid oder Chondroitinase ABC der Rezeptor von einem inaktiven in einen aktiven Status überführt werden kann. In vielen weiteren Untersuchungen konnte ein Zusammenhang zwischen Aktivität und Glykosylierung aufgezeigt werden [39, 43, 108].

1.3.2 Liganden und Funktion

Die große Variabilität der extrazellulären Domäne bildet die Grundlage für die Funktion von CD44 als Oberflächenrezeptor und für die hohe Anzahl an unterschiedlichsten Zell-Zell Interaktionen über CD44, z. B. im Rahmen der Zelladhäsion [26, 27, 73, 78], des Zellwachstums und der Zelldifferenzierung [70], der Leukozytenaktivierung [25, 40], der Phagozytose [133] sowie der Zellmigration durch Zytokinbindung und -aktivierung [94]. Durch diese starke Beteiligung an der Zell-Zell Kommunikation ist CD44 an elementaren physiologischen Vorgängen des menschlichen Körpers wie Wundheilung [70] und Induktion einer Entzündungsreaktion [86], aber auch Tumorwachstum und Zellproliferation [29, 53, 89] direkt beteiligt.

Im Rahmen der Pathogenese verschiedenster Erkrankungen konnte die besondere Rolle der CD44-Expression gezeigt werden. Das Oberflächenprotein ist über die Interaktion mit Hyaluronsäure an der Genese der Arthrose [35, 98] und der rheumatoiden Arthritis [85, 90] beteiligt. Bartolazzi et al. postulierten, dass das Tumorwachstum induzierende Potential von CD44 ebenfalls stark von dessen Hyaluronan Bindungsfähigkeit abhängig ist [8]. Insbesondere die Splicevariante CD44v6 scheint an einer Induktion der Tumorzellproliferation und Metastasierung beteiligt zu sein [14, 120]. Eine signifikante Korrelation zwischen CD44-Genexpression und Überlebenszeit sowie Metastasierung lässt sich bei verschiedenen Tumorentitäten beobachten. Dazu zählen unter anderem das Chondrosarkom [48], das Pankreas-Adenokarzinom [84, 109, 118], das Non-Hodgkin-Lymphom [65, 125], das multiple Myelom [126] und das Zervixkarzinom [23, 57, 58]. Fehlfunktionen von CD44 werden auch bei hämatologischen Malignitäten beschrieben [15, 59]. Eine Beteiligung von CD44 an der Genese und Metastasierung des Kolonkarzinoms wird kontrovers diskutiert [38, 66].

In dieser Arbeit aber liegt das Hauptaugenmerk auf der Bedeutung der CD44-Interaktion mit Hyaluronan und anderen Komponenten der Extrazellulärmatrix [11] im Rahmen der Gewebsdegeneration und nicht der Tumorproliferation.

Hyaluronan ist ein langes Polymer von repetitiven Disaccharidmolekülen, bestehend aus jeweils einer D-Glucuronsäure und N-acetyl-D-Glucosamin Untereinheit, welche β 1,3 bzw. β 1,4 glykosidisch miteinander verknüpft sind [D-

glucuronic acid (1- β -3) N-acetyl-D-glucosamine (1- β -4)]_n, und der wichtigste Ligand des CD44-Rezeptors [78, 79, 91]. Weitere CD44-Liganden der Extrazellulärmatrix sind Kollagen [13, 77], Fibronectin [8, 52], Fibrinogen, Laminin und das Glyksoaminoglykan Chondroitinsulfat [47, 92], wenngleich die Bedeutung dieser Interaktionen nach heutigem Wissenstand bei weitem nicht vergleichbar ist mit der zentralen Rolle der CD44-Hyaluronan Komplexbildung.

Hyaluronan ist ein Hauptbestandteil der Extrazellulärmatrix und spielt in lebenden Zellen eine wichtige Rolle bei Durchführung und Aufrechterhaltung der Zell-Zell Kommunikation [138], Zell-Matrix Interaktionen, zellulärer Migration, Umbau der Extrazellulärmatrix sowie Zytokinbindung und -aktivierung [71, 94]. Der Hyaluronan-Gehalt in Endothelzellen wird bei Stimulation durch proinflammatorische Zytokine hochreguliert [105]. Dies dürfte mit der vermuteten CD44-Hyaluronan Bindung in Gefäßendothelzellen und der dadurch induzierten Migration von aktivierten Leukozyten und Lymphozyten zusammenhängen [54].

Allerdings scheint die CD44-Hyaluronan Interaktion nicht nur unabdingbar für viele Formen der physiologischen Zellkommunikation zu sein, sondern sie zeigt sich auch, wie bei der oben erwähnten Tumorpheriferation, im Falle eines Verschiebens der diffizil aufeinander abgestimmten Verhältnisse in einem Zellverbund mitverantwortlich für massive Fehlregulationen.

CD44 stellt durch die Steuerung der Hyaluronsäure Homöostase [6, 64] ein Schlüsselprotein der fibrotischen Heilung von Sehnen dar. Zum einen ist die Aktivität von Hyaluronidase-1 und -2, Abbauproteine der Hyaluronsäure, direkt abhängig von CD44 [44], zum anderen bindet CD44 Hyaluronsäure und vermittelt deren Aufnahme in die Zielzelle mittels Endozytose und damit den lysosomalen Abbau [20].

Yagishita et al. zeigten, dass sich ein hoher Hyluronsäurespiegel, erzielt durch eine lokale Injektion, positiv auf die Regeneration von Sehngewebe auswirkt [137], ein hoher Spiegel an CD44 aber führt zu einer fibrotischen Heilung [31]. Im Rahmen einer narbenlosen fetalen Heilung wurden hohe Hyaluronan-Level und eine herunterregulierte CD44-Expression beobachtet [31] und der Vergleich der Sehnenheilung zwischen CD44 knock-out Mäusen und wild-typ Mäusen ergab einen klaren Vorteil seitens der genoptimierten Gruppe [5].

Da Hyaluronan hauptsächlich von CD44 abgebaut wird, scheint ein Zusammenhang zwischen Narbengewebsbildung und CD44-Expression wahrscheinlich. Und nicht nur die Standardisoform CD44s spielt in diesem Zusammenhang eine Rolle, sondern auch verschiedene Splicevarianten. Die Höhe der Expression von CD44v6 in der Synovia korreliert mit inflammatorischen Geschehen wie rheumatoider Arthritis, demgegenüber ist CD44v5 mehr an der Entstehung einer degenerativen Arthrose ohne inflammatorische Komponente beteiligt [35, 48].

Wie erwähnt, war und ist die CD44-Expression in Sehnen Objekt zahlreicher wissenschaftlicher Untersuchungen, wohingegen die Expression von CD44 und den Splicevarianten CD44v5 und v6 in Bändern bisher wenig Beachtung findet.

2 Fragestellung

Die Einengung des Spinalkanals im Rahmen einer lumbalen Spinalkanalstenose hat massive Einschränkungen der Lebensqualität zur Folge. Dafür verantwortliche degenerative Vorgänge im Bereich des Ligamentum flavum sind Gegenstand zahlreicher Untersuchungen. Durch Hypertrophie, Fibrosierung und Kalzifizierung wird die Struktur des Ligamentum flavum verändert und der Durchmesser des Spinalkanals verringert. Es konnten bereits zahlreiche daran beteiligte Zytokine und Proteasen ermittelt werden.

Der Oberflächenrezeptor CD44 wird ubiquitär auf allen Körperzellen exprimiert und spielt eine zentrale Rolle bei Zell-Zell und Zell-Matrixinteraktionen. Beschrieben sind seine Beteiligung an verschiedensten physiologischen und pathologischen Vorgängen insbesondere im Zusammenhang mit Sehnen- und Knorpeldegeneration. Die Expression von CD44 und dessen Splicevarianten CD44v5 und v6 im Rahmen degenerativer Prozesse in Bändern fand bisher wenig Beachtung.

In der vorliegenden Dissertationsschrift stehen zwei Dinge im Fokus. Zum einen die allgemeine Bedeutung einer Hypertrophie des Ligamentum flavum für die Ausprägung einer lumbalen Spinalkanalstenose sowie zum anderen die im Zuge einer Hypertrophie möglicherweise veränderte Expressierung des Zelloberflächenrezeptors CD44.

Es ergeben sich folgende Fragestellungen:

1. Ist das Ligamentum flavum bei Patienten mit lumbaler Spinalkanalstenose signifikant hypertrophiert im Vergleich zu Patienten ohne Spinalkanalstenose und besteht eine Korrelation zwischen Dicke des Ligamentum flavum und der mCSA?
2. Ist die Expression von CD44 und dessen Splice-Varianten CD44v5 und CD44v6 in einem hypertrophierten Ligamentum flavum signifikant verändert gegenüber der Expression ebendieser Faktoren in einer gesunden Bandstruktur?

3 Material und Methoden

3.1 Studiendesign

Bei der durchgeführten Untersuchung handelt es sich um eine prospektive Studie.

Aus dem Patientengut der Klinik für Orthopädie und Rheumatologie des Universitätsklinikums Gießen und Marburg, Standort Marburg, Direktorin Frau Prof. Dr. med. S. Fuchs-Winkelmann, wurden Patienten mit der Indikation zur operativen Dekompression bei lumbaler Spinalkanalstenose ausgewählt.

Die Kontrollgruppe setzt sich aus Patienten der Klinik für Neurochirurgie des Universitätsklinikums Gießen und Marburg, Standort Marburg, Direktor Prof. Dr. med. Ch. Nimsky, mit der Indikation zur Nukleotomie bei Discusprolaps zusammen.

Die statistische Beratung erfolgte durch das Institut für Medizinische Biometrie und Epidemiologie der Philipps-Universität Marburg sowie MUON-STAT - statistische Dienstleistungen & Beratung.

Das positive Ethikvotum (AZ 191/09) wurde am 11.02.10 durch die Ethikkommission des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg erteilt.

3.2 Ein- und Ausschlusskriterien

Einschlusskriterien der Hypertrophie-Gruppe:

- Patienten mit magnetresonanztomographisch gesicherter lumbaler Spinalkanalstenose
- Patienten mit der Indikation zur operativen Dekompression des Spinalkanals
- Patientenalter von mindestens 18 Jahren
- Einverständnis zur Studienteilnahme

Einschlusskriterien der Kontrollgruppe:

- Patienten mit der Indikation zur Nukleotomie, ohne degenerative Veränderungen der Lendenwirbelsäule in der Schnittbildgebung
- Patientenalter von mindestens 18 Jahren
- Einverständnis zur Studienteilnahme

Ausschlusskriterien:

- Verweigerung oder Unfähigkeit zur Zustimmung
- Infektionen an der Wirbelsäule
- Revisionsoperationen
- Posttraumatische Wirbelsäulenerkrankung
- Metastatisch bedingte Wirbelsäulenerkrankung

Das Patienteninformationsblatt und das Formular für die Zustimmungserklärung befinden sich im Anhang.

3.3 Patientenkollektiv

In der Klinik für Orthopädie und Rheumatologie des Universitätsklinikums Gießen und Marburg, Standort Marburg, werden unter der Leitung von Frau Prof. Dr. Susanne Fuchs-Winkelmann lumbale Spinalkanalstenosen operativ behandelt. Im Rahmen der operativen Therapie wird degenerativ verändertes, hypertrophiertes Ligamentum flavum entfernt. Diese üblicherweise verworfenen Anteile des Ligaments wurden den in die Studie eingeschlossenen Patienten im Zeitraum zwischen Februar 2010 und Mai 2011 von OA Dr. Fölsch und Dr. Lakemeier entnommen.

Die Flavum-Proben der Kontrollgruppe generierten sich aus obligat im Zuge einer Nukleotomie anfallenden und zur Entsorgung vorgesehenen Ligamentum flavum Anteilen. Diese wurden durch Ärzte der Klinik für Neurochirurgie des Universitätsklinikums Gießen und Marburg, Standort Marburg, Direktor Prof. Dr. med. Ch. Nimsky, entnommen.

Durch die dargestellten Ein- und Ausschlusskriterien ergab sich auf Seiten der Interventionsgruppe ein Kollektiv von 38 Patienten, dem gegenüber fanden 12 Patienten Einschluss in die Kontrollgruppe. Insgesamt wurden 29 Männer und 21 Frauen in die Studie aufgenommen.

Tab. 2: Patientenkollektiv

	männlich	weiblich
Hypertrophie-Gruppe	19	19
Kontrollgruppe	10	2

Tab. 3: Epidemiologie Kontrollgruppe

Patienten-Kürzel	Geschl.	Alter [Jahre]	Diagnose
2EA39	m	48	Bandscheibenprotrusion L4/5
14AF56	w	37	Bandscheibenprotrusion L5/S1
19HW41	m	83	Bandscheibenprotrusion L3/4
23TF42	m	36	Bandscheibenprotrusion L3/4
25KT88	m	31	Bandscheibenprotrusion L5/S1
26DN83	m	55	Bandscheibenprotrusion L4/5
29SK21	m	20	Bandscheibenprotrusion L4/5
30MN60	m	32	Bandscheibenprotrusion L4/5
31GK73	m	81	Bandscheibenprotrusion L4/5
41EZ28	w	83	Bandscheibenprotrusion L4/5
43AW47	m	50	Bandscheibenprotrusion L4/5
46OD47	m	41	Bandscheibenprotrusion L5/S1

Tab. 4: Epidemiologie Hypertrophie-Gruppe

Pat.-Kürzel		Alter [Jahre]	Diagnose
0VS85	w	57	Lumbale Spinalkanalstenose (L4/5)
1JT86	m	67	Lumboischalgie L5 bds., Osteochondrose LWS, SKS L4/S1
3TG50	w	56	Gefügestörung LWS mit lumbaler SKS L4/5
4RD23	m	52	Gefügelockerung mit Spinalkanalstenose L4-S1
5IA02	w	53	Spinalkanalstenose L4/5
6MB87	w	60	Spinalkanalstenose L2-4
7WS72	m	58	Osteochondrose Lumbalbereich mit SKS L3-5
8FI49	m	75	Claudicatio spinalis bei SKS L4 - S1
9JC96	m	76	Osteochondrose Lumbalbereich mit SKS L2-S1
10HR21	m	54	Osteochondrose LWS mit SKS L3-S1
11IL16	w	71	Degenerative Lumbalskoliose mit SKS L3-S1
12WB39	m	62	Osteochondrose L4/5 mit SKS L4-S1
13HW43	w	72	Osteochondrose lumbosacral mit SKS L4-S1
15PS77	m	63	Symptomatische Claudicatio spinalis bei SKS L 3-5
16SB44	m	71	Osteochondrose LWS mit SKS L3-S1
17MG56	w	83	Spondylolisthesis Lumbalbereich mit SKS L2-5
18HB13	m	64	Osteochondrose Lumbalbereich mit SKS L4/5
20LE05	w	73	Osteochondrose LWS mit SKS L4/5
21HM72	m	71	Osteochondrose Lumbosakralbereich mit Spinalkanalstenose
22MS71	w	71	Degenerative Lumbalskoliose mit SKS L4/5
24DW93	m	50	Gefügestörung LWS L4-S1 mit SKS L4/5
27RP48	w	71	Osteochondrose mit deg. LWS-Skoliose, SKS L3-S1
28GS13	m	84	Gefügestörung/Osteochondrose LWS mit SKS L4-S1
32GS96	w	71	Degenerative Lumbalskoliose mit Spinalstenose L4/5
33HB11	m	58	Osteochondrose/deg. LWS-Syndrom, SKS LWS
34MK72	w	63	Osteochondrose L3 - S1 mit Spinalkanalstenose

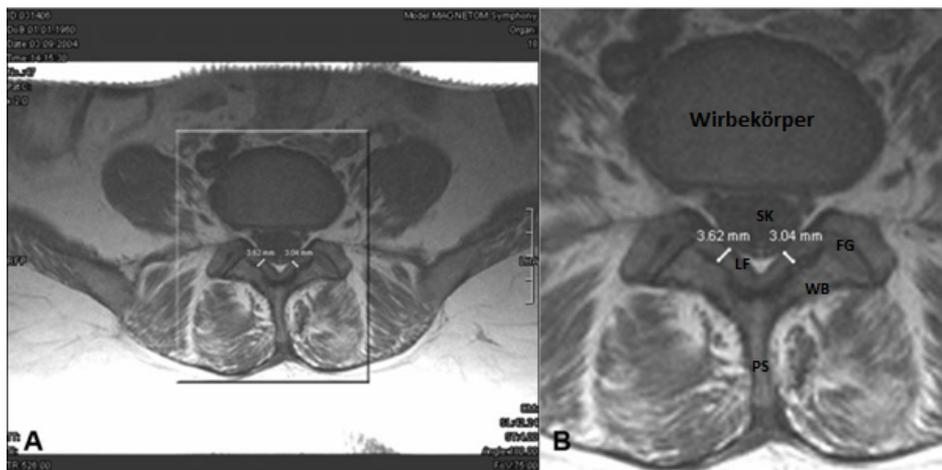
Material und Methoden

35HPR56	m	65	Degenerative Lumbalskoliose mit SKS L3-5
36MC03	w	75	Erosive Osteochondrose L2/3 mit SKS L2/3
37RP11	m	63	Gefügestörung/Osteochondrose LWS mit SKS L4-S1
38AK18	m	54	Gefügestörung/Osteochondrose LWS mit SKS L4/5
39EK55	w	75	Osteochondrose LWS mit SKS L4-S1
40LP92	w	56	Multiseg. Osteochondrose LWS mit SKS L4-S1
42HG26	m	75	Gefügestörung LWS mit SKS L2-S1
44HG87	w	68	Osteochondrose Lumbalbereich mit SKS L4-S1
45IB71	w	73	Osteochondrose und Gefügestörung LWS mit SKS L3-S1
47MH72	w	77	Deg.LWS-Syndrom/Osteochondrose LWS mit SKS L4-S1
48JB55	w	53	Spondylolisthesis L4/5 mit SKS L3/4
49WS28	m	85	Osteochondrose Lumbalbereich mit SKS L3/4

3.4 Ermittlung der radiologischen Parameter

Die lumbale Magnetresonanztomographie (MRT) ist die Methode der Wahl für den Nachweis einer lumbalen Spinalkanalstenose [30]. Dicke des Ligamentum flavum und mCSA wurden daher mithilfe eines speziellen Analysesystems (PACS, Agfa-Gevaert group, Mortsel, Belgium) aus im Rahmen der präoperativen Diagnostik ohnehin erfolgten MRT Untersuchungen ermittelt. Es kamen ausschließlich T1-gewichtete Aufnahmen zur Anwendung. Als einheitliche Höhe zur mCSA-Messung wurde bei dem vorliegenden Patientenkollektiv der Zwischenwirbelraum L4/5 festgelegt.

Zusätzlich zur mCSA wurde im Zwischenwirbelraum L4/5 auf Höhe der Facettengelenke die maximale Dicke des Ligamentum flavum erfasst (Abb. 3). Die Angabe der mCSA erfolgte in mm^2 , die Dicke des Ligamentum flavum in mm.



SK=Spinalkanal (mCSA), FG=Facettengelenk, LF=Ligamentum flavum, WB=Wirbelbogen, PS=Processus spinosus

Abb. 3: Magnetresonanztomographie des Segments L4/5 [110]

3.5 Vorbereitung der Präparate

3.5.1 Fixierung

Unmittelbar nach der intraoperativen Entnahme der Proben erfolgte bei Raumtemperatur für 24 Stunden die Fixierung der Ligamentum flavum Stücke in 4% Formaldehyd.

Die chemische Fixierung dient zur Stabilisierung und Asservierung der Gewebepreparate. Die Stabilisierung behindert das Fortlaufen physiologischer Zerstörungsprozesse im behandelten Gewebe, der aktuelle Zustand des Gewebes wird somit konserviert. Dies erfolgt durch eine Quervernetzung der Proteine, welche allerdings im weiteren Verlauf im Rahmen der Färbung wieder gelöst werden muss.

3.5.2 Einbettung

Eine Einbettung der Präparate ist notwendig, da es ohne festes Medium nicht möglich ist, die Proben in die im Zuge dieser Arbeit benötigten 5µm dünnen Blöcke zu schneiden. Als einfachstes und gängigstes Medium zur Einbettung steht Paraffin zu Verfügung. Teurer und weit aufwendiger ist die Einbettung in Kunststoff, weswegen die Blöcke in unserem Fall aus Paraffin gefertigt wurden. Vor der Einbettung der Präparate wurden die Proben aus der 4% Formaldehydlösung in Einbettungskassetten mit genauer Patienten-Kodierung (anonymisiert) zur einwandfreien Zuordnung überführt. Im ersten Schritt des eigentlichen Verfahrens erfolgten dann das Auswaschen des Formaldehyds und eine anschließende Entwässerung der Proben, um eine Einbettung in hydrophobem Paraffin überhaupt zu ermöglichen. Dazu wurden die Präparate unter fließendem Leitungswasser für 6 Stunden gewaschen und anschließend in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert. Diese setzte sich wie folgt zusammen: Zweimal Isopropanol 50% für 2-3 Stunden, anschließend Isopropanol 70% für 48 Stunden und schließlich zweimal Isopropanol 100% für 2-3 Stunden. Auf die Entwässerung der Proben mittels Alkohol folgte für 24 Stunden die Inkubation in einem Intermedium, in unserem Fall Zedernholzöl. Die Behandlung der Proben mit einem Intermedium dient der Verdrängung des Alkohols aus dem Gewebe

um danach das Zedernholzöl durch Paraffin ersetzen zu können. Daher konnte nun im Anschluss an die Behandlung mit Zedernholzöl das Einlegen der Präparate in 60°C heißem flüssigem Paraffin für 72 Stunden erfolgen. Das anfangs verwendete Paraffin wurde nach 48 Stunden durch frisches Paraffin ersetzt. Im letzten Schritt erfolgte die endgültige Einbettung des Gewebes in gegossene und mit einer Kodierung versehene Paraffinblöcke. Die Anfertigung von Schnitten war erst nach einer 24-stündigen Abkühlungsphase möglich.

Tab. 5: Einbettung der Präparate

Vorgang	Zeit
Intraoperative Entnahme	-
Formaldehyd 4%	24h
Waschen in Einbettungskassette	6h
2 x Isopropanol 50%	2-3h
Isopropanol 70%	48h
2 x Isopropanol 100%	2-3h
Zedernholzöl	24h
Paraffin 60°	72h

3.5.3 Anfertigung von Schnitten

Die Anfertigung 5µm dünner Schnitte erfolgte mit einem Rotationsmikrotom. Nach Auffangen des Präparats in einem Kaltwasserbad erfolgte die Überbringung der Schnitte in 40°C warmes destilliertes Wasser, um eine vollständige Streckung und Entfaltung zu gewährleisten und die Schnitte glatt auf einen Objektträger aufziehen zu können. Im Anschluss wurden die Gewebeschnitte durch 24-stündige Inkubation bei 40°C auf den Objektträgern fixiert.

Tab. 6: Anfertigung von Schnitten

Vorgang	Zeit
5 µm Schnitte mit Rotationsmikrotom	-
40° Wasser in Tissue Flotation Bath	2-3min
Aufbringen auf Objektträger	-
Fixierung bei 40°	24h

Tab. 7: Übersicht Materialien 1

Material	Artikelbezeichnung/Hersteller
Biopsie- bzw. Einbettungskassette	M491-2-Histosette™; Simport, Beloeil, Kanada
Ethanol	Sigma Aldrich Chemie GmbH; Steinheim, Deutschland
Zedernholzöl	Merck; Darmstadt, Deutschland
Paraffin	Vogel, Gießen, Deutschland
Rotationsmikrotom	RM2055, Leica Microsystems; Bensheim, Deutschland
Mikrotomklinge	S35, Feather Safety Razer Co.; Osaka, Japan
Objektträger	Menzel Gläser, Superfrost Plus; Braunschweig, Deutschland
Wasserbad	Tissue Flotation Bath TFB45, Medite; Nunningen, Schweiz

3.6 Histologische Färbung

3.6.1 Allgemeines zur Immunhistochemie

Das Prinzip einer histologischen Färbung besteht darin, bestimmte Strukturen des gefärbten Präparates sichtbar zu machen. Je nach ausgewählter Methode fungiert ein anderer Farbstoff als Färbemittel und gegebenenfalls auch ein anderer Gewebeanteil als Zielstruktur. Beispiele sind die Hämatoxylin-Eosin-Färbung als Routinefärbemethode zur Darstellung verschiedenster Gewebeteile, die Elastika-Färbung zur Darstellung von elastischen Fasern, die von Kossa-Färbung zur Darstellung von Kalk oder die Gram-Färbung zur differenzierenden Darstellung von Bakterien.

Eine spezielle Methode der histologischen Färbung stellt die in dieser Arbeit verwendete Immunhistochemie dar, welche sich die Bindung eines Antikörpers an ein bestimmtes Antigen bzw. Protein im zu untersuchenden Gewebe zu Nutze macht. Somit können im Rahmen dieser Methode nicht nur Strukturen eines Präparats wie elastische Fasern oder Kalk, sondern auch bestimmte Eigenschaften einer Zelle sichtbar gemacht werden. In unserem Fall die Exprimierung von CD44 am Zellkern.

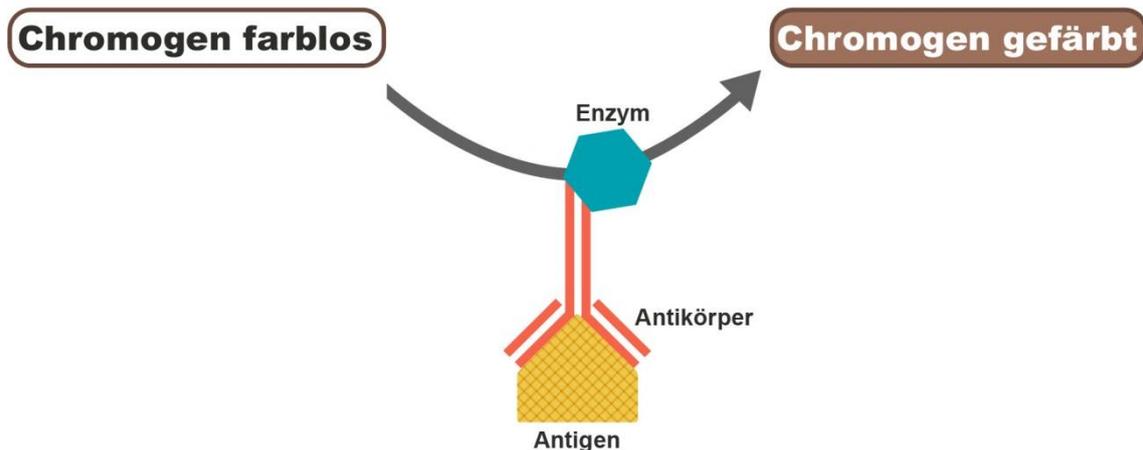


Abb. 4: direkte Methode der Immunhistochemie (Selbstentwurf)

Ein enzymgekoppelter Antikörper bindet durch eine Antigen-Antikörperreaktion spezifisch an ein bestimmtes Epitop. Nach Zugabe eines Chromogens (Substrat) kommt es zur Enzym-Substrat-Reaktion am gebundenen Antikörper und

das Chromogen ändert sein Farbspektrum (Abb. 4). Somit kann das Epitop im Anschluss an dieses Verfahren lichtmikroskopisch detektiert werden. Ein wichtiger Faktor für die Qualität und Aussagekraft der Färbung ist eine hohe Affinität und Spezifität des Antikörpers zu dem nachzuweisenden Protein.

Die hier beschriebene direkte Methode kam in der vorliegenden Arbeit nicht zur Anwendung, vielmehr wurde eine spezielle Form der indirekten Immunhistochemie, die Streptavidin-Biotin-Methode, genutzt.

3.6.2 Die Streptavidin-Biotin-Methode

Der Hauptunterschied zwischen der indirekten und der direkten Immunhistochemie besteht in der Anzahl der verwendeten Antikörper. Bei der indirekten Methode kommen zwei Immunglobuline zum Einsatz. Im ersten Schritt bindet ein Primärantikörper an das nachzuweisende Epitop. Im Anschluss daran bindet ein enzymgekoppelter Sekundärantikörper an den Primärantikörper. Primär- und Sekundärantikörper müssen dabei gegen Globuline derselben Spezies gerichtet sein.

Der Sekundär- oder auch Brückenantikörper ist mit Biotin, einem wasserlöslichen Vitamin gekoppelt. Das Biotin stellt dabei die Verbindung zum der Methode namensgebenden Avidin-Biotin-Komplex dar. Bei dem 68 kDa schweren Avidin handelt es sich um ein Glykoprotein mit vier Bindungsstellen für Biotin (Tetramer). Statt des aus Hühnereiweiß erzeugten Avidin, kommt mittlerweile Streptavidin zum Einsatz, welches aus dem Bakterium *Streptomyces avidinii* isoliert und gentechnisch produziert werden kann. Der zweite Bestandteil des Komplexes ist HRP-gekoppeltes Biotin (Abb. 5). Das Enzym Meerrettich (horseradish)-Peroxidase (HRP) sorgt durch die Umsetzung eines Chromogens für die eigentliche Färbung, als Chromogen fungierte im Rahmen dieser Arbeit 3,3'-Diaminobenzidin (DAB).

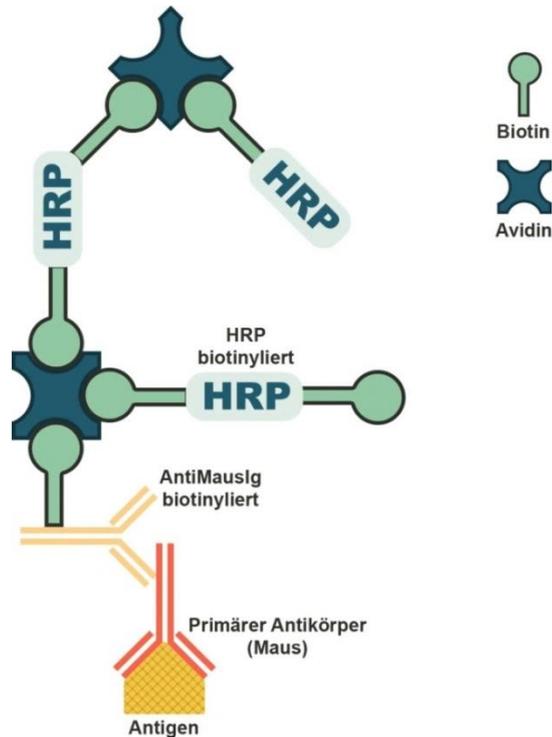


Abb. 5: der Avidin-Biotin-Komplex (Selbstentwurf)

Ein Vorteil der Streptavidin-Biotin-Methode ist eine verbesserte Signalstärke, die durch zwei Faktoren zustande kommt. Zum einen können an einen Primärantikörper mehrere Sekundärantikörper binden. Zum anderen binden wegen des zwischengeschalteten Avidin drei oder mehr Biotin-Moleküle mit der für die eigentliche Substratreaktion verantwortlichen HRP an den Sekundärantikörper (Abb. 5).

Ein Nachteil der indirekten Methode besteht in der Möglichkeit der direkten Bindung des Sekundärantikörpers an Strukturproteine der Probe, wodurch falsch positive Ergebnisse erzielt werden.

Durch die Zugabe von Normalserum auf das Präparat vor der Antikörperapplikation können potentielle unspezifische Bindungsstellen mittels Absättigung von elektrostatischen Ladungen blockiert werden. Dadurch können die folgenden Antikörper vermehrt spezifische Bindungen bilden und die Sensitivität der Methode wird gesteigert. Bei dem Normalserum handelt es sich um Serum einer Tierart, die nicht mit dem hier nachzuweisenden, menschlichen Antigen immunisiert wurde, in diesem Fall Ziegenserum.

3.6.3 Verwendete Antikörper

CD44std

Monoklonaler IgG Antikörper, Clone SFF-2 mouse (Bender, Vienna, Austria) in der Verdünnung 1:100 in Antibody Diluent.

CD44v5

Monoklonaler IgG Antikörper, Clone VFF-8 mouse (Bender, Vienna, Austria) in der Verdünnung 1:50 in Antibody Diluent.

CD44v6

Monoklonaler IgG Antikörper, Clone VFF-18 mouse (Bender, Vienna, Austria) in der Verdünnung 1:100 in Antibody Diluent.

Tab. 8: Übersicht Primärantikörper

Antikörper	Spezies	Clone	Verdünnung
CD44std	Maus	SFF-2	1:100, Antibody Diluent
CD44v5	Maus	VFF-8	1:50, Antibody Diluent
CD44v6	Maus	VFF-18	1:100, Antibody Diluent

Tab. 9: Übersicht Sekundärantikörper

	Sekundärantikörper	Verdünnung	Hersteller
CD44std	Anti-Mouse IgG	1:200, PBS	Vector Laboratories, Inc. Burlingame
CD44v5	Anti-Mouse IgG	1:200, PBS	Vector Laboratories, Inc. Burlingame
CD44v6	Anti-Mouse IgG	1:200, PBS	Vector Laboratories, Inc. Burlingame

Die Verdünnung von Normalserum, Sekundärantikörper und Peroxidase-Streptavidin Komplex erfolgte in phosphatgepufferter Salzlösung (phosphate buffered saline, PBS).

3.6.4 Färbeprotokolle

Die immunhistochemische Färbung benötigt insgesamt zwei Färbetage.

3.6.4.1 Tag 1

- 1) Inkubation der Präparate bei 60°C
- 2) Waschen in 4 Xylol Bädern
- 3) Waschen in einer absteigenden Alkoholreihe (100%, 100%, 96%, 96%, 80%, 70%, 50% Ethanol)
- 4) Waschen in zweifach destilliertem Wasser
- 5) Antigendemaskierung durch Dampfzaren in Citratpuffer pH 6
- 6) Stoppen der Reaktion durch Spülen mit Leitungswasser
- 7) Waschen mit TBS-HCL + Tween
- 8) Waschen in zweifach destilliertem Wasser
- 9) Blockierung der endogenen Peroxidase durch Inkubation in Wasserstoffperoxid (H₂O₂) 3%
- 10) Waschen mit TBS-HCL + Tween
- 11) Blockierung unspezifischer Bindungen durch Inkubation in Normalse-
rum
- 12) Aufbringen des Primärantikörpers
- 13) Aufbewahrung über Nacht bei 4°C

Tab. 10: Färbeprotokoll Tag 1

Vorgang	Zeit
Inkubation bei 60°	30 min
Xylol-Bad	4x 5 min
absteigende Alkoholreihe	Je 2 min
Aqua Bidest	2x 2 min
Citratpuffer pH 6	10 min
Leitungswasser	kurz
TBS-HCL + Tween	2x 5 min
Aqua Bidest	5 min
H ₂ O ₂ 3%	15 min
TBS-HCL + Tween	5 min
Normalserum (Goat) 1:50	30 min
Primärantikörper	Über Nacht

3.6.4.2 Tag 2

- 1) Aufwärmen bei Raumtemperatur
- 2) Waschen mit TBS-HCL + Tween
- 3) Aufbringen des Sekundärantikörpers
- 4) Waschen mit TBS-HCL + Tween
- 5) Zugabe des Peroxidase-Streptavidin Komplexes
- 6) Zugabe des Chromogens 3-3'-Diaminobenzidin im Dunkeln, zur Vermeidung einer falsch-positiven Reaktion
- 7) Waschen in zweifach destilliertem Wasser
- 8) Gegenfärbung der Zellkerne mittels Hämatoxylin
- 9) Bläuen unter fließendem Leitungswasser
- 10) Waschen in einer aufsteigenden Alkoholreihe (50%, 70%, 80%, 96%, 96%, 100%, 100% Ethanol)
- 11) Waschen in 2 Xylol Bädern
- 12) Eindecken der Präparate mittels Vecta Mount Permanent Mounting Medium und Deckgläsern

Tab. 11: Färbeprotokoll Tag 2

Vorgang	Zeit
Aufwärmen bei Raumtemperatur	1 h
TBS-HCL + Tween	2x 5 min
Sekundärantikörper	30 min
TBS-HCL+ Tween	2x 5 min
Peroxidase- Streptavidin Komplex	30 min
TBS-HCL + Tween	2x 5 min
DAB	10 – 30 min
Aqua Bidest	3x 5 min
Hämatoxylin	12 sec
Leitungswasser	3 min
Aufsteigende Alkoholreihe	Je 30 sec
Xylol-Bad	2x 5 min
Eindecken	-

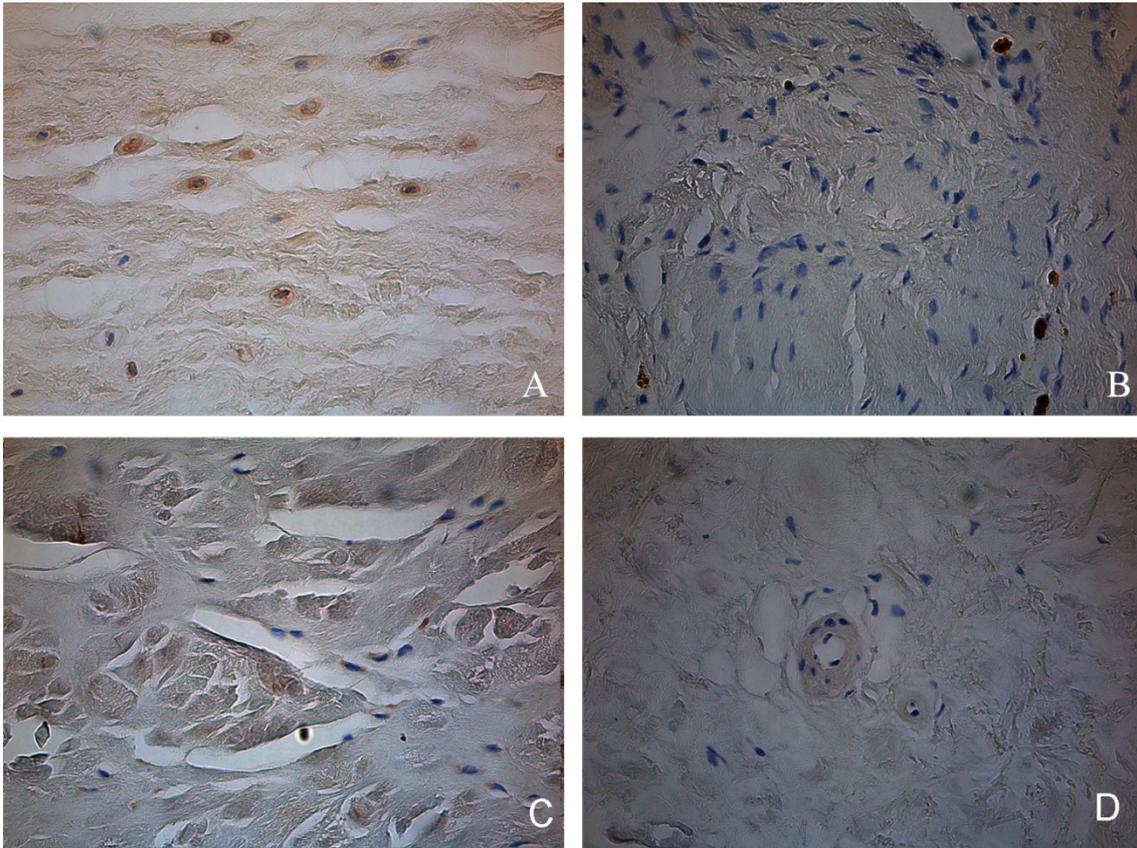


Abb. 6: Antikörperfärbung, Chromogen DAB, 40-fach vergrößert:
A) CD44 B) Kontrollgruppe C) CD44v5 D) CD44v6

Tab. 12: Übersicht Materialien 2

Material	Artikelbezeichnung/Hersteller/Information
Wärmeschrank	
Xylol	Sigma Aldrich Chemie GmbH; Steinheim, D.
Ethanol	Otto Fischar GmbH; Saarbrücken, D.
NaCl	Sigma Aldrich Chemie GmbH; Seelze, D.
Tris-(hydroxymethyl)amminomethan	Acros Organics; Geel, Belgien
HCL	Merck; Darmstadt, D.
Tween	Sigma Aldrich Chemie GmbH; Steinheim, D.
Destilliertes Wasser	Arium 611 VF; Sartorius, Göttingen, D.
Citratpuffer	
Normalserum	
Antibody Diluent	Antibody Diluent with Background Reducing Components; Dako, Carpinteria, USA
Peroxidase	
Alkalische Phosphatase	
Streptavidin	Vector Laboratories, Inc. Burlingame, USA
DAB	Dako, Hamburg, Germany, REAL Detection System Peroxidase/DAB+
Hämatoxylin	
Eindeckkleber	Vecta Mount Permanent Mounting Medium
Eindeckgläser	Menzel-Gläser, 24x40 mm, Menzel GmbH, Braunschweig, D.

3.6.5 Herstellung TBS-HCL-Tween

Bei TBS-HCl + TWEEN handelt es sich um eine Pufferlösung mit zugesetzten Detergenzien. TBS steht für tris-buffer saline und wird als zehnfach konzentrierte 0,5 mol/l Lösung hergestellt aus

- 53,0g NaCl
- 12,0g C₄H₁₁NO₃ (Tris(hydroxymethyl)amminomethan)
- 375ml 1N Salzsäure (HCl)

Die entstandene Lösung wird mit aqua bidest auf 1000 ml verdünnt und auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt. Als Gebrauchslösung diente die einfach konzentrierte 0,05 M Lösung, die durch eine Verdünnung 1:10 mit aqua bidest angefertigt wurde. Mit dieser Lösung werden nicht oder unspezifisch gebundene Antikörper ab gespült, um danach eine spezifische Antikörperbindung zu erreichen. Die Effizienz des einfach konzentrierten Puffers wurde durch die Zugabe von 1 ml Tween 20 erhöht. Dieses Detergens stabilisiert die Proteine, erhöht die Waschkraft der Pufferlösung und reduziert somit eine störende Hintergrundfärbung.

3.6.6 Herstellung PBS

Engl. phosphate buffered saline für phosphatgepufferte Salzlösung aus

- 8,0g/l NaCl
- 0,2g/l KaCl
- 1,16 g/l Na₂HPO₄
- 2 H₂O
- 0,2 g/l KH₂PO₄

Diese 0,15 mol/l Lösung wird mit HCl auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt.

3.7 Auswertung

Die Auswertung aller gefärbten Schnitte erfolgte mit Hilfe des Digitalmikroskops Leica DM 5000 und der zugehörigen Analyse-Software Quips Version (Leica, Bensheim, Germany) bei 40-facher Vergrößerung. Es erfolgte sowohl eine quantitative als auch eine qualitative Bewertung aller Schnitte. Zur quantitativen Bewertung wurden nach einer überblickenden Musterung des gesamten Präparats in jedem Präparat je zehn repräsentative Bereiche mit einer hohen Zellkerndichte als Auswertungsort bestimmt. In diesen, durch die vierzig-fache Vergrößerung in seiner Größe fest definierten Arealen, wurde die Anzahl der Antikörper-positiven Zellen bestimmt und ein Mittelwert der zehn Zählungen gebildet. Die qualitative Bewertung gelang durch den Quotienten aus Antikörper-positiven Zellen und Gesamtzellzahl (Antikörper-positive + Antikörper-negative) im jeweiligen Bereich und Bildung des Mittelwertes aus allen zehn Quotienten.

3.8 Statistik

Für die deskriptive Beschreibung der Verteilung wurde der Median, das .25- und .75-Quantil sowie das Minimum als auch das Maximum angegeben. Für die Vergleiche der Variablen LF-Dicke, mCSA und die CD44-Varianten zwischen der Hypertrophie- und Kontrollgruppe wurden der nicht-parametrische Mann-Whitney-U-Test und der Chi²-Homogenitätstest-Test für das Geschlecht angewendet. Der Einfluss der LF-Dicke auf mCSA wurde mittels einer linearen Regression gerechnet. Die Heteroskedastizität sowie die Normalverteilung der Residuen wurden hierbei überprüft und haben die Voraussetzungen an die lineare Regression erfüllt. Für den Einfluss des prozentualen Anteils positiver Zellen der CD44-Varianten wurde jeweils eine univariate logistische Regression gerechnet und der Odds Ratio mit 95%-Konfidenzintervall angegeben. Der Odds Ratio bezieht sich dabei für CD44 und CD44v5 auf eine Änderung von 10% und bei CD44v6 auf 1%. Die statistische Analyse erfolgte mit R (Version 3.0.2), den R-Paketen rms (Version 4.0-0) und ggplot2 (Version 0.9.3.1). Es wurde zweiseitig getestet und das Signifikanzniveau auf 5% festgelegt.

4 Ergebnisse

Durch die dargestellten Ein- und Ausschlusskriterien ergab sich auf Seiten der Interventionsgruppe ein Kollektiv von 38 Patienten, dem gegenüber fanden 12 Patienten Einschluss in die Kontrollgruppe.

Tab. 13: deskriptive Statistik

		Median	Min	Q25	Q75	Max
Alter [Jahre]	Hypertrophie-Gruppe	67,50	50,00	58,00	73,00	85,00
	Kontrollgruppe	44,50	20,00	35,00	61,50	83,00
LF-Dicke [mm]	Hypertrophie-Gruppe	5,85	4,80	5,33	6,78	8,30
	Kontrollgruppe	2,15	1,10	1,75	2,65	3,10
mCSA [mm²]	Hypertrophie-Gruppe	121,00	84,00	99,50	147,75	193,00
	Kontrollgruppe	196,50	149,00	172,00	204,75	245,00
CD44 [% + Zellen]	Hypertrophie-Gruppe	46,63	32,02	43,56	51,94	75,68
	Kontrollgruppe	18,79	7,88	14,89	25,65	40,09
CD44v5 [% + Zellen]	Hypertrophie-Gruppe	55,58	34,08	48,95	62,04	74,58
	Kontrollgruppe	29,61	1,19	22,52	34,72	39,74
CD44v6 [% + Zellen]	Hypertrophie-Gruppe	2,95	0,00	1,45	5,95	22,02
	Kontrollgruppe	2,74	0,00	1,95	3,58	8,33

Median, Minimum, .25-Quantil, .75-Quantil, Maximum

4.1 Radiologische Erhebung

Tab. 14: Patientendaten Bildgebung

Patient	OP	MRT	Segment	Flavum [mm]	mCSA [mm ²]
0VS85	27.11.2009	19.11.2009	L4/5	7,1	97
1JT86	27.11.2009	28.08.2009	L4/5	5,6	193
2EA39	27.11.2009	18.11.2009	L4/5	3,1	149
3TG50	18.12.2009	08.10.2009	L4/5	5,6	177
4RD23	16.12.2009	02.09.2009	L4/5	4,8	158
5IA02	04.02.2010	15.10.2009	L4/5	5,9	120
6MB87	13.01.2010	10.11.2009	L4/5	6,1	103
7WS72	06.01.2010	31.08.2009	L4/5	6,2	99
8FI49	03.02.2010	08.10.2009	L4/5	7,3	103
9JC96	21.01.2010	23.10.2009	L4/5	5,6	101
10HR21	25.01.2010	09.11.2009	L4/5	5,3	163
11IL16	28.01.2010	07.12.2009	L4/5	4,8	183
12WB39	01.02.2010	17.12.2009	L4/5	5,3	138
13HW43	09.03.2010	02.12.2009	L4/5	5,2	88
14AF56	15.03.2010	12.03.2010	L4/5	2	233
15PS77	17.03.2010	26.01.2010	L4/5	5,5	143
16SB44	19.03.2010	17.03.2010	L4/5	6,7	87
17MG56	26.03.2010	26.01.2010	L4/5	8,3	98
18HB13	29.03.2010	26.01.2010	L4/5	6,6	122
19HW41	07.04.2010	07.04.2010	L4/5	1,8	186
20LE05	08.04.2010	07.04.2010	L4/5	5,3	111
21HM72	09.04.2010	07.04.2010	L4/5	7,5	93
22MS71	12.04.2010	17.03.2010	L4/5	5,6	147
23TF42	16.04.2010	16.04.2010	L4/5	1,1	265
24DW93	02.06.2010	06.04.2010	L4/5	6,3	158
25KT88	26.04.2010	07.04.2010	L4/5	2,1	192
26DN83	26.04.2010	24.04.2010	L4/5	2,8	203
27RP48	21.04.2010	05.10.2009	L4/5	5,8	148
28GS13	03.05.2010	16.02.2010	L4/5	7,4	135
29SK21	04.05.2010	06.04.2010	L4/5	2,2	169
30MN60	26.04.2010	17.12.2009	L4/5	1,6	200
31GK73	14.07.2010	07.06.2010	L4/5	2,4	169

Ergebnisse

32GS96	20.05.2010	12.05.2010	L4/5	6,8	119
33HB11	28.06.2010	06.05.2010	L4/5	5,4	173
34MK72	29.06.2010	06.05.2010	L4/5	5,1	113
35HPR56	05.07.2010	12.05.2010	L4/5	6,8	105
36MC64	09.07.2010	23.06.2010	L4/5	4,9	132
37RP54	16.07.2010	09.07.2010	L4/5	5,3	128
38AK18	19.07.2010	09.07.2010	L4/5	5,8	128
39EK55	23.07.2010	07.07.2010	L4/5	4,8	123
40LP92	02.08.2010	27.07.2010	L4/5	7,9	99
41EZ28	30.07.2010	13.07.2010	L4/5	1,6	201
42HG26	11.08.2010	29.06.2010	L4/5	7,2	99
43AW47	11.08.2010	13.07.2010	L4/5	3,8	179
44HG87	16.08.2010	31.05.2010	L4/5	6,1	144
45IB71	16.08.2010	29.06.2010	L4/5	8	84
46OD47	20.08.2010	30.07.2010	L4/5	3	269
47MH72	20.08.2010	06.05.2010	L4/5	5,4	151
48JB55	20.08.2010	03.08.2010	L4/5	5,7	103
49WS28	06.09.2010	04.05.2010	L4/5	6,1	86

Kontrollgruppe, Hypertrophie-Gruppe

Tab. 15: radiologische Erhebung

		Median	Min	Q25	Q75	Max	p-Wert
LF-Dicke [mm]	Hypertrophie-Gruppe	5,85	4,80	5,33	6,78	8,30	< 0,01
	Kontrollgruppe	2,15	1,10	1,75	2,65	3,10	
mCSA [mm²]	Hypertrophie-Gruppe	121,00	84,00	99,50	147,75	193,00	0,01
	Kontrollgruppe	196,50	149,00	172,00	204,75	245,00	

Median, Minimum, .25-Quantil, .75-Quantil, Maximum, p-Wert (Wilcoxon-Test)

Die radiologischen Parameter waren auf Seiten der Experimentalgruppe signifikant verändert. Es zeigte sich eine erhöhte mediane LF-Dicke sowie eine verringerte mediane mCSA gegenüber der Kontrollgruppe. Die radiologische Erhebung ergab für die Kontrollgruppe eine mediane Dicke des Ligamentum flavum von 2,15 mm, im Vergleich zu 5,85 mm in der Hypertrophie Gruppe. Diese Werte stehen der gemessenen Fläche der mCSA diametral entgegen. Für die Kontrollgruppe ergab sich eine mediane mCSA von 196,50 mm², auf Seiten der Hypertrophie-Gruppe zeigte sich diese im Median auf 121 mm² verringert. Es konnte bezüglich der LF-Dicke ein sehr signifikanter sowie bezüglich der mCSA ein signifikanter Unterschied zwischen der Hypertrophie- und der Kontrollgruppe nachgewiesen werden ($p < 0,01$ bzw. $< 0,05$).

Die Abbildungen 7 und 8 stellen als boxplots die jeweilige Verteilung von LF-Dicke und mCSA in beiden Gruppen dar und zeigen, insbesondere im Falle der LF-Dicke, die klare Trennung zwischen den Gruppen sowie den diametralen Gegensatz der beiden Variablen auf.

Der Strich innerhalb der Box beschreibt den Median, obere und untere Begrenzung der Box das 0.75- bzw. 0.25-Quantil. Die Ausdehnung der Box entspricht somit dem Bereich in dem sich die mittleren 50% der Werte befinden.

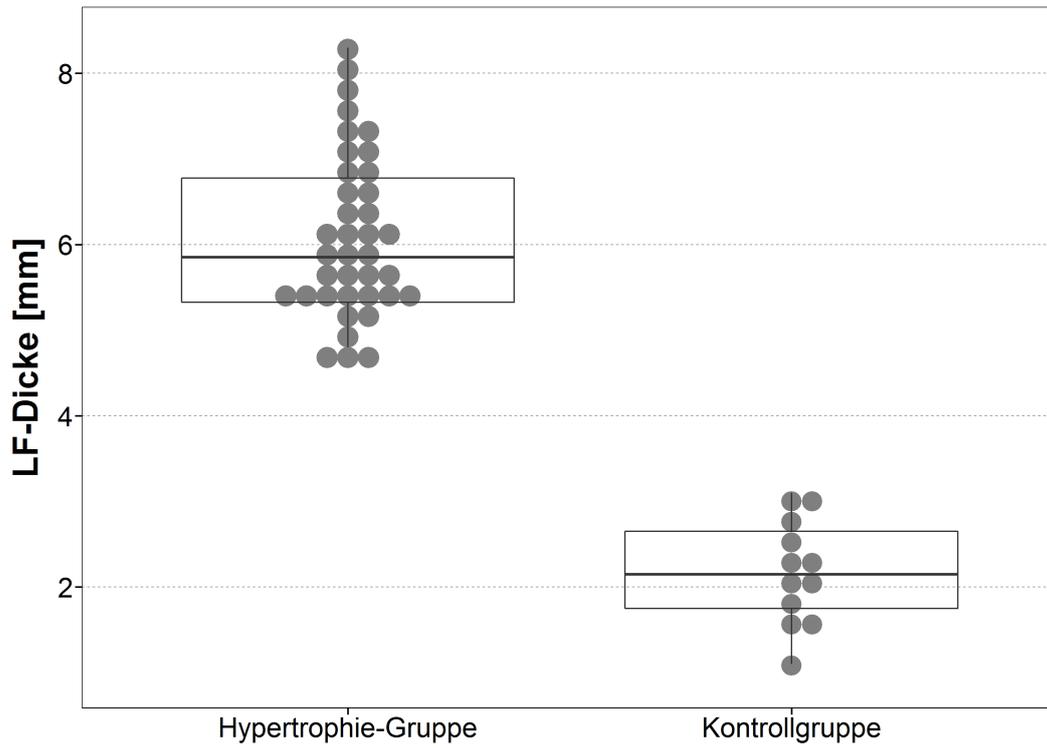


Abb. 7: Boxplot LF-Dicke in beiden Gruppen

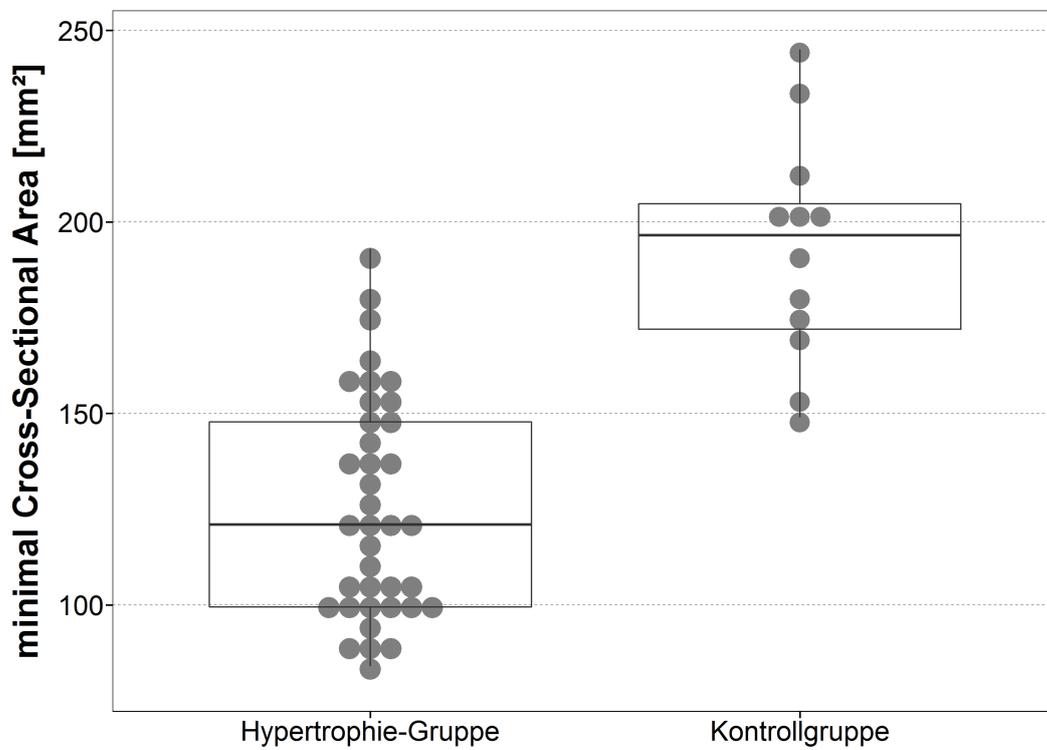


Abb. 8: Boxplot minimal Cross-Sectional Area in beiden Gruppen

Des Weiteren wurde, der vermuteten Pathophysiologie aus LF-Verdickung mit konsekutiver Verringerung der mCSA entsprechend, eine lineare Regression mit mCSA als abhängige Variable und LF-Dicke als unabhängige Variable durchgeführt. Im Gesamten ergab sich ein klarer linearer Zusammenhang zwischen LF-Dicke und mCSA (Tab. 16) sowie abermals eine klare Trennung der Gruppen (Abb. 9).

Tab. 16: lineare Regression LF-Dicke und mCSA

Abh. Variable	Unabh. Variable	Formel	R ²	Rho	P
mCSA	LF-Dicke	$mCSA = 231,58 - 17,48 * LF\text{-Dicke}$	0,65	0,81	< 0,01

R²: Anteil der erklärten Varianz; P: p-Wert zur Modell Anpassungsgüte

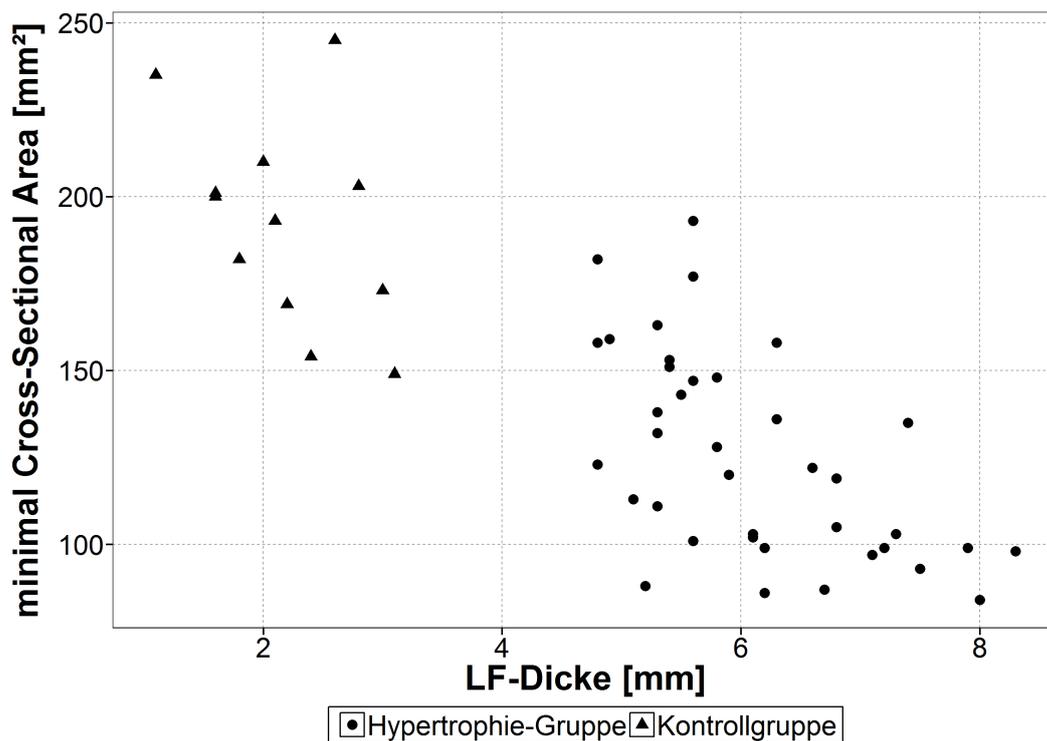


Abb. 9: Scatterplot LF-Dicke versus mCSA

Das Alter als unabhängige Variable bezogen auf beide Faktoren ergibt ein inkongruentes Gesamtbild.

Im Streudiagramm Alter versus LF-Dicke (Abb. 10) ist über alle Patienten hinweg ein leichter linearer Zusammenhang erkennbar. Dieser Einfluss des Alters auf die LF-Dicke ist jedoch innerhalb der beiden einzelnen Gruppen nicht darstellbar, wie die Korrelationsanalyse (Tab.17) zeigt.

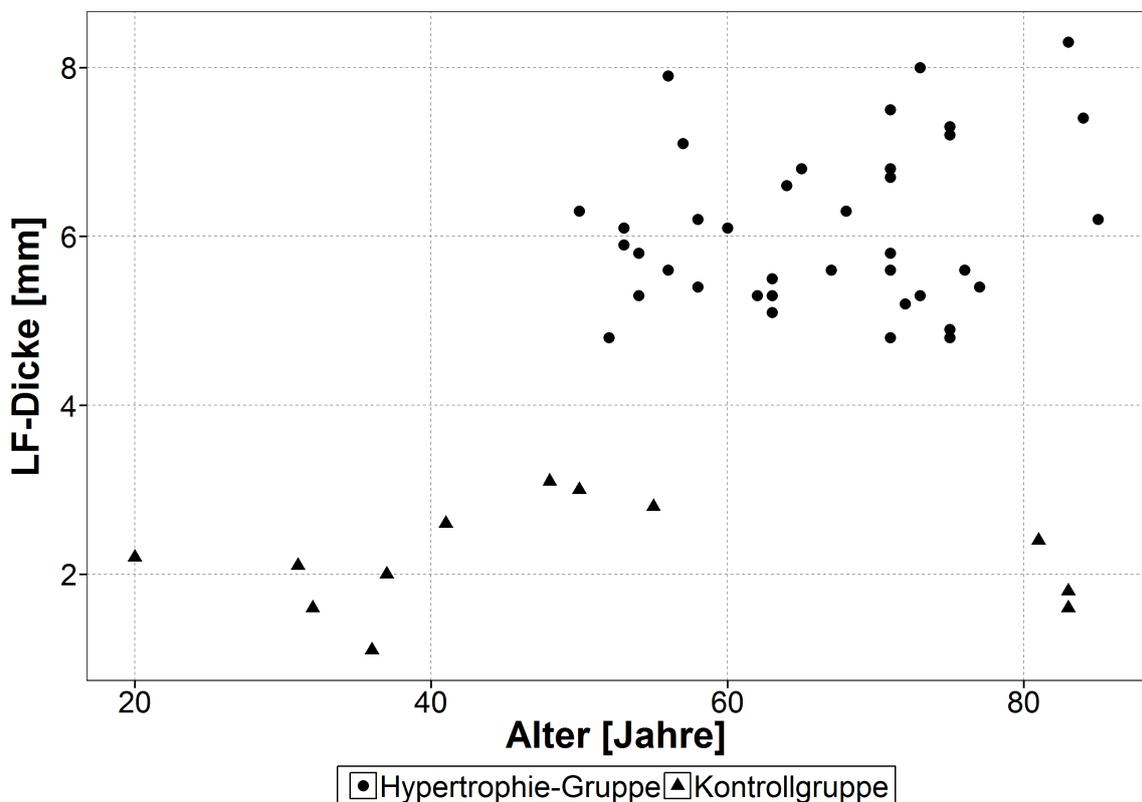


Abb. 10: Scatterplot Alter versus LF-Dicke

Tab. 17: Korrelationsanalyse mCSA, LF-Dicke und Alter

	mCSA	LF-Dicke	Alter
mCSA	1	-0,78**	-0,42**
LF-Dicke		1	0,34*
Alter			1

Oberhalb der Diagonalen Spearmans Rho; * p < 0,05; ** p <0,001

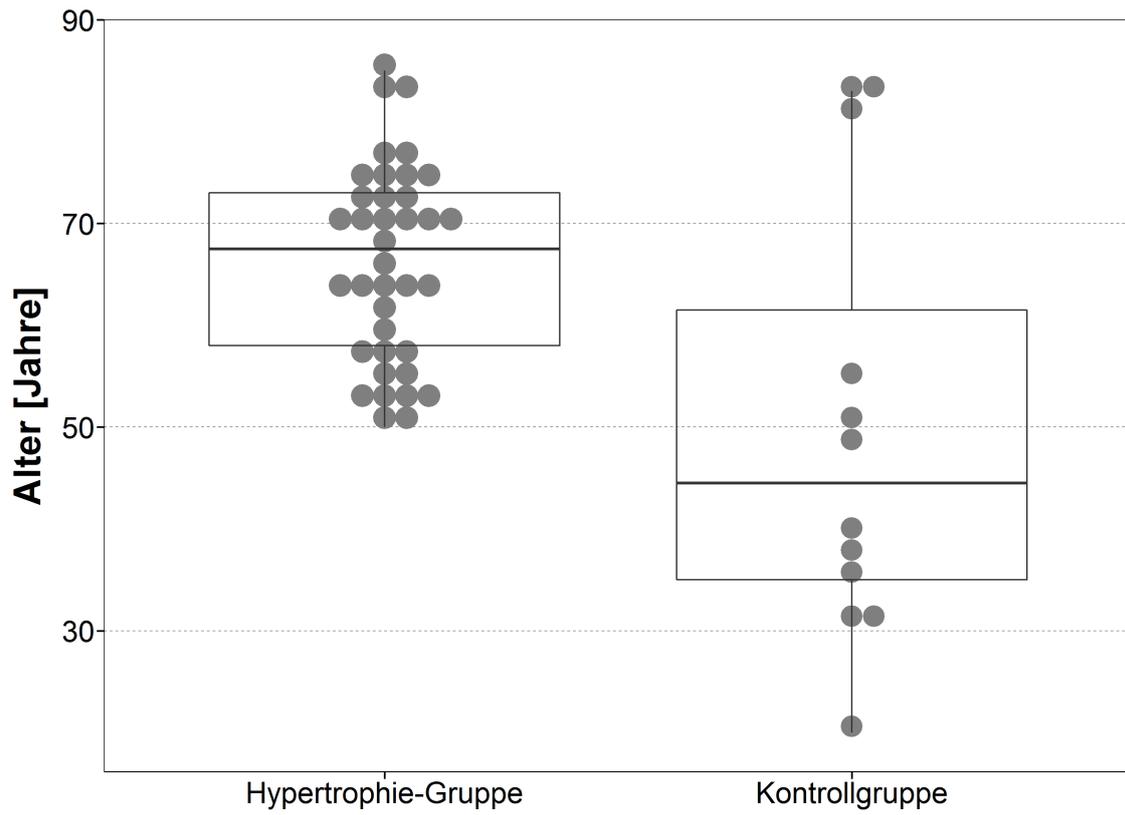


Abb. 11: Boxplot Alter in beiden Gruppen

4.2 Histologie

Tab. 18: CD44-, CD44v5- und CD44v6-Expression (in % positive Zellen)

		Median	Min	Q25	Q75	Max	p-Wert
CD44	Hypertrophie-Gruppe	46,63	32,02	43,56	51,94	75,68	< 0,01
	Kontrollgruppe	18,79	7,88	14,89	25,65	40,09	
CD44v5	Hypertrophie-Gruppe	55,58	34,08	48,95	62,04	74,58	< 0,01
	Kontrollgruppe	29,61	1,19	22,52	34,72	39,74	
CD44v6	Hypertrophie-Gruppe	2,95	0,00	1,45	5,95	22,02	0,74
	Kontrollgruppe	2,74	0,00	1,95	3,58	8,33	

Median, Minimum, .25-Quantil, .75-Quantil, Maximum, p-Wert (Wilcoxon-Test)

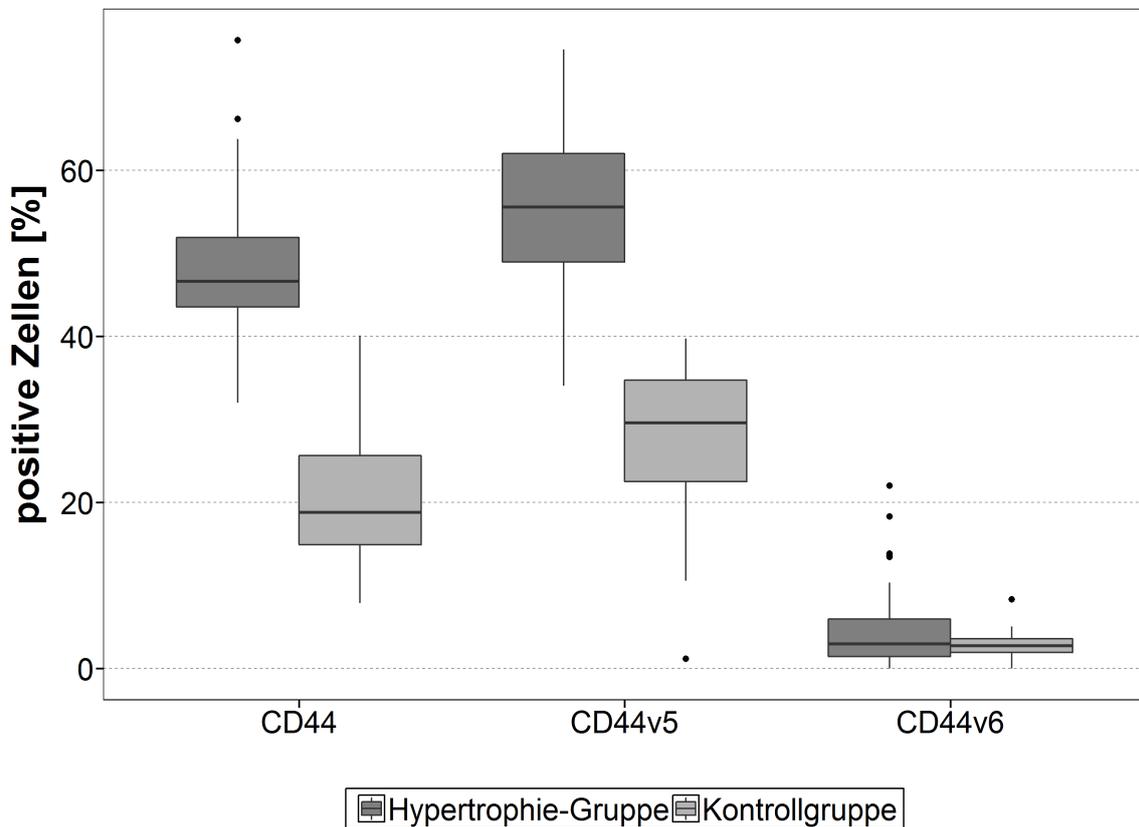


Abb. 12: Boxplot CD44-Varianten versus Gruppe

Der prozentuale Anteil von CD44- und CD44v5-positiven Zellen an der Gesamtzahl aller ausgezählten Zellen war in der Experimental-Gruppe sehr signifikant erhöht gegenüber der Kontrollgruppe (Tab. 18, $p < 0,01$). Im Falle der CD44-Färbung zeigte sich ein Verhältnis von im Median 46,63% positive Zellen in der Hypertrophie-Gruppe im Vergleich zu einem medianen Anteil von 18,79% positiver Zellen in der Kontrollgruppe. Die CD44v5-Färbung ergab auf Seiten der Hypertrophie-Gruppe einen medianen Anteil von 55,58% positiver Zellen im Vergleich zu 29,61% positive Zellen in der Kontrollgruppe. Die CD44v6 Expression war nicht signifikant unterschiedlich (2,95% und 2,74%) und bei beiden Gruppen streng im Bereich der vereinzelt vorkommenden Gefäße im dorsalen Anteil des Ligamentum flavum lokalisiert.

Die Resultate der drei durchgeführten logistischen Regressionen bestätigen das Ergebnis. Der angegebene Odds Ratio bezieht sich bei CD44 und CD44v5 auf eine Änderung von 10% und bei CD44v6 auf eine Änderung auf 1%. D.h. beispielsweise, dass ein 10% höherer Anteil positiver Zellen bei CD44 zu einer 48,32-fach erhöhten Chance auf Hypertrophie führt.

Tab. 19: Quotenverhältnis CD44-Gruppen und Hypertrophie

Abhängige Variable	Unabh. Variable	OR (95%-KI)
Gruppenzugehörigkeit	CD44	48,32 (2,74 – 850,68)
Gruppenzugehörigkeit	CD44v5	66,20 (2,28 – 1924,96)
Gruppenzugehörigkeit	CD44v6	1,11 (0,91 – 1,34)

Gruppenzugehörigkeit: 0: Kontrollgruppe; 1: Hypertrophie-Gruppe

4.3 Demographie

Im demographischen Teil der Ergebnisanalyse wurde zum einen die Geschlechterverteilung zwischen den beiden Gruppen sowie das Geschlecht als Einflussgröße bezüglich aller metrischen Variablen untersucht.

Tab. 20: Geschlechterverteilung zwischen beiden Gruppen

	männlich	weiblich	p-Wert
Hypertrophie-Gruppe	19	19	0,09
Kontrollgruppe	10	2	

Tab. 21: Geschlecht als variable Einflussgröße

		Median	Min	Q25	Q75	Max	p-Wert
LF-Dicke	männlich	5,40	1,10	2,80	6,30	7,50	0,35
	weiblich	5,60	1,60	5,10	6,30	8,30	
mCSA	männlich	149,00	86,00	105,00	173,00	245,00	0,19
	weiblich	120,00	84,00	102,00	151,00	210,00	
CD44	männlich	42,71	7,88	24,36	48,89	75,68	0,15
	weiblich	44,44	21,41	41,54	51,94	66,22	
CD44v5	männlich	48,24	1,19	34,08	56,38	70,16	0,10
	weiblich	56,13	24,41	46,77	61,72	74,58	
CD44v6	männlich	2,56	0,00	1,39	5,03	22,02	0,54
	weiblich	2,74	0,00	1,95	3,58	8,33	

Zum einen ergab sich keine signifikante Korrelation bezüglich des Geschlechts und der Gruppenzugehörigkeit, auch wenn sich im Falle der Kontrollgruppe die Verteilung deutlich zu Gunsten des männlichen Geschlechts darstellt (Tab. 20). Darüber hinaus ergab sich keine Korrelation zwischen Geschlecht, LF-Dicke, mCSA, CD44- und CD44v5-Expression (Tab. 21).

4.4 Zusammenfassung der Ergebnisse

Tab. 22: schließende Statistik

		Median	Min	Q25	Q75	Max	p-Wert
LF-Dicke [mm]	Hypertrophie-Gruppe	5,85	4,80	5,33	6,78	8,30	< 0,01
	Kontrollgruppe	2,15	1,10	1,75	2,65	3,10	
mCSA [mm²]	Hypertrophie-Gruppe	121,00	84,00	99,50	147,75	193,00	0,01
	Kontrollgruppe	196,50	149,00	172,00	204,75	245,00	
CD44 [% + Zellen]	Hypertrophie-Gruppe	46,63	32,02	43,56	51,94	75,68	< 0,01
	Kontrollgruppe	18,79	7,88	14,89	25,65	40,09	
CD44v5 [% + Zellen]	Hypertrophie-Gruppe	55,58	34,08	48,95	62,04	74,58	< 0,01
	Kontrollgruppe	29,61	1,19	22,52	34,72	39,74	
CD44v6 [% + Zellen]	Hypertrophie-Gruppe	2,95	0,00	1,45	5,95	22,02	0,74
	Kontrollgruppe	2,74	0,00	1,95	3,58	8,33	

Median, Minimum, .25-Quantil, .75-Quantil, Maximum, p-Wert (Wilcoxon-Test)

Die Patienten der Experimentalgruppe weisen, unabhängig von Alter und Geschlecht, ein signifikant dickeres Ligamentum flavum auf als die Patienten der Kontrollgruppe. Die dadurch verringerte mCSA lässt sich direkt mit dem Ausmaß der LF-Hypertrophie korrelieren und ein linearer Zusammenhang zwischen diesen beiden Faktoren nachweisen. Somit ist eine klare Trennung der beiden Gruppen in Patienten mit und ohne Spinalkanalstenose dokumentiert. Im Ligamentum flavum der Patienten mit lumbaler Spinalkanalstenose lässt sich, ebenfalls geschlechtsunabhängig, eine signifikant erhöhte Expression der Oberflächenrezeptoren CD44 und CD44v5 nachweisen. Für CD44v6 gilt dies nicht.

5 Diskussion

5.1 Diskussion der Ergebnisse

Zunächst galt es, die Hypothese einer Ligamentum flavum Hypertrophie als wichtiger Faktor in der Genese der lumbalen Spinalkanalstenose zu überprüfen und ggfs. eine Korrelation zwischen Dicke des Ligamentum flavum und der mCSA nachzuweisen.

Die Analysen der MRT-Aufnahmen im Rahmen dieser Studie ergaben eindeutige Ergebnisse. Wir konnten zeigen, dass die radiologischen Parameter auf Seiten der Experimentalgruppe signifikant verändert waren. Es konnte gegenüber der Kontrollgruppe eine erhöhte mediane LF-Dicke sowie eine verringerte mediane mCSA erhoben werden. Die radiologische Bestimmung ergab für die Kontrollgruppe eine mediane Dicke des Ligamentum flavum von 2,15 mm, im Vergleich zu 5,85 mm in der Experimentalgruppe. Diese Werte stehen der gemessenen Fläche der mCSA diametral entgegen. Für die Kontrollgruppe ergab sich eine mediane mCSA von 196,50 mm², auf Seiten der Experimentalgruppe zeigte sich diese im Median auf 121 mm² verringert. Es konnte bezüglich der LF-Dicke ein sehr signifikanter sowie bezüglich der mCSA ein signifikanter Unterschied zwischen der Hypertrophie- und der Kontrollgruppe nachgewiesen werden ($p < 0,01$ bzw. $< 0,05$). Darüber hinaus ergab sich eine lineare Korrelation zwischen der Dicke des Ligamentum flavum und der mCSA.

Bezüglich des Stellenwertes der Ligamentum flavum Hypertrophie im Rahmen der Ätiologie einer lumbalen Spinalkanalstenose besteht in der Literatur Konsens. Auch wenn die lumbale Spinalkanalstenose als eine multifaktorielle Erkrankung anzusehen ist und eine Einengung der Cauda equina laut verschiedenster Autoren sowohl auf knöcherner als auch bindegewebliche Veränderungen zurückzuführen ist [99, 106, 127], stellt das Ligamentum flavum eine zentrale Struktur im pathophysiologischen Prozess dar. 1931 zeigten Towne et al. anhand zweier case reports die Wichtigkeit dieser Bandstruktur auf [131]. Bei beiden Patienten konnte durch Entfernen des verdickten Ligamentum flavum eine komplette Remission der Symptome erzielt werden. Allerdings blieb den

Autoren die Ätiologie der Verdickung unbekannt. Neuere Untersuchungen kommen zu vergleichbaren Ergebnissen. Sowohl Sakamaki et al. als auch Abbas et al. konnten mittels MRT-Bildgebung in Bezug auf die Dicke des Ligamentum flavum klare Unterschiede zwischen Patienten mit und ohne lumbaler Spinalkanalstenose feststellen. Die Verdickung des Ligamentum flavum auf Seiten der Patienten mit lumbaler Spinalkanalstenose zeigte sich geschlechtsunabhängig, aber abhängig vom Alter der Patienten [1, 113]. Die Frage, ob eine Verdickung des Ligamentum flavum auf eine direkte Hypertrophie des Bandes oder nur auf eine Pseudohypertrophie durch Vorwölbung zurückzuführen ist, wird von einzelnen Autoren kontrovers diskutiert. Am Anfang der Entstehung einer spinalen Enge steht eine durch Bandscheibendegeneration bedingte Höhenminderung, die eine vermehrte Laxizität des Bandapparates zur Folge hat. Laut Altinkaya et al. und Postacchini et al. kann in Folge der verringerten Spannung eine Einengung des Spinalkanals nur mittels Vorwölbung des Ligamentum flavum ausgelöst werden [4, 103]. Allerdings formulierten Postacchini et al. nur eine vage Vermutung anhand der Untersuchung eines sehr kleinen Kollektivs von 10 LSS-Patienten. Altinkaya et al. schlossen zwar 224 Patienten in ihre Studie ein, erfassten aber magnetresonanztomographisch insgesamt 896 LF-Dicken von L2 bis S1, ohne den Fokus auf die für die Pathogenese der lumbalen Spinalkanalstenose wichtigen Segmente L3/4 und insbesondere L4/5 zu legen. Die Autoren konnten mittels MRT-Untersuchung eine Hypertrophie des LF mit dem Grad der Bandscheibendegeneration korrelieren und folgerten daraus, dass eventuell eine Pseudohypertrophie vorliegen könne. Es erfolgte keine weitere intraoperative oder histologische Analyse. Auch steht die These der Korrelation zwischen Bandscheibendegeneration und LF-Dicke im Gegensatz zu Erkenntnissen von Park et al. [99]. Erwiesen ist allerdings, dass eine der Höhenminderung folgende Instabilität zwangsläufig zu strukturellen Umbauprozessen und einer Hypertrophie des Ligamentum flavum führt [76], weswegen über eine Verdickung als endgültigem Auslöser der Hypertrophie in der Literatur Konsens besteht [50, 68, 102]. Bezüglich Diagnostik und eventueller präoperativer Quantifizierung des Schweregrades einer lumbalen Spinalkanalstenose mittels Bildgebung, beispielsweise durch die mCSA, existieren verschiedene

Ansätze. Die Erfassung der charakteristischen klinischen Symptome der Claudicatio spinalis ist ein wichtiger Baustein und deren Korrelation mit den angewandten radiologischen Parametern essentiell, um Sensitivität und Spezifität zu überprüfen. Hall et al. konnten anhand einer Verlaufsbeobachtung bei 68 Patienten feststellen, dass Beinschmerzen bei fast allen Betroffenen (93%) auftraten, bei zwei Dritteln (68%) waren beide Beine betroffen. Die Mehrzahl der Betroffenen (63%) litt an Parästhesien und Dysästhesien und knapp die Hälfte (43%) beklagten Gangunsicherheit und ein Schwächegefühl in den Beinen. Rückenschmerzen traten zwar bei zwei Dritteln (65%) der Betroffenen auf, waren aber meist von geringer Intensität [42, 96]. Diese Symptome führen bei den Patienten zu einer schmerzbedingten Gehstreckenverkürzung [104]. Durch körperliche Belastung oder durch Einnehmen der Auslöseposition lassen sich die Symptome in der klinischen Untersuchung reproduzieren. Typische Untersuchungsbefunde sind laut Katz et al. ein breitbasiger Gang, ein positiver Rombergtest oder Oberschenkelschmerzen nach 30 Sekunden langer Extension der Lendenwirbelsäule in aufrechter Haltung [61, 96]. Mittels Anamnese und Klinik lässt sich somit die Diagnose stellen. Durch Multimorbidität und Äußerungsschwierigkeiten im Alter kann die Diagnosefindung allerdings erschwert sein [96], wodurch der Bildgebung ein höherer Stellenwert zukommt. Verschiedene Autoren konnten die MRT als Goldstandard für die Diagnose der lumbalen Spinalkanalstenose ermitteln. Bischoff et al. verglichen 1993 in einer retrospektiven Studie an 57 Patienten deren intraoperative Befunde mit dem präoperativ mittels Computertomographie, Magnetresonanztomographie und Myelographie erhobenen Ausmaß. In Zusammenschau aus Genauigkeit, Sensitivität und Spezifität der Untersuchung sowie Belastung des Patienten durch Strahlen oder untersuchungsbedingte invasive Maßnahmen kamen die Autoren zu dem Schluss, dass die Bildgebung mittels MRT zu bevorzugen sei [9]. Andere Autoren kamen zu vergleichbaren Ergebnissen [95, 114]. Als radiologischen Parameter für die Visualisierung einer spinalen Enge legten Verbiest et al. den mediosagittalen Durchmesser des Duralsacks fest [134]. Jones et al. konnten jedoch weder für den sagittalen und den interpedikulären Abstand noch für das Spinalkanal-Wirbelkörper-Verhältnis eine Korrelation zum Einengungsgrad

nachweisen [55]. Verschiedene Autoren postulierten die in der Transversalebene gemessene Gesamtfläche des Duralsacks als geeignetste Nachweismethode [36, 51, 119], idealerweise nicht nur mittels CT, um eine Einengung durch Weichteilgewebe nicht unberücksichtigt zu lassen. Ob nun die minimal Cross-Sectional Area direkt mit dem Schweregrad der klinischen Symptome der Spinalkanalstenose korreliert, wird unterschiedlich bewertet. Moon et al. verglichen die mittels Laufband ermittelten maximalen Gehstrecken von 35 LSS-Patienten mit deren radiologischen Befunden. Sie konnten keine Korrelation zwischen der Laufstrecke und dem Mediosagittaldurchmesser oder der Querschnittsfläche des Duralsacks nachweisen [87]. Auch Zeifang et al. konnten keinen Zusammenhang zwischen Gehstrecke und Duralsackdurchmesser erkennen [139] und Sirvanci et al. konnten keine Korrelation zwischen der dural Cross-Sectional Area und dem Oswestry Disability Index aufzeigen [121]. Dem gegenüber stehen Erkenntnisse von Ogikubo et al.: Die Autoren konnten in einer aufwendigen Studie eine direkte Korrelation zwischen der mCSA des Duralsacks und klinischen Symptomen nachweisen. Die Untersucher erfassten, im Gegensatz zu Moon et al., Zeifang et al. und Sirvanci et al., alle wichtigen klinischen Parameter in einer Studie. Dies waren die Laufstrecke, der subjektive Schmerzgrad sowie die schmerzadaptierte Lebensqualität der Patienten. Sie stellten fest, je geringer die mCSA, desto stärker der Schmerz, kürzer die Laufstrecke und schlechter die Lebensqualität [97]. Vergleichbare Ergebnisse finden sich bei Kanno et al. [60]. Alles in allem erscheint uns in Zusammenschau der Literatur die magnetresonanztomographisch ermittelte mCSA als Parameter zur Erfassung des Schweregrades einer lumbalen Spinalkanalstenose geeignet. Leider kann anhand der vorliegenden Studie keine Aussage über eine mögliche Korrelation von mCSA und Klinik getroffen werden, da präoperativ keine zwischen den Patienten vergleichbare einheitliche Erfassung der klinischen Symptome erfolgte. Die Etablierung eines suffizienten radiologischen Parameters stellte jedoch kein Ziel der vorliegenden Studie dar, sondern diente vielmehr der klaren Trennung zwischen Experimental- und Kontrollgruppe.

Zur Beantwortung der ersten Fragestellung lassen die Ergebnisse der Studie in Zusammenschau mit der erwähnten Literatur folgende Schlüsse zu: Eine Hy-

hypertrophie des Ligamentum flavum stellt altersunabhängig einen essentiellen Faktor in der Genese der lumbalen Spinalkanalstenose dar. Der Schweregrad der spinalen Einengung lässt sich unter anderem anhand der mCSA im MRT quantifizieren. Diese steht in einem direkten linearen Zusammenhang zum Ausmaß der Ligamentum flavum Hypertrophie.

Anschließende Überlegungen bezüglich äußerer und körpereigener Faktoren sowie zellulärer Mechanismen, die sich für die Hypertrophie verantwortlich zeigen, führen zur zweiten und zentralen Fragestellung dieser Dissertationsschrift. Als Folge ergab sich die Hypothese einer veränderten Expression von CD44 und dessen Splice-Varianten CD44v5 und CD44v6 in einem hypertrophierten Ligamentum flavum, wodurch die Studie als erste ihrer Art eine eventuelle Überexpression dieses Oberflächenrezeptors bei Patienten mit lumbaler Spinalkanalstenose in den Fokus stellt.

Es konnte in den entnommenen Bandstrukturen der Hypertrophie-Gruppe eine gegenüber der Kontrollgruppe signifikant erhöhte CD44- und CD44v5-Expression detektiert werden, wohingegen die Expression von CD44v6 nicht signifikant vermehrt war. Es bestand keine Korrelation zwischen dem Patientenalter und der CD44- bzw. CD44v5-Expression.

In der Literatur finden sich vorangegangene Studien, welche eine CD44-Expression allgemein in Sehnen oder die Beteiligung des Rezeptors an Heilungsvorgängen in geschädigten tendinösen oder dermalen Strukturen untersuchten. Favata et al. konnten im Tierversuch eine Beteiligung von CD44 an fibrotischen Regenerationsvorgängen in Sehnen nachweisen, im Gegensatz dazu war die CD44-Expression in fetalen Sehnen mit narbenfreier Heilung verringert [31]. Ansorge et al. verglichen die Sehnenheilung von CD44 knock-out Mäusen mit der von Wildtyp-Mäusen und beschrieben einen klaren Vorteil auf Seiten der genmanipulierten Tiere. Die Autoren stellten fest, dass eine verminderte CD44-Aktivität durch eine reduzierte Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine und ein erhöhtes Hyaluronan Level zu verbesserten Materialeigenschaften führt, woraus sich eine suffizientere Sehnenheilung ergibt [5]. Diese Erkenntnisse stimmen mit vergleichbaren Untersuchungen in anderen Gewe-

ben überein. Hollingsworth et al. untersuchten im Tierversuch an Mäusen die Rolle von CD44 bei der Makrophagenaktivierung im Rahmen einer durch bakterielle Lipopolysaccharide ausgelösten Schleimhautreizung des Respirationstraktes. Dabei ergab sich 24 Stunden nach der Exposition in der bronchioalveolären Lavage der CD44 defizitären Gruppe eine verminderte Zahl von Makrophagen und neutrophilen Granulozyten sowie niedrigere Level an IL-1 β , IL-6, Granulozyten-Kolonie stimulierendem Faktor (G-CSF) und Makrophage Inflammatory Protein 2 (MIP-2). Der Hyaluronangehalt hingegen war gesteigert [49]. Die Rolle der Hyaluronan-CD44-Interaktion ist Gegenstand zahlreicher Untersuchungen. Das Glykosaminoglykan ist für die narbenlose fetale Wundheilung eine entscheidende Struktur der Extrazellulärmatrix. Mast et al. entfernten im Rahmen einer Vergleichsstudie durch *Streptomyces hyaluronidase* die Hyaluronsäure aus dem Wundgewebe ungeborener Kaninchenfeteten. Ergebnis war eine erhöhte Fibroblasten Infiltration, Kollagenablagerung und Kapillarisation des Gewebes, was im Vergleich zur Kontrollgruppe eine insuffizientere narbig-fibrotische Wundheilung zur Folge hatte [83]. Yagishita et al. zeigten, dass sich ein hoher Hyaluronsäurespiegel, erzielt durch eine lokale Injektion, positiv auf die Regeneration von Sehngewebe auswirkt [137], ein hoher Spiegel an CD44 aber zu einer fibrotischen Heilung führt [31]. Analog zu der geringeren Expression von CD44 in fetalen Sehnen weisen diese gegenüber Sehnen erwachsener Patienten einen höheren Gehalt an Hyaluronan auf [63, 124]. CD44 stellt also ein Schlüsselprotein der Hyaluronsäure Homöostase dar [6, 64]. Zum einen ist die Aktivität von Hyaluronidase-1 und -2, den Abbauproteinen des Hyaluronan, abhängig von CD44 [44], zum anderen bindet CD44 direkt Hyaluronsäure und vermittelt deren Aufnahme in die Zielzelle mittels Endozytose und damit den lysosomalen Abbau [20]. Alles in allem scheint ein Zusammenhang zwischen CD44-Expression, Hyaluronanlevel und Narbengewebsbildung in Sehnen und Haut wahrscheinlich.

Im Rahmen der Heilung oder Strukturveränderung von Bändern, insbesondere des Ligamentum flavum, konnten ebenfalls einzelne Faktoren und Rezeptoren detektiert werden. Sairyō et al. konnten eine Überexpression proinflammatorischer Zytokine, COX-2, TNF- α , IL-1 β , IL-8 und IL-15 in normalem und hypertro-

phiertem Ligamentum flavum zeigen und formulierten die Möglichkeit zur Verhinderung der Hypertrophie mittels anti-inflammatorischer Medikation [112]. Die Autoren stellten eine Fibrosierung primär im dorsalen Bereich des Ligaments durch kontinuierliche Traumata fest. Als ein Faktor in der Genese ergab sich eine zu Beginn der Hypertrophie gesteigerte Expression von TGF- β [111]. Weitere Autoren identifizierten TGF- β und genauer TGF- β 1 als einen mittels Modulation der Immunantwort wirkenden Faktor bei Genese und Progress der Banddegeneration [16, 80]. Untersuchungen von Honsawek et al. ergaben eine erhöhte basic fibroblast growth factor (bFGF) Expression in hypertrophiertem Ligamentum flavum [50]. TGF- β 1 und bFGF tragen durch ihre Funktion als fibroblasten- und chondrozytenstimulierende Faktoren entscheidend zur Pathologie der Gewebsfibrose bei [21, 33]. Ferguson et al. detektierten die verschiedenen Expressionslevel der einzelnen TGF- β Gruppen im Rahmen fetaler Wundheilung. Dabei zeigten sich TGF- β 1 und TGF- β 2 erniedrigt, TGF- β 3 dagegen erhöht [32]. Den Zusammenhang zwischen TGF- β Expression und Hyaluronangehalt im Gewebe konnten David-Raoudi et al. aufzeigen. Die Autoren wiesen in vitro eine durch Hyaluronan induzierte Erhöhung der TGF- β 3 und Kollagen Typ III (fetales Kollagen) Expression in humanen Hautfibroblasten nach [24]. Dieser Effekt zeigte sich darüber hinaus abhängig von der Molekularstruktur des Hyaluronan. Native und langkettige Hyaluronsäure (HA-880) löste einen Anstieg von TGF- β 3 und Kollagen Typ III aus, HA-Fragmente (HA-12) hatten auch einen Anstieg von TGF- β 1 und Kollagen Typ I zur Folge. Die Autoren vermuten, dass Hyaluronan unter anderem über TGF- β 3 und Kollagen Typ III eine „fetusähnliche“ Umgebung schafft, mit der Möglichkeit zur narbenfreien Regeneration [24]. Leider findet sich in der Literatur bezüglich einzelner TGF- β Gruppen oder der genauen Interaktionen mit Hyaluronan, keine vergleichbare Untersuchung direkt an Bandstrukturen oder hypertrophiertem Ligamentum flavum. Da aber auch in Bändern die einzelnen TGF- β Untergruppen die gleichen Effekte auf Fibroblasten haben dürften, kann davon ausgegangen werden, dass die beobachteten Expressionslevel größtenteils zwischen den Gewebearten vergleichbar sind. Und auch der in Sehnen und Haut beobachtete Zusammenhang zwischen CD44, Hyaluronangehalt und Narbengewebsbildung scheint auf

Bandstrukturen übertragbar. Somit wäre ein durch CD44 gesteuertes niedriges Hyaluronanlevel über eine hohe TGF- β 1 und - β 2 Expression für eine Fibrosierung des Ligamentum flavum verantwortlich, ein durch CD44 gesteuertes hohes Hyaluronanlevel über eine hohe TGF- β 3 Expression jedoch von Vorteil. Im Widerspruch dazu stehen Erkenntnisse von David-Raoudi et al und Lin et al. David-Raoudi et al. konnten nachweisen, dass durch CD44 hemmende RNA der Effekt der gesteigerten TGF- β 3 Expression verhindert wird [24]. Lin et al. konnten zeigen, dass die Verabreichung von Natrium Hyaluronan in das verbliebene Ligamentum flavum nach Diskektomie das Auftreten von Dura-flavum-Adhäsionen verhindern kann und somit eine Modulation der CD44-Aktivität mittels Hyaluronan möglich erscheint [75]. Es erscheint unklar, ob nun CD44 durch Abbau und Endozytose für die Hyaluronanhomöostase verantwortlich ist, Hyaluronan seine Effekte über Modulation von CD44 vermittelt oder beide Mechanismen zutreffen. Auch die Beteiligung anderer Rezeptoren oder Faktoren steht im Raum.

Ein weiterer zur LF-Hypertrophie beitragender Faktor ist die Expression von Matrixmetalloproteinasen (MMP). MMPs spielen eine Schlüsselrolle bei Abbau von Bestandteilen der Extrazellulärmatrix, interzellulärer Kommunikation, Zellmigration, Tumorwachstum und Angiogenese [3]. Bekannt ist deren Rolle bei Umbauprozessen im Rahmen von Sehnedegenerationen beispielsweise der Rotatorenmanschette [67] oder der langen Bizepssehne [69]. Lakemeier et al. konnten zeigen, dass eine durch VEGF getriggerte Überexprimierung von MMP-1, -3, und -9 unabhängig vom Alter klar mit einer Hypertrophie des Ligamentum flavum korreliert [68], vergleichbare Ergebnisse zeigen sich für MMP-2 und -13 [100]. In vitro kann die MMP Expression durch Zugabe von Hyaluronan mittels CD44 gehemmt werden [56]. Allgemein existiert bezüglich der Degeneration und Regeneration von Bändern weniger Literatur, als dies bei Sehnen oder Haut der Fall ist. Die genauen Mechanismen der CD44-Hyaluronan-Interaktion im Rahmen einer Ligamentum flavum Hypertrophie bedürfen weiterer Forschung und waren nicht Gegenstand der Fragestellungen dieser Dissertationsschrift.

Bei der Frage, welche äußeren oder körpereigenen Einflüsse zu einer erhöhten CD44-Expression und eventuell darüber zu einer Hypertrophie des Ligamentum flavum führen, sind verschiedene Faktoren als ätiologisch wichtig einzustufen. So scheint dauerhafte mechanische Belastung die CD44-Expression zu stimulieren. In aus Rattenschwänzen kultivierten Sehnen-Fibroblasten konnten Crockett et al. sowohl eine um 60% erhöhte Expression an CD44 als auch eine zweifach erhöhte Hyaluronan Expression als Antwort auf zyklische mechanische Belastung finden [18]. Ein anderer wichtiger ätiologischer Faktor ist Interleukin 1 (IL-1). Nach Behandlung mit IL-1 zeigen humane Chondrozyten einen Verlust an Proteoglykanen und eine erhöhte CD44-Expression [93]. Sairy et al. zeigten eine Korrelation zwischen IL-1 Expression und Dicke eines hypertrophierten LF auf [112], King et al. einen Zusammenhang zwischen IL-10 Expression und Hyaluronangehalt [62]. Die Hypertrophie des Ligamentum flavum kann also sowohl Folge mechanischer als auch biochemischer Stimuli sein. Darüber hinaus besteht Evidenz für die Abhängigkeit der CD44-Expression vom Alter der Patienten. Zhou et al. fanden heraus, dass ältere aus Rattenschwänzen gewonnene Stammzellen höhere Level von CD44 exprimieren als jüngere [142]. Das Patientenalter als Einflussgröße ist natürlich auch bei der im Rahmen dieser Dissertationsschrift durchgeführten Studie nicht außer Acht zu lassen. Nichts desto trotz, auch wenn das Patientenalter möglicherweise einen Faktor für die signifikanten Ergebnisse unserer Studie darstellt, sind wir der Meinung, dass es nicht als die alleinige Haupteinflussgröße anzusehen ist, da sich keine signifikante Korrelation zwischen Patientenalter, CD44-Expression und Grad der Hypertrophie finden ließ. Daher bleibt der Grund für die erhöhte CD44-Expression zum jetzigen Zeitpunkt unklar, war aber auch nicht Gegenstand der Fragestellung dieser Dissertationsschrift und gibt Möglichkeit zu weiterführender Forschungsarbeit.

Nun zur genaueren Diskussion der Ergebnisse der einzelnen CD44-Varianten. Eine Erklärung für die erhöhte CD44v5-Expression kann in einer veränderten Liganden-Bindungskapazität der Splice-Variante im Vergleich zur Standardform gesehen werden. In Tumorzellen konnten Sleeman et al. eine Korrelation zwischen erhöhter Expression von CD44v5-v7 auf der Zelloberfläche und erhöhter

Bindungskapazität für lösliches Hyaluronan beobachten [122]. Die Autoren postulierten, dass die Regulation von CD44 durch verschiedene Faktoren wie dem Vorhandensein variabler Exons oder der Glykosilierung vermittelt wird und über diesen Mechanismus den Zellen erlaubt, ihre Hyaluronan-Bindung selbst zu regulieren. Daher sind CD44 Splicevarianten möglicherweise ein Antwortmechanismus auf veränderte äußere Einflüsse. Bekannt ist die CD44v5-Überexpression im Rahmen degenerativer Erkrankungen. Die Splice-Varianten CD44v6-v7, CD44v5-v9 und CD44v2-v10 wurden erstmals von Hale et al. in der Synovialflüssigkeit arthrotisch veränderter Gelenke identifiziert [41]. Im Endstadium der Gonarthrose lässt sich in humanen Knorpel- und Synoviaproben eine Korrelation zwischen der CD44v5-Expression und histologischer Matrix Zerstörung nachweisen [34, 130]. Es besteht allerdings auch ein Zusammenhang zwischen CD44v5-Expression und der entzündlichen Aktivität einer rheumatoiden Arthritis [41, 46]. Und Tibesku et al. konnten im Tierversuch eine Korrelation zwischen CD44v6-Expression der Chondrozyten im hyalinen Knorpel und dem histologisch erfassten Grad der Knorpelschädigung bei Kniegelenksarthrose nachweisen [130]. In weiteren Untersuchungen konnte CD44v6 in Synovial-Fibroblasten von Patienten mit rheumatoider Arthritis und anderen Autoimmunerkrankungen nachgewiesen werden [7, 19, 130]. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass Lymphozytenaktivierung von erhöhten CD44v6 Level begleitet wird [136]. Aufgrund unserer Beobachtung einer CD44v5-Überexpression scheint eine Beteiligung der Splice-Variante an den Umbauprozessen im Ligamentum flavum naheliegend. CD44v5 wird im Rahmen einer LF Hypertrophie synthetisiert und trägt zur Pathogenese der Erkrankung bei. Die Expression von CD44v6 stellte sich sowohl in der Kontroll- als auch der Hypertrophie-Gruppe als niedrig heraus, sodass davon ausgegangen werden kann, dass diese Splice-Variante keine bedeutende Rolle im Rahmen der LF Hypertrophie spielt. In unseren LF Proben war die CD44v6-Expression streng mit Gefäßen innerhalb des Ligamentum flavum assoziiert und kann möglicherweise durch in den Gefäßwänden verbliebene Lymphozyten erklärt werden. Alles in allem scheint der Schwerpunkt der CD44v6-Expression, zumindest was das Ligamentum flavum betrifft, doch eher im Bereich immunologischer statt degenerativer Vorgänge zu

liegen, auch wenn vorangegangene Untersuchungen einen Zusammenhang zur Knorpeldegeneration nachweisen konnten.

Zur Beantwortung der zweiten Fragestellung lassen die Ergebnisse der Studie in Zusammenschau mit der erwähnten Literatur folgende Schlüsse zu. Die Expression von CD44 und dessen Splice-Variante CD44v5 ist unabhängig vom Patientenalter in hypertrophiertem Ligamentum flavum signifikant erhöht gegenüber der Expression ebendieser Faktoren in einer gesunden Bandstruktur. Der Oberflächenrezeptor ist durch die Vermittlung struktureller degenerativer Umbauprozesse des Ligamentum flavum an der Entwicklung einer lumbalen Spinalkanalstenose beteiligt. Es bestehen Hinweise darauf, dass sich aus einer Modulation der CD44-Expression möglicherweise neue therapeutische Optionen im Frühstadium der Spinalkanalstenose ergeben. In dieser Hinsicht können im Zusammenspiel mit zusätzlichem Forschungsaufwand auch die Ergebnisse der vorliegenden Studie hilfreich sein. Als Auslöser der Hypertrophie kommen mechanische und biochemische Stimuli in Betracht. Der genaue Grund für die erhöhte CD44-Expression verbleibt unklar und gibt ebenfalls Möglichkeit zur weiterführenden Forschungsarbeit.

Die vorliegende Studie weist verschiedene Einschränkungen auf. Erstens stellt sich die Kontrollgruppe mit 12 Patienten im Vergleich zur Hypertrophie-Gruppe als eher klein dar. Da das Ziel der Studie in einem Vergleich zwischen hypertrophiertem und normalem Ligamentum flavum bestand, verwendeten wir in der Kontrollgruppe nur Proben von Patienten mit der Indikation zur Nukleotomie ohne sichtbare Zeichen degenerativer lumbaler Wirbelsäulenerkrankungen. Dies stellt eine sehr enge Indikation dar. Zweitens geht die lumbale Spinalkanalstenose mit verschiedenen Graden der Facettengelenksarthrose einher, was möglicherweise die CD44-Expression im Ligamentum flavum beeinflusst. Daher wurden nur Proben aus dem mittleren Bereich des Bandes zwischen den Laminae verwendet. Des Weiteren wurden zur besseren Vergleichbarkeit nur Proben aus dem Wirbelkörpersegment L4/5 entnommen. Drittens liegt ein unterschiedliches medianes Alter in Kontroll- und Hypertrophie-Gruppe vor. Die Pati-

enten der Kontrollgruppe waren im Median 23 Jahre jünger als die der Hypertrophie-Gruppe. Dies mag möglicherweise unsere Ergebnisse zum Teil beeinflusst haben. Da aber insbesondere in der Hypertrophie-Gruppe keine Korrelation zwischen Durchschnittsalter und LF-Dicke nachgewiesen wurde, kann nicht davon ausgegangen werden, dass ein normaler Alterungsprozess die Haupterklärung für die Ergebnisse darstellt. Alter ist als ätiologischer Faktor der Erkrankung bekannt. Allerdings, selbst wenn Alter der primäre Auslöser für die CD44-Überexpression sein sollte, ändert dies nichts am potentiellen Nutzen der Ergebnisse für die zukünftige Behandlung der lumbalen Spinalkanalstenose.

5.2 Schlussfolgerung und Ausblick

Die vorliegende Studie konnte zeigen, dass der Grad der Ligamentum flavum Hypertrophie ein entscheidender Faktor in der Genese einer lumbalen Spinalkanalstenose ist. Die Dicke des Ligamentum flavum korreliert linear mit der Verringerung der minimal Cross-Sectional Area des Duralsacks. Das Ausmaß der LF-Hypertrophie ist unter anderem abhängig von einer vermehrten Expression des Oberflächenrezeptors CD44 und dessen Splice-Variante CD44v5. Die Splice-Variante CD44v6 spielt in diesem Kontext keine Rolle. Die komplexen Mechanismen der Interaktion von CD44 mit seinem Hauptliganden Hyaluronan, sowie anderen an der Hypertrophie beteiligten Proteasen, Proteinen und Entzündungsmediatoren wie MMP, VEGF oder Interleukin konnten im Rahmen dieser Dissertationsschrift nicht allumfassend geklärt werden. Somit kann über die tatsächliche Bedeutung der CD44- bzw. CD44v5-Expression für die LF-Hypertrophie und damit die Ausprägung einer lumbalen Spinalkanalstenose ohne weiterführende Erkenntnisse bezüglich der genauen Interaktion der einzelnen Faktoren auf inter- sowie intrazellulärer Ebene nur gemutmaßt werden. Durch die mittels der vorliegenden Arbeit aufgezeigte sehr hohe Signifikanz ($p < 0,01$) der Erhöhung von CD44- und CD44v5-Expression in hypertrophiertem Ligamentum flavum erscheint jedoch auch eine tatsächliche und signifikante Bedeutung dieses Oberflächenrezeptors für die Genese der Hypertrophie wahrscheinlich. Diese konnte, wie beschrieben, in Sehnenstrukturen bereits nachgewiesen werden. Zur dezidierteren Überprüfung der Hypothese eines ent-

scheidenden Anteils des Oberflächenrezeptors CD44 an der Degeneration von Bandstrukturen und insbesondere des Ligamentum flavum wären beispielsweise gezielte Modulationen des Rezeptors unter Minimierung externer Störeinflüsse mit anschließender Quantifizierung des Degenerationsgrades zielführend. Aus einer solchen Modulation der CD44-Expression ließen sich darüber hinaus möglicherweise neue therapeutische Optionen ableiten. CD44-Antagonisten finden bereits experimentelle Anwendung im Bereich der Progression und Metastasierung von humanen Xenograft-Tumoren [135]. Ansätze zur medikamentösen Hemmung von CD44 erscheinen somit vor dem Hintergrund der aktuellen Ergebnisse vielversprechend. Auswirkungen der selektiven CD44-Inhibition könnten die Bedeutung des Oberflächenrezeptors für die Genese der lumbalen Spinalkanalstenose verifizieren und im Folgenden zur Prävention der lumbalen Spinalkanalstenose eingesetzt werden.

6 Zusammenfassung

6.1 Deutsche Zusammenfassung

Einleitung: Die lumbale Spinalkanalstenose (LSS) stellt die häufigste Indikation für operative Eingriffe im Bereich der Lendenwirbelsäule dar. Die lumbale Einengung des Spinalkanals geht zum überwiegenden Teil auf eine Hypertrophie des Ligamentum flavum (LF) zurück. Trotz zahlreicher vorangegangener Studien sind die zugrundeliegenden pathophysiologischen Mechanismen der Hypertrophie in ihrer Komplexität nach wie vor unbekannt.

Das Ziel dieser experimentellen Studie besteht in der immunhistochemischen Detektion einer eventuell vorliegenden Überexpression von CD44 und seiner Splice-Varianten CD44v5 und CD44v6 in hypertrophiertem Ligamentum flavum bei Patienten mit LSS.

Material und Methoden: 38 Patienten mit LSS wurden im Rahmen einer operativen spinalen Dekompression Proben des LF entnommen. 12 weitere LF-Proben wurden Patienten mit Discusprolaps ohne magnetresonanztomographisch nachweisbare degenerative LSS im Zuge einer Nukleotomie entnommen. Die Proben wurden in Paraffin eingebettet, geschnitten und mittels Antikörpern gegen CD44, CD44v5 und CD44v6 mit DAB gefärbt. Zusätzlich wurde in präoperativ angefertigten T1-gewichteten MRT-Aufnahmen dieser Patienten auf Höhe L4/5 die LF-Dicke sowie die minimal Cross-Sectional Area (mCSA) des Duralsacks bestimmt.

Ergebnisse: Flavum-Dicke, CD44- und CD44v5-Expression waren auf Seiten der LSS-Gruppe signifikant erhöht, die mCSA signifikant verringert. Bezüglich der CD44v6-Expression ließ sich kein Unterschied zwischen beiden Gruppen nachweisen. Es konnte eine Korrelation zwischen LF-Dicke, mCSA, CD44- und CD44v5-Expression nachgewiesen werden.

Schlussfolgerung: Die Entstehung einer LSS beruht auf einer Hypertrophie des LF und ist mit einer Überexpression von CD44 und CD44v5 assoziiert. CD44v6 ist daran nicht beteiligt. Die Studie zeigt einen möglichen molekularen Mecha-

nismus der strukturellen Veränderungen des LF auf, die nicht durch morphologische Merkmale allein erklärbar sind.

6.2 Englische Zusammenfassung

Background: The most common spinal disorder in the elderly is lumbar spinal stenosis (LSS), which results in part from ligamentum flavum (LF) hypertrophy. Although prior histologic and immunochemical studies have been performed in this area, the pathophysiology of loss of elasticity and hypertrophy is not completely understood.

The purpose of this immunohistological study is to elucidate the role of CD44 and its splice variants CD44v5 and CD44v6 in the hypertrophied LF obtained from patients with lumbar spinal stenosis (LSS).

Materials and methods: LF samples of 38 patients with LSS were harvested during spinal decompression. Twelve LF samples obtained from patients with disc herniation and no visible degeneration on preoperative MRI were obtained as controls. Samples were dehydrated and embedded in paraffin. For immunohistochemical determination, slices were stained with antibodies against CD44, CD44v5, and CD44v6 stained with DAB. LF hypertrophy and minimal Cross-Sectional Area (CSA) were measured with T1-weighted MRI.

Results: CD44 and CD44v5 expression were significantly increased in the hypertrophy group. CD44v6 expression was not significantly increased. In the hypertrophy group, LF thickness was significantly increased while CSA was significantly decreased. There was a statistical correlation between LF thickness, mCSA, CD44, and CD44v5 expression in the hypertrophy group.

Conclusions: LF hypertrophy is accompanied by increased CD44 and CD44v5 expression. CD44v6 expression is not enhanced in LF hypertrophy. Our study provides a molecular mechanism for biomechanical changes observed in LSS that are not explained by morphologic characteristics alone.

7 Literaturverzeichnis

1. Abbas J, Hamoud K, Masharawi YM et al. (2010) Ligamentum flavum thickness in normal and stenotic lumbar spines. *Spine (Phila Pa 1976)* 35:1225-1230
2. Airaksinen O, Brox JI, Cedraschi C et al. (2006) Chapter 4. European guidelines for the management of chronic nonspecific low back pain. *Eur Spine J* 15 Suppl 2:S192-300
3. Akhavan MA, Madden L, Buysschaert I et al. (2009) Hypoxia upregulates angiogenesis and synovial cell migration in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 11:R64
4. Altinkaya N, Yildirim T, Demir S et al. (2011) Factors associated with the thickness of the ligamentum flavum: is ligamentum flavum thickening due to hypertrophy or buckling? *Spine (Phila Pa 1976)* 36:E1093-1097
5. Ansorge HL, Beredjikian PK, Soslowsky LJ (2009) CD44 deficiency improves healing tendon mechanics and increases matrix and cytokine expression in a mouse patellar tendon injury model. *J Orthop Res* 27:1386-1391
6. Aruffo A, Stamenkovic I, Melnick M et al. (1990) CD44 is the principal cell surface receptor for hyaluronate. *Cell* 61:1303-1313
7. Baaten BJ, Li CR, Bradley LM (2010) Multifaceted regulation of T cells by CD44. *Commun Integr Biol* 3:508-512
8. Bartolazzi A, Peach R, Aruffo A et al. (1994) Interaction between CD44 and hyaluronate is directly implicated in the regulation of tumor development. *J Exp Med* 180:53-66
9. Bischoff RJ, Rodriguez RP, Gupta K et al. (1993) A comparison of computed tomography-myelography, magnetic resonance imaging, and myelography in the diagnosis of herniated nucleus pulposus and spinal stenosis. *J Spinal Disord* 6:289-295
10. Boakye M, Moore R, Kong M et al. (2013) Health-related quality-of-life status in Veterans with spinal disorders. *Qual Life Res* 22:45-52

11. Bourguignon LY, Lokeshwar VB, He J et al. (1992) A CD44-like endothelial cell transmembrane glycoprotein (GP116) interacts with extracellular matrix and ankyrin. *Mol Cell Biol* 12:4464-4471
12. Brown TA, Bouchard T, St John T et al. (1991) Human keratinocytes express a new CD44 core protein (CD44E) as a heparan-sulfate intrinsic membrane proteoglycan with additional exons. *J Cell Biol* 113:207-221
13. Carter WG, Wayner EA (1988) Characterization of the class III collagen receptor, a phosphorylated, transmembrane glycoprotein expressed in nucleated human cells. *J Biol Chem* 263:4193-4201
14. Chen BL, Guo K, Liu YK (2011) [Relationship between CD44 expression or glycosylation and hepatocellular carcinoma metastasis]. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi* 19:898-903
15. Chen P, Huang HF, Lu R et al. (2012) Prognostic significance of CD44v6/v7 in acute promyelocytic leukemia. *Asian Pac J Cancer Prev* 13:3791-3794
16. Chen YT, Wei JD, Wang JP et al. (2011) Isolation of mesenchymal stem cells from human ligamentum flavum: implicating etiology of ligamentum flavum hypertrophy. *Spine (Phila Pa 1976)* 36:E1193-1200
17. Cichy J, Pure E (2000) Oncostatin M and transforming growth factor-beta 1 induce post-translational modification and hyaluronan binding to CD44 in lung-derived epithelial tumor cells. *J Biol Chem* 275:18061-18069
18. Crockett RJ, Centrella M, McCarthy TL et al. (2010) Effects of cyclic strain on rat tail tenocytes. *Mol Biol Rep* 37:2629-2634
19. Croft DR, Dall P, Davies D et al. (1997) Complex CD44 splicing combinations in synovial fibroblasts from arthritic joints. *Eur J Immunol* 27:1680-1684
20. Culty M, Nguyen HA, Underhill CB (1992) The hyaluronan receptor (CD44) participates in the uptake and degradation of hyaluronan. *J Cell Biol* 116:1055-1062
21. Cunliffe IA, Rees RC, Rennie IG (1996) The effect of TGF-beta 1 and TGF-beta 2 on the proliferation of human Tenon's capsule fibroblasts in tissue culture. *Acta Ophthalmol Scand* 74:31-35

22. Dalchau R, Kirkley J, Fabre JW (1980) Monoclonal antibody to a human leukocyte-specific membrane glycoprotein probably homologous to the leukocyte-common (L-C) antigen of the rat. *Eur J Immunol* 10:737-744
23. Dall P, Heider KH, Hekele A et al. (1994) Surface protein expression and messenger RNA-splicing analysis of CD44 in uterine cervical cancer and normal cervical epithelium. *Cancer Res* 54:3337-3341
24. David-Raoudi M, Tranchepain F, Deschrevel B et al. (2008) Differential effects of hyaluronan and its fragments on fibroblasts: relation to wound healing. *Wound Repair Regen* 16:274-287
25. DeGrendele HC, Estess P, Siegelman MH (1997) Requirement for CD44 in activated T cell extravasation into an inflammatory site. *Science* 278:672-675
26. Dimitroff CJ, Lee JY, Fuhlbrigge RC et al. (2000) A distinct glycoform of CD44 is an L-selectin ligand on human hematopoietic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:13841-13846
27. Dimitroff CJ, Lee JY, Rafii S et al. (2001) CD44 is a major E-selectin ligand on human hematopoietic progenitor cells. *J Cell Biol* 153:1277-1286
28. Dougherty GJ, Landorp PM, Cooper DL et al. (1991) Molecular cloning of CD44R1 and CD44R2, two novel isoforms of the human CD44 lymphocyte "homing" receptor expressed by hemopoietic cells. *J Exp Med* 174:1-5
29. Evanko SP, Angello JC, Wight TN (1999) Formation of hyaluronan- and versican-rich pericellular matrix is required for proliferation and migration of vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19:1004-1013
30. Ewald C, Kalff R (2011) [Symptomatic lumbar spinal stenosis: diagnostic evaluation and therapeutic strategies]. *Nervenarzt* 82:1623-1629; quiz 1630-1621
31. Favata M, Beredjikian PK, Zgonis MH et al. (2006) Regenerative properties of fetal sheep tendon are not adversely affected by transplantation into an adult environment. *J Orthop Res* 24:2124-2132

32. Ferguson MW, O'Kane S (2004) Scar-free healing: from embryonic mechanisms to adult therapeutic intervention. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 359:839-850
33. Franzén L, Dahlquist C (1994) The effect of transforming growth factor-beta on fibroblast cell proliferation in intact connective tissue in vitro. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 30A:460-463
34. Fuchs S, Dankbar B, Wildenau G et al. (2004) Expression of the CD44 variant isoform 5 in the human osteoarthritic knee joint: correlation with radiological, histomorphological, and biochemical parameters. *J Orthop Res* 22:774-780
35. Fuchs S, Rolauffs B, Arndt S et al. (2003) CD44H and the isoforms CD44v5 and CD44v6 in the synovial fluid of the osteoarthritic human knee joint. *Osteoarthritis Cartilage* 11:839-844
36. Gargano FP, Jacobson R, Rosomoff H (1974) Transverse axial tomography of the spine. *Neuroradiology* 6:254-258
37. Goldstein LA, Zhou DF, Picker LJ et al. (1989) A human lymphocyte homing receptor, the hermes antigen, is related to cartilage proteoglycan core and link proteins. *Cell* 56:1063-1072
38. Gotley DC, Fawcett J, Walsh MD et al. (1996) Alternatively spliced variants of the cell adhesion molecule CD44 and tumour progression in colorectal cancer. *Br J Cancer* 74:342-351
39. Gupta V, Bhinge KN, Hosain SB et al. (2012) Ceramide glycosylation by glucosylceramide synthase selectively maintains the properties of breast cancer stem cells. *J Biol Chem* 287:37195-37205
40. Günthert U, Schwärzler C, Wittig B et al. (1998) Functional involvement of CD44, a family of cell adhesion molecules, in immune responses, tumour progression and haematopoiesis. *Adv Exp Med Biol* 451:43-49
41. Hale LP, Haynes BF, McCachren SS (1995) Expression of CD44 variants in human inflammatory synovitis. *J Clin Immunol* 15:300-311
42. Hall S, Bartleson JD, Onofrio BM et al. (1985) Lumbar spinal stenosis. Clinical features, diagnostic procedures, and results of surgical treatment in 68 patients. *Ann Intern Med* 103:271-275

43. Han H, Stapels M, Ying W et al. (2012) Comprehensive characterization of the N-glycosylation status of CD44s by use of multiple mass spectrometry-based techniques. *Anal Bioanal Chem* 404:373-388
44. Harada H, Takahashi M (2007) CD44-dependent intracellular and extracellular catabolism of hyaluronic acid by hyaluronidase-1 and -2. *J Biol Chem* 282:5597-5607
45. Hathcock KS, Hirano H, Murakami S et al. (1993) CD44 expression on activated B cells. Differential capacity for CD44-dependent binding to hyaluronic acid. *J Immunol* 151:6712-6722
46. Haynes BF, Hale LP, Patton KL et al. (1991) Measurement of an adhesion molecule as an indicator of inflammatory disease activity. Up-regulation of the receptor for hyaluronate (CD44) in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 34:1434-1443
47. Henke CA, Roongta U, Mickelson DJ et al. (1996) CD44-related chondroitin sulfate proteoglycan, a cell surface receptor implicated with tumor cell invasion, mediates endothelial cell migration on fibrinogen and invasion into a fibrin matrix. *J Clin Invest* 97:2541-2552
48. Heyse TJ, Malcherczyk D, Moll R et al. (2010) CD44: survival and metastasis in chondrosarcoma. *Osteoarthritis Cartilage* 18:849-856
49. Hollingsworth JW, Li Z, Brass DM et al. (2007) CD44 regulates macrophage recruitment to the lung in lipopolysaccharide-induced airway disease. *Am J Respir Cell Mol Biol* 37:248-253
50. Honsawek S, Poonpukdee J, Chalermpanpipat C et al. (2013) Hypertrophy of the ligamentum flavum in lumbar spinal canal stenosis is associated with increased bFGF expression. *Int Orthop* 37:1387-1392
51. Jacobson RE, Gargano FP, Rosomoff HL (1975) Transverse axial tomography of the spine. Part 1: axial anatomy of the normal lumbar spine. *J Neurosurg* 42:406-411
52. Jalkanen S, Jalkanen M (1992) Lymphocyte CD44 binds the COOH-terminal heparin-binding domain of fibronectin. *J Cell Biol* 116:817-825
53. Jiang D, Liang J, Noble PW (2007) Hyaluronan in tissue injury and repair. *Annu Rev Cell Dev Biol* 23:435-461

54. Johnson P, Maiti A, Brown KL et al. (2000) A role for the cell adhesion molecule CD44 and sulfation in leukocyte-endothelial cell adhesion during an inflammatory response? *Biochem Pharmacol* 59:455-465
55. Jones RA, Thomson JL (1968) The narrow lumbar canal. A clinical and radiological review. *J Bone Joint Surg Br* 50:595-605
56. Julovi SM, Ito H, Nishitani K et al. (2011) Hyaluronan inhibits matrix metalloproteinase-13 in human arthritic chondrocytes via CD44 and P38. *J Orthop Res* 29:258-264
57. Kainz C, Kohlberger P, Sliutz G et al. (1995) Splice variants of CD44 in human cervical cancer stage IB to IIB. *Gynecol Oncol* 57:383-387
58. Kainz C, Kohlberger P, Tempfer C et al. (1995) Prognostic value of CD44 splice variants in human stage III cervical cancer. *Eur J Cancer* 31A:1706-1709
59. Kamazani FM, Bahoush GR, Aghaeipour M et al. (2013) CD44 and CD27 expression pattern in B cell precursor acute lymphoblastic leukemia and its clinical significance. *Med Oncol* 30:359
60. Kanno H, Ozawa H, Koizumi Y et al. (2012) Dynamic change of dural sac cross-sectional area in axial loaded magnetic resonance imaging correlates with the severity of clinical symptoms in patients with lumbar spinal canal stenosis. *Spine (Phila Pa 1976)* 37:207-213
61. Katz JN, Dalgas M, Stucki G et al. (1995) Degenerative lumbar spinal stenosis. Diagnostic value of the history and physical examination. *Arthritis Rheum* 38:1236-1241
62. King A, Balaji S, Le LD et al. (2013) Interleukin-10 regulates fetal extracellular matrix hyaluronan production. *J Pediatr Surg* 48:1211-1217
63. Kishi K, Okabe K, Shimizu R et al. (2012) Fetal skin possesses the ability to regenerate completely: complete regeneration of skin. *Keio J Med* 61:101-108
64. Knudson W, Chow G, Knudson CB (2002) CD44-mediated uptake and degradation of hyaluronan. *Matrix Biol* 21:15-23

65. Koopman G, Heider KH, Horst E et al. (1993) Activated human lymphocytes and aggressive non-Hodgkin's lymphomas express a homologue of the rat metastasis-associated variant of CD44. *J Exp Med* 177:897-904
66. Koretz K, Möller P, Lehnert T et al. (1995) Effect of CD44v6 on survival in colorectal carcinoma. *Lancet* 345:327-328
67. Lakemeier S, Braun J, Efe T et al. (2011) Expression of matrix metalloproteinases 1, 3, and 9 in differing extents of tendon retraction in the torn rotator cuff. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 19:1760-1765
68. Lakemeier S, Schofer MD, Foltz L et al. (2012) Expression of Hypoxia-inducible Factor-1 α , Vascular Endothelial Growth Factor, and Matrix Metalloproteinases 1, 3, and 9 in Hypertrophied Ligamentum Flavum. *J Spinal Disord Tech*
69. Lakemeier S, Schwuchow SA, Peterlein CD et al. (2010) Expression of matrix metalloproteinases 1, 3, and 9 in degenerated long head biceps tendon in the presence of rotator cuff tears: an immunohistological study. *BMC Musculoskelet Disord* 11:271
70. Laurent TC, Fraser JR (1986) The properties and turnover of hyaluronan. *Ciba Found Symp* 124:9-29
71. Laurent TC, Fraser JR (1992) Hyaluronan. *FASEB J* 6:2397-2404
72. Lesley J, English N, Perschl A et al. (1995) Variant cell lines selected for alterations in the function of the hyaluronan receptor CD44 show differences in glycosylation. *J Exp Med* 182:431-437
73. Lesley J, Hyman R, Kincade PW (1993) CD44 and its interaction with extracellular matrix. *Adv Immunol* 54:271-335
74. Levesque MC, Haynes BF (2001) Activated T lymphocytes regulate hyaluronan binding to monocyte CD44 via production of IL-2 and IFN-gamma. *J Immunol* 166:188-196
75. Lin HB, Dai JH, Wu XW et al. (2007) [Prevention of dura adherence in spinal canal after microendoscopic discectomy by different methods: a clinical study of 165 cases]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 87:3085-3087

76. Liu HX, Shen Y, Shang P et al. (2012) Asymmetric Facet Joint Osteoarthritis and its Relationships to Facet Orientation, Facet Tropism and Ligamentum Flavum Thickening. *J Spinal Disord Tech*
77. Lokeshwar VB, Bourguignon LY (1991) Post-translational protein modification and expression of ankyrin-binding site(s) in GP85 (Pgp-1/CD44) and its biosynthetic precursors during T-lymphoma membrane biosynthesis. *J Biol Chem* 266:17983-17989
78. Lokeshwar VB, Fregien N, Bourguignon LY (1994) Ankyrin-binding domain of CD44(GP85) is required for the expression of hyaluronic acid-mediated adhesion function. *J Cell Biol* 126:1099-1109
79. Lokeshwar VB, Iida N, Bourguignon LY (1996) The cell adhesion molecule, GP116, is a new CD44 variant (ex14/v10) involved in hyaluronic acid binding and endothelial cell proliferation. *J Biol Chem* 271:23853-23864
80. Löhr M, Hampl JA, Lee JY et al. (2011) Hypertrophy of the lumbar ligamentum flavum is associated with inflammation-related TGF- β expression. *Acta Neurochir (Wien)* 153:134-141
81. Mackay CR, Maddox JF, Wijffels GL et al. (1988) Characterization of a 95,000 molecule on sheep leucocytes homologous to murine Pgp-1 and human CD44. *Immunology* 65:93-99
82. Maiti A, Maki G, Johnson P (1998) TNF-alpha induction of CD44-mediated leukocyte adhesion by sulfation. *Science* 282:941-943
83. Mast BA, Haynes JH, Krummel TM et al. (1992) In vivo degradation of fetal wound hyaluronic acid results in increased fibroplasia, collagen deposition, and neovascularization. *Plast Reconstr Surg* 89:503-509
84. Matzku S, Komitowski D, Mildemberger M et al. (1983) Characterization of BSp73, a spontaneous rat tumor and its in vivo selected variants showing different metastasizing capacities. *Invasion Metastasis* 3:109-123
85. Mikecz K, Dennis K, Shi M et al. (1999) Modulation of hyaluronan receptor (CD44) function in vivo in a murine model of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 42:659-668

86. Mohamadzadeh M, DeGrendele H, Arizpe H et al. (1998) Proinflammatory stimuli regulate endothelial hyaluronan expression and CD44/HA-dependent primary adhesion. *J Clin Invest* 101:97-108
87. Moon ES, Kim HS, Park JO et al. (2005) Comparison of the predictive value of myelography, computed tomography and MRI on the treadmill test in lumbar spinal stenosis. *Yonsei Med J* 46:806-811
88. Morfeld M, Küch D, Greitemann B et al. (2010) [A comparison of multimodal programmes of patient education in the rehabilitation of chronic low back pain]. *Rehabilitation (Stuttg)* 49:66-79
89. Morra M (2005) Engineering of biomaterials surfaces by hyaluronan. *Biomacromolecules* 6:1205-1223
90. Naor D, Nedvetzki S (2003) CD44 in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 5:105-115
91. Naor D, Nedvetzki S, Golan I et al. (2002) CD44 in cancer. *Crit Rev Clin Lab Sci* 39:527-579
92. Naor D, Sionov RV, Ish-Shalom D (1997) CD44: structure, function, and association with the malignant process. *Adv Cancer Res* 71:241-319
93. Nishida Y, D'Souza AL, Thonar EJ et al. (2000) Stimulation of hyaluronan metabolism by interleukin-1alpha in human articular cartilage. *Arthritis Rheum* 43:1315-1326
94. Noble PW (2002) Hyaluronan and its catabolic products in tissue injury and repair. *Matrix Biol* 21:25-29
95. North-American-Spine-Society (2011) (NASS): Diagnosis and treatment of degenerative lumbar spinal stenosis.
96. Nydegger A, Brühlmann P, Steurer J (2013) [Lumbar spinal stenosis: diagnosis and conservative treatment]. *Praxis (Bern 1994)* 102:391-398
97. Ogikubo O, Forsberg L, Hansson T (2007) The relationship between the cross-sectional area of the cauda equina and the preoperative symptoms in central lumbar spinal stenosis. *Spine (Phila Pa 1976)* 32:1423-1428; discussion 1429

98. Ostergaard K, Salter DM, Andersen CB et al. (1997) CD44 expression is up-regulated in the deep zone of osteoarthritic cartilage from human femoral heads. *Histopathology* 31:451-459
99. Park JB, Chang H, Lee JK (2001) Quantitative analysis of transforming growth factor-beta 1 in ligamentum flavum of lumbar spinal stenosis and disc herniation. *Spine (Phila Pa 1976)* 26:E492-495
100. Park JB, Kong CG, Suhl KH et al. (2009) The increased expression of matrix metalloproteinases associated with elastin degradation and fibrosis of the ligamentum flavum in patients with lumbar spinal stenosis. *Clin Orthop Surg* 1:81-89
101. Pfingsten M, Hildebrandt J (2001) [Treatment of chronic low back pain through intensive activation - an assessment of 10 years]. *Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther* 36:580-589
102. Ploumis A, Transfeldt EE, Denis F (2007) Degenerative lumbar scoliosis associated with spinal stenosis. *Spine J* 7:428-436
103. Postacchini F, Gumina S, Cinotti G et al. (1994) Ligamenta flava in lumbar disc herniation and spinal stenosis. Light and electron microscopic morphology. *Spine (Phila Pa 1976)* 19:917-922
104. Rainville J, Childs LA, Peña EB et al. (2012) Quantification of walking ability in subjects with neurogenic claudication from lumbar spinal stenosis--a comparative study. *Spine J* 12:101-109
105. Raman PS, Alves CS, Wirtz D et al. (2012) Distinct kinetic and molecular requirements govern CD44 binding to hyaluronan versus fibrin(ogen). *Biophys J* 103:415-423
106. Rauschnig W (1987) Normal and pathologic anatomy of the lumbar root canals. *Spine (Phila Pa 1976)* 12:1008-1019
107. Rochman M, Moll J, Herrlich P et al. (2000) The CD44 receptor of lymphoma cells: structure-function relationships and mechanism of activation. *Cell Adhes Commun* 7:331-347
108. Rodgers AK, Nair A, Binkley PA et al. (2011) Inhibition of CD44 N- and O-linked glycosylation decreases endometrial cell lines attachment to peritoneal mesothelial cells. *Fertil Steril* 95:823-825

109. Rudy W, Hofmann M, Schwartz-Albiez R et al. (1993) The two major CD44 proteins expressed on a metastatic rat tumor cell line are derived from different splice variants: each one individually suffices to confer metastatic behavior. *Cancer Res* 53:1262-1268
110. Safak AA, Is M, Sevinc O et al. (2010) The thickness of the ligamentum flavum in relation to age and gender. *Clin Anat* 23:79-83
111. Sairyo K, Biyani A, Goel V et al. (2005) Pathomechanism of ligamentum flavum hypertrophy: a multidisciplinary investigation based on clinical, biomechanical, histologic, and biologic assessments. *Spine (Phila Pa 1976)* 30:2649-2656
112. Sairyo K, Biyani A, Goel VK et al. (2007) Lumbar ligamentum flavum hypertrophy is due to accumulation of inflammation-related scar tissue. *Spine (Phila Pa 1976)* 32:E340-347
113. Sakamaki T, Sairyo K, Sakai T et al. (2009) Measurements of ligamentum flavum thickening at lumbar spine using MRI. *Arch Orthop Trauma Surg* 129:1415-1419
114. Schnebel B, Kingston S, Watkins R et al. (1989) Comparison of MRI to contrast CT in the diagnosis of spinal stenosis. *Spine (Phila Pa 1976)* 14:332-337
115. Schulte TL, Bullmann V, Lerner T et al. (2006) [Lumbar spinal stenosis]. *Orthopade* 35:675-692; quiz 693-674
116. Sreaton GR, Bell MV, Bell JI et al. (1993) The identification of a new alternative exon with highly restricted tissue expression in transcripts encoding the mouse Pgp-1 (CD44) homing receptor. Comparison of all 10 variable exons between mouse, human, and rat. *J Biol Chem* 268:12235-12238
117. Sreaton GR, Bell MV, Jackson DG et al. (1992) Genomic structure of DNA encoding the lymphocyte homing receptor CD44 reveals at least 12 alternatively spliced exons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:12160-12164
118. Seiter S, Arch R, Reber S et al. (1993) Prevention of tumor metastasis formation by anti-variant CD44. *J Exp Med* 177:443-455

119. Sheldon JJ, Russin LA, Gargano FP (1976) Lumbar spinal stenosis. Radiographic diagnosis with special reference to transverse axial tomography. *Clin Orthop Relat Res*:53-67
120. Singh R, Subramanian S, Rhodes JM et al. (2006) Peanut lectin stimulates proliferation of colon cancer cells by interaction with glycosylated CD44v6 isoforms and consequential activation of c-Met and MAPK: functional implications for disease-associated glycosylation changes. *Glycobiology* 16:594-601
121. Sirvanci M, Bhatia M, Ganiyusufoglu KA et al. (2008) Degenerative lumbar spinal stenosis: correlation with Oswestry Disability Index and MR imaging. *Eur Spine J* 17:679-685
122. Sleeman J, Rudy W, Hofmann M et al. (1996) Regulated clustering of variant CD44 proteins increases their hyaluronate binding capacity. *J Cell Biol* 135:1139-1150
123. Sneath RJ, Mangham DC (1998) The normal structure and function of CD44 and its role in neoplasia. *Mol Pathol* 51:191-200
124. Song HF, Chai JK, Lin ZH et al. (2003) [Expression of hyaluronic acid and its receptor in the process of wound healing in different skin tissues and its significance]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 83:1070-1074
125. Stauder R, Eisterer W, Thaler J et al. (1995) CD44 variant isoforms in non-Hodgkin's lymphoma: a new independent prognostic factor. *Blood* 85:2885-2899
126. Stauder R, Van Driel M, Schwärzler C et al. (1996) Different CD44 splicing patterns define prognostic subgroups in multiple myeloma. *Blood* 88:3101-3108
127. Szpalski M, Gunzburg R (2003) Lumbar spinal stenosis in the elderly: an overview. *Eur Spine J* 12 Suppl 2:S170-175
128. Tammi R, Pasonen-Seppänen S, Kolehmainen E et al. (2005) Hyaluronan synthase induction and hyaluronan accumulation in mouse epidermis following skin injury. *J Invest Dermatol* 124:898-905
129. Tanaka Y, Adams DH, Hubscher S et al. (1993) T-cell adhesion induced by proteoglycan-immobilized cytokine MIP-1 beta. *Nature* 361:79-82

130. Tibesku CO, Szuwart T, Ocken SA et al. (2005) Increase in the expression of the transmembrane surface receptor CD44v6 on chondrocytes in animals with osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 52:810-817
131. Towne EB, Reichert FL (1931) Compression of the Lumbosacral Roots of the Spinal Cord by Thickened Ligamenta Flava. *Ann Surg* 94:327-336
132. Underhill CB, Green SJ, Comoglio PM et al. (1987) The hyaluronate receptor is identical to a glycoprotein of Mr 85,000 (gp85) as shown by a monoclonal antibody that interferes with binding activity. *J Biol Chem* 262:13142-13146
133. Vachon E, Martin R, Plumb J et al. (2006) CD44 is a phagocytic receptor. *Blood* 107:4149-4158
134. VERBIEST H (1955) Further experiences on the pathological influence of a developmental narrowness of the bony lumbar vertebral canal. *J Bone Joint Surg Br* 37-B:576-583
135. Weigand S, Herting F, Maisel D et al. (2012) Global quantitative phosphoproteome analysis of human tumor xenografts treated with a CD44 antagonist. *Cancer Res* 72:4329-4339
136. Wittig B, Seiter S, Schmidt DS et al. (1999) CD44 variant isoforms on blood leukocytes in chronic inflammatory bowel disease and other systemic autoimmune diseases. *Lab Invest* 79:747-759
137. Yagishita K, Sekiya I, Sakaguchi Y et al. (2005) The effect of hyaluronan on tendon healing in rabbits. *Arthroscopy* 21:1330-1336
138. Yang C, Cao M, Liu H et al. (2012) The High and Low Molecular Weight Forms of Hyaluronan Have Distinct Effects on CD44 Clustering. *J Biol Chem* 287:43094-43107
139. Zeifang F, Abel R, Schiltenswolf M (2003) [Possible conservative treatment methods for patients with spinal claudication]. *Orthopade* 32:906-910
140. Zhang M, Singh RK, Wang MH et al. (1996) Epidermal growth factor modulates cell attachment to hyaluronic acid by the cell surface glycoprotein CD44. *Clin Exp Metastasis* 14:268-276

141. Zhou DF, Ding JF, Picker LJ et al. (1989) Molecular cloning and expression of Pgp-1. The mouse homolog of the human H-CAM (Hermes) lymphocyte homing receptor. *J Immunol* 143:3390-3395
142. Zhou Z, Akinbiyi T, Xu L et al. (2010) Tendon-derived stem/progenitor cell aging: defective self-renewal and altered fate. *Aging Cell* 9:911-915

8 Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren (in alphabetischer Reihenfolge):

Marburg

Barth, Bartsch, Basler, Baum, Baumann, Becker, Bohlander, Cetin, Cottebrune, Czubayko, Daut, Dodel, Feuser, Fuchs-Winkelmann, Gress, Hertl, Hofmann, Hoyer, Kircher, Klose, Koczulla, Koolmann, Kuhlmann, Kühnert, Lill, Löffler, Lohoff, Lakemeier, Mandrek, Maisch, Mueller, Moll, Moosdorf, Neubauer, Neumüller, Nimsky, Oertl, Paletta, Plant, Renz, Reese, Richter, Röhm, Ruchholtz, Schofer, Seitz, Sekundo, Sommer, Steiniger, Tackenberg, Voigt, Wagner, Waldmann, Weihe, Werner, Wilhelm, Wulf

Gießen

Schneider, Dettmeyer

Kassel

Hesterberg, Löser

Fulda

Greim

Amberg

Wollschläger

9 Danksagung

Ich bedanke mich ganz herzlich bei Frau Prof. Dr. med. Susanne Fuchs-Winkelmann für die Überlassung des vorliegenden Dissertationsthemas und die gute Unterstützung während meines Promotionsvorhabens.

Weiterer besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. med. Stefan Lakemeier, der mir bei der Umsetzung der Studie und der Anfertigung der Dissertationsschrift immer zur Seite stand und mich in allen Fragen sehr gut beriet.

Ebenso danke ich Dr. rer. nat. Jürgen Paletta sowie Eleni Archontidou-Aprin für die Zusammenarbeit und Unterstützung im Labor.

Zudem danke und gedenke ich meiner verstorbenen Mit-Doktorandin Lisa Foltz, ohne deren Hilfe diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Weiterer Dank gilt Frau Dr. phil. Eva-Maria Bangerter-Schmid für die Korrektur meiner Dissertationsschrift und Martin Schellenberger für die Hilfe bei der Erstellung der Abbildungen.

Besonderer Dank gilt meiner Familie, die mir das Studium der Humanmedizin sowie die Promotion ermöglichte und mich immer bedingungslos in allem, was das Studentenleben mit sich brachte, unterstützte.

Last but not least danke ich meiner Freundin Julia.

10 Anhang

Im Anhang befinden sich folgende Dokumente:

1. Positives Ethikvotum (Az. 191/09) vom 11.02.2010 durch die Ethikkommission des Fachbereichs der Philipps-Universität Marburg.

2. Aufklärungsbogen

3. Patienteneinverständniserklärung zur Studie

4. Publikation:

Lakemeier S., Schmid R. et al. (2012) Increased expression of CD44 in hypertrophied ligamentum flavum and relevance of splice variants CD44v5 and CD44v6. *Acta Neurochir (Wien)*, 154, 359-65; discussion 365.

*Positives Ethikvotum (Az. 191/09) vom 11.02.2010 durch die Ethikkommission
des Fachbereichs der Philipps-Universität Marburg [Seite 1 von 2]*



Philipps-Universität - 35032 Marburg

Herrn
Dr. med. S. Lakemeier
Universitätsklinikum Gießen und Marburg
GmbH, Standort Marburg
Klinik für Orthopädie und Rheumatologie
Baldingerstraße
D-35033 Marburg

Fachbereich Medizin

Dekanat/Ethikkommission

Prof. Dr. med. Gerd Richter (Vors.)

Tel.: 06421 586 6487

Fax: 06421 586 6585

Sek.: D. Raiss

E-Mail: ethikkom@post.med.uni-marburg.de

Anschrift: Baldingerstrasse/Postfach 2360

35032 Marburg

Web: www.med.uni-marburg.de/ethikkomm

Az.: 191/09

Marburg, 11.02.10

N/ KKS Marburg

Studie: „Auswirkung der Hypertrophie des Ligamentum flavum auf die Ausprägung einer lumbalen Spinalkanalstenose“.

Eingereichte Unterlagen:

1. Ihre Stellungnahmen vom 13.01.2010, 07.02.2010,
2. Ethikantrag,
3. Patienteninformation „Verumgruppe“,
4. Patienteninformation „Kontrollgruppe“,
5. Einverständniserklärung.

Sehr geehrter Herr Dr. Lakemeier,

vielen Dank für Ihre Stellungnahme zu unserem Gutachten vom 05.02.2010. Mit Ihrer Stellungnahme und den dazugehörigen formal korrigierten Unterlagen sind alle Auflagen erfüllt. Es bestehen keine ethischen oder rechtlichen Bedenken gegen die Durchführung der Studie.

Damit schließt die Ethikkommission des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg ihr Gutachten mit einem

positiven Ethikkommissionsvotum

ab.

Entsprechend der ausschließlich beratenden Funktion der Ethik-Kommission betrifft dieses Votum nur die ethische Beurteilung der Konzeption, der vorgesehenen Methoden, der Durchführung und Überwachung des betreffenden Projektes sowie der beabsichtigten Patientenaufklärung. Die ärztliche und juristische Verantwortung verbleibt jedoch uneingeschränkt beim Projektleiter und seinen Mitarbeitern.

Bitte geben Sie uns jede Änderung in der Protokolldurchführung bekannt. Es muss dann geklärt werden, ob das Votum der Ethik-Kommission noch Gültigkeit hat.

**Sekretariat : Frau Raiss Montag – Donnerstag 8.00 – 12.00 Uhr, Freitag 8.00 – 11.00 Uhr
Frau Backes Montag – Donnerstag 14.00 – 16.00 Uhr**

Kommissionsmitglieder: Prof. Dr. med. R. Berger, Prof. Dr. jur. G. Freund, Prof. Monika Böhm, Prof. Dr. med. J.-C. Krieg, Prof. Dr. M. Koch, Prof. Dr. med. Czubyko, Prof. Dr. med. G. Richter (Vorsitzender), Prof. Dr. rer. nat. H. Schäfer, Prof. Dr. med. Uwe Wagner (stellvertretender Vorsitzender), Prof. Dr. med. R. Maier, Prof. Dr. med. N. Donner-Banzhoff, PD Dr. H.-H. Müller, Prof. Dr. med. A. Neubauer, Dr. B. Tackenberg, Bettina Nieth, Dr. Thomas Neubert, Ass.iur.K.-Ina Köhler, PD Dr. C. Seifart

*Positives Ethikvotum (Az. 191/09) vom 11.02.2010 durch die Ethikkommission
des Fachbereichs der Philipps-Universität Marburg [Seite 2 von 2]*

Über alle schwerwiegenden oder unerwarteten unerwünschten Ereignisse, die während der Studie auftreten und die Sicherheit der Studienteilnehmer oder die Durchführung der Studie beeinträchtigen könnten, muss der Vorsitzende der Ethik-Kommission unterrichtet werden.

Die Ethik-Kommission des Fachbereichs Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg arbeitet gemäß den nationalen gesetzlichen Bestimmungen und den ICH-GCP-Richtlinien.

Außerdem benötigt die Ethik-Kommission einen Bericht nach Abschluss der Studie.

Mit freundlichen Grüßen
für die Ethikkommission des
Fachbereichs Medizin
der Philipps-Universität Marburg

Prof. Dr. med. G. Richter
(Vorsitzender)

Ass. iur. Kay-Ina Köhler
(Geschäftsstelle Ethikkommission)



UNIVERSITÄTSKLINIKUM

Giessen und Marburg



Standort Marburg

Direktorin Univ.-Prof. Dr. S. Fuchs-Winkelmann

Studienleitung:

Dr. med. Stefan Lakemeier

Klinik für Orthopädie und Rheumatologie

Universitätsklinikum Gießen und Marburg, Standort

Marburg

Baldingerstraße

35043 Marburg

Tel.: 06421/5863546

Wissenschaftliche Studie:

„Auswirkung der Hypertrophie des Ligamentum flavum auf die Ausprägung einer lumbalen Spinalkanalstenose“ – „Verumgruppe“

Sehr geehrte Patientin, sehr geehrter Patient,

an der Klinik für Orthopädie und Rheumatologie des Universitätsklinikums Marburg und Gießen, Standort Marburg, werden seit langer Zeit Patienten mit Spinalkanalstenose behandelt. Die Spinalkanalstenose ist meist degenerativ bedingt; mit höherem Lebensalter steigt das Risiko. Die Erkrankung führt zu Schmerzen im Bereich der Lendenwirbelsäule mit Ausstrahlung in die Beine insbesondere beim Gehen. Zur effektiven Therapie dieser Schmerzen ist weltweit die knöcherne und ligamentäre Dekompression des Spinalkanals ein anerkanntes Behandlungskonzept. Dabei werden Anteile des hinteren Wirbelbogens sowie das darunterliegende Band das Ligamentum flavum entfernt.

Die Mitarbeiter der Klinik für Orthopädie und Rheumatologie untersuchen die Korrelation zwischen der Hypertrophie des Ligamentum flavum und der klinischen Ausprägung der Spinalkanalstenose.

Wir möchten Sie bitten, an der unserer Studie, bei der es sich um ein wissenschaftliches Projekt handelt, teilzunehmen. Die Teilnahme ist freiwillig, eine Nichtteilnahme hat keinerlei Einfluss auf die Behandlung. *Auch können Sie jederzeit von dieser Studie ohne Angabe von Gründen und ohne Nachteile zurücktreten.*

Darstellung der Behandlung:

Bei Ihnen wurde eine Spinalkanalstenose festgestellt. Zur Behandlung der Erkrankung ist eine Dekompressionsoperation an der Lendenwirbelsäule erforderlich. Im Rahmen der Vorbereitung der Operation werden Sie durch Mitarbeiter der Klinik für Orthopädie und Rheumatologie anhand eines speziellen Schemas untersucht und zur Funktion der Wirbelsäule im Alltag befragt. Diese Untersuchungen werden bei allen Patienten - unabhängig von der Teilnahme an der Studie - durchgeführt. Die Teilnahme an der Studie bedeutet keine Mehrbelastung für Sie.

Bei dem Eingriff wird mit einem speziellen Schneidewerkzeug, einer „Stanze“, sukzessiv zunächst der Knochen des hinteren Wirbelbogens des von der Spinalkanalstenose betroffenen Segmentes entfernt. Daraufhin erfolgt die vollständige Entfernung des meist verdickten „gelben Bandes“ (Ligamentum flavum) des betroffenen Wirbelsäulenabschnittes. Das resezierte Gewebe wird nach der Operation üblicherweise verworfen.

Im Falle Ihrer Zustimmung werden die entfernten Gewebestücke gekühlt und zeitnah in die Forschungslabore überführt. Hier erfolgt die weitere Verarbeitung. Für Expressionsstudien wird das entnommene Gewebe bei – 80° Celsius gefroren und aufbewahrt. Später wird es für feingewebliche Untersuchungen in Formalin fixiert, entwässert und in Paraffin eingebettet. Zu einem späteren Zeitpunkt werden aus dem Ligamentum flavum kleine Schnitte angefertigt. Diese werden mit speziellen Farbstoffen angefärbt. Im Mikroskop soll dann untersucht werden, ob es im hypertrophierten Ligamentum flavum zu einer Gefäßneubildung gekommen ist.

Für den Patienten treten dabei keinerlei Risiken auf, da nur Gewebe verwendet wird, das eigentlich zur Entsorgung vorgesehen ist. Es wird keinem Patienten mehr

Aufklärungsbogen [Seite 3 von 3]

Gewebe entnommen, als es die Technik der Operation notwendig macht. Eine Nachuntersuchung zu einem späteren Zeitpunkt ist nicht erforderlich.

Sie haben nach der Operation jederzeit die Möglichkeit, Ihre Einverständnis zur Teilnahme an der Studie zurückzuziehen. Dann werden die entnommenen Ligamentum flavum Anteile der Entsorgung zugeführt und Ihre gespeicherten Studiendaten umgehend gelöscht.

Datenverarbeitung:

Alle in dieser Studie erhobenen Daten werden vertraulich behandelt und die Weitergabe erfolgt nur in pseudonymisierter Form. Hierbei wird der Name des Patienten durch ein Pseudonym (in diesem Fall eine mehrstellige Zahlen- und Buchstabenkombination) ersetzt, so dass keine Rückschlüsse auf die betroffene Person erhoben werden können. Die vollständigen Daten sind nur dem Studienleiter bekannt. Folgende Daten werden dem Untersucher zugänglich gemacht:

- Probenummer
- Alter des Patienten bei Probeentnahme
- Geschlecht
- Diagnose
- Pseudonymisierte Form der Auswertung der Wirbelsäulenuntersuchung vor der Operation

Für Rückfragen stehen wir Ihnen telefonisch oder per E-Mail jederzeit zur Verfügung (Dr. Lakemeier: Tel.: 06421 5863546, E-Mail: lakemeie@med.uni-marbug.de).

Mit freundlichem Gruß

Prof. Dr. med. S. Fuchs-
Winkelmann
(Direktorin)

Dr. med. Lakemeier
(Facharzt)

Patienteneinverständniserklärung zur Studie

Dr. med. Stefan Lakemeier, Tel.: 06421/5863546
Klinikum der Philips-Universität Marburg; Klinik für Orthopädie und Rheumatologie,
Baldingerstraße
35033 Marburg

Patienteneinverständniserklärung zur Studie

„Auswirkung der Hypertrophie des Ligamentum flavum auf die Ausprägung einer lumbalen Spinalkanalstenose“

Patientenaufkleber/Patientencode

Ich, _____, wurde von meinem Arzt vollständig über Wesen, Bedeutung und Tragweite der Studie mit dem o.g. Titel aufgeklärt. Ich habe den Aufklärungstext gelesen und verstanden. Ich hatte die Möglichkeit, Fragen zu stellen und habe die Antworten verstanden und akzeptiere sie. Mein Arzt hat mich über die mit der Teilnahme an der Studie verbundenen Risiken und den möglichen Nutzen informiert.

Ich hatte ausreichend Zeit, mich zur Teilnahme an dieser Studie zu entscheiden und weiß, dass die Teilnahme freiwillig ist. *Ich weiß, dass ich jederzeit und ohne Angaben von Gründen diese Zustimmung widerrufen kann, ohne dass mir daraus Nachteile erwachsen.*

Mir ist bekannt, dass meine persönlichen Daten in verschlüsselter Form gespeichert werden.

Ich habe eine Kopie der Patienteninformation und dieser Einwilligungserklärung erhalten.

Ort, Datum

Unterschrift des Patienten

Ort, Datum

Unterschrift des aufklärenden Arztes

Abstract

Background: The most common spinal disorder in the elderly is lumbar spinal stenosis (LSS), which results in part from ligamentum flavum (LF) hypertrophy. Although prior histologic and immunochemical studies have been performed in this area, the pathophysiology of loss of elasticity and hypertrophy is not completely understood.

The purpose of this immunohistological study is to elucidate the role of CD44 and its splice variants CD44v5 and CD44v6 in the hypertrophied LF obtained from patients with lumbar spinal stenosis (LSS).

Materials and methods: LF samples of 38 patients with LSS were harvested during spinal decompression. Twelve LF samples obtained from patients with disc herniation and no visible degeneration on preoperative MRI were obtained as controls. Samples were dehydrated and embedded in paraffin. For immunohistochemical determination, slices were stained with antibodies against CD44, CD44v5, and CD44v6 stained with DAB. LF hypertrophy and cross-sectional area (CSA) were measured with T1-weighted MRI.

Results: CD44 and CD44v5 expression were significantly increased in the hypertrophy group ($p < 0.05$). CD44v6 expression was not significantly increased. The number of elastic fibers was significantly higher in the hypertrophy group. In the hypertrophy group, LF thickness was significantly increased while CSA was significantly decreased. There was a statistical correlation between LF thickness, CSA, CD44, and CD44v5 expression in the hypertrophy group ($p < 0.05$).

Conclusions: LF hypertrophy is accompanied by increased CD44 and CD44v5 expression. CD44v6 expression is not enhanced in LF hypertrophy. Our study provides a molecular mechanism for biomechanical changes observed in LSS that are not explained by morphologic characteristics alone.