
Aus der Anatomischen Anstalt der Ludwig-Maximilians-Universität München,
Lehrstuhl II, Vorstand: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. U. Welsch

**Histo- und cytochemische Untersuchung der
Zwischenwirbelscheiben des Rhesusaffen (*Macaca mulatta*)**

DISSERTATION

zum Erwerb des Doktorgrades der Zahnheilkunde
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von Stella Brückner
aus Göttingen
2004

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. U. Welsch

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. M. Pfahler
Prof. Dr. J. Müller-Höcker

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h. c. Klaus Peter

Tag der mündlichen Prüfung: 27.01.2004

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	Ziel der vorliegenden Untersuchung	1
1.2	Allgemeine Angaben zum Aufbau der Zwischenwirbelscheibe (Discus intervertebralis).....	1
1.3	Übersicht über die histo-morphologischen Kenntnisse des Discus intervertebralis	3
1.4	Degenerative Veränderungen der Wirbelsäule des Menschen und Krankheitssymptome.....	9
2	MATERIAL UND METHODEN	14
2.1	Material.....	14
2.2	Präparation und Fixation der Gewebe für Paraffinschnitte	14
2.3	Anfertigen der Paraffinschnitte.....	15
2.4	Färbemethoden	15
2.4.1	Masson-Trichrom-Färbung (Bindegewebs-Übersichts-Färbung).....	15
2.4.2	Azan-Färbung	17
2.4.3	Alcianblau-Färbung	17
2.4.4	Lektin-Färbungen.....	18
2.4.5	PAS-Färbung (Periodic acid Schiff)	20
2.4.6	Immunhistochemischer Nachweis von Dermatansulfat und Decorin.....	20
2.4.7	Immunhistochemischer Nachweis von Chondroitin-6-Sulfat.....	21
2.4.8	Monoclonal-Mouse-Anti-Human-Zymed-Ki-67-Antigen-Reaktion	22
2.4.9	PCNA-(Proliferating Cells Nuclear Antigen)-Färbung	22
2.4.10	Objektträger für Semidünnschnitte	23
2.4.11	Anfertigen der Semidünnschnitte	23
2.4.12	Objektträger für Ultradünnschnitte	23
2.4.13	Anfertigen der Ultradünnschnitte	24
2.4.14	CMB-Färbung (Cupromeronic-Blue-Färbung).....	24
2.4.15	Photodokumentation der Ergebnisse.....	25

3	BEFUNDE	26
3.1	Allgemeiner histologischer Aufbau der Zwischenwirbelscheibe bei <i>Macaca mulatta</i>	26
3.2	Spezielle Darstellung der Zwischenwirbelscheibe verschiedener Wirbelsäulenabschnitte.....	34
3.2.1	Zwischenwirbelscheibe im Bereich der Halswirbelsäule (HWS).....	34
3.2.2	Zwischenwirbelscheibe im Bereich der Brustwirbelsäule (BWS).....	39
3.2.3	Zwischenwirbelscheibe im Bereich der Lendenwirbelsäule (LWS)	52
3.3	Tabellarische Übersicht der Färbeergebnisse an den einzelnen histologischen Strukturen der Zwischenwirbelscheibe.....	58
3.4	Übersichtstabellen und Erläuterungen der lichtmikroskopischen Gewebemessungen an vier adulten männlichen <i>Macaca mulatta</i>	60
3.5	Befunde der lichtmikroskopischen Immunhistochemie	63
3.5.1	Immunhistochemischer Nachweis des Decorins	63
3.5.2	Immunhistochemischer Nachweis des Chondroitin-6-Sulfats.....	65
3.5.3	Immunhistochemischer Nachweis des Dermatan-Sulfats.....	67
3.6	Färbeergebnisse zum Nachweis proliferierender Zellen im Bereich der Zwischenwirbelscheibe mit Ki-67 Antikörpern und PCNA (Proliferating Cells Nuclear Antigen)	68
3.7	Elektronenmikroskopischer Nachweis von Proteoglykanen in der Zwischenwirbelscheibe von <i>Macaca mulatta</i> unter Verwendung der CMB-Methode	69
3.8	Zusammenfassung der Befunde.....	87
4	DISKUSSION	90
5	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	99
6	TABELLENVERZEICHNIS	104
7	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	105
8	LITERATURVERZEICHNIS	106
9	LEBENS LAUF	113

1 EINLEITUNG

1.1 Ziel der vorliegenden Untersuchung

Ziel der vorliegenden Untersuchung ist die Analyse der Zwischenwirbelscheibe (Discus intervertebralis, Bandscheibe) von adulten Rhesusaffen (*Macaca mulatta*) mit verschiedenen licht- und elektronenmikroskopischen, insbesondere histochemischen und cytochemischen Methoden. Dabei sollen insbesondere die auf engem Raum dicht beieinander vorkommenden verschiedenen Binde- (bzw. Stütz-) gewebeformen und ihre gegenseitigen Beziehungen zueinander studiert werden. Untersucht werden Zwischenwirbelscheiben aus verschiedenen Abschnitten der Wirbelsäule (Hals-, Brust-, und Lendenwirbelsäule). Als höherer Primat aus der Gruppe der Altweltaffen (Catarrhini) kann der Rhesusaffe in vieler Hinsicht als Modell für die mikroskopisch- anatomischen Verhältnisse beim Menschen dienen.

1.2 Allgemeine Angaben zum Aufbau der Zwischenwirbelscheibe (Discus intervertebralis)

Die funktionellen und morphologischen Baueinheiten der Primatenwirbelsäule sind die „Bewegungssegmente“. Dieser Begriff geht auf JUNGHANNS (1951) zurück und wird heute folgendermaßen definiert: Ein Bewegungssegment besteht aus dem gesamten Bereich zweier benachbarter Wirbel, die die knöcherne Grundlage des Segmentes bilden und durch die Zwischenwirbelscheibe, sowie den zugeordneten Wirbelbogengelenken und eine Reihe von Bändern miteinander verbunden sind... Zum Bewegungssegment sind auch die zugehörigen Muskeln bzw. Muskelteile zu rechnen (PUTZ und MÜLLER-GERBL, 2002). Unter klinisch-neurologischen Gesichtspunkten ist im Bereich eines Bewegungssegmentes insbesondere der Inhalt des Wirbelkanales und der Zwischenwirbellöcher von besonderem Belang (TÖNDURY und TILLMANN 2003).

Die Zwischenwirbelscheibe nimmt innerhalb eines Bewegungssegmentes eine zentrale Stellung ein und bildet mit den hyalinen Knorpelplatten (knorpelige Abschlußplatten) der Wirbelkörper, den angrenzenden knöchernen Wirbelkörperendflächen und dem Bandapparat eine Funktionseinheit.

Eine besondere Bedeutung kommt dem Discus intervertebralis hinsichtlich seines Einflusses auf die Beweglichkeit und Beanspruchbarkeit der Wirbelsäule zu. Länge und Eigenform der Wirbelsäule werden beim Menschen wesentlich von der Form der Zwischenwirbelscheiben bestimmt. Sie machen zusammen etwa ein Viertel ihrer Gesamtlänge aus und bilden durch ihre Gestalt die Grundlage für die typische Form der Wirbelsäule. Die Höhe der Scheiben nimmt von der Brust- zur Lendenwirbelsäule hin zu. Die Scheiben tragen zur normalen Krümmung der Wirbelsäule bei, da sie nicht plan parallel, sondern schwach keilförmig gestaltet sind. In der Hals- und Lendenwirbelsäule sind sie vorne höher als hinten; am stärksten verjüngt sich die lumbosakrale Bandscheibe nach hinten (TÖNDURY und TILLMANN 2003).

In der Brustwirbelsäule sind die Wirbelkörper, weniger die Zwischenwirbelscheiben, vorne etwas niedriger als hinten (KNESE, 1979).

Die Wirbelsäule des Rhesusaffen ist ähnlich gebaut wie die des Menschen, die Zahl der Wirbel unterscheidet sich jedoch zum Teil naturgemäß (SULLIVAN, 1933). Die Halsregion besteht aus sieben, die Brustregion aus zwölf, die Lendenregion aus sieben, die Sacralregion aus drei fusionierten Wirbeln. Zusätzlich ist eine lange Kaudalregion aus ca. 20 Wirbeln vorhanden, die beim Menschen sehr stark rückgebildet ist (3 bis 6 Steißwirbel). Beim Gang auf vier Füßen sind bei lebenden Tieren die Biegungen der Wirbelsäule folgendermaßen ausgebildet: die Halswirbelsäule ist üblicherweise dorsal-flektiert, Brust- und Lendenwirbelsäule sind leicht ventral-flektiert und Sakral- und Kaudalwirbelsäule sind leicht dorsal-flektiert. Über Analysen der Beweglichkeit und Haltung der Wirbelsäule des Rhesusaffen

beim aufrechten Sitzen oder Gehen oder bei anderen Körperhaltungen liegen meines Wissens keine ausführlichen Angaben vor. Beim aufrechten Sitzen sind zufolge Lebendbeobachtungen die Halswirbelsäule ventral- und Brust- und Lendenwirbelsäule dorsal flektiert (NOWAK, 1991, eigene Beobachtungen). Insgesamt ist die Beweglichkeit der Makakenwirbelsäule groß.

PEACOCK (1952) teilt die Zwischenwirbelscheibe von außen nach innen in mehrere Zonen ein:

1) den Anulus fibrosus mit einer äußeren straff-faserigen und einer inneren faserknorpeligen Zone, wobei die faserknorpeligen Zone mit ihren Lamellen den Hauptteil bildet, 2) die Grenzzone zwischen dem Faserknorpel und dem Nucleus pulposus und schließlich 3) den zentral gelegenen Nucleus pulposus.

Funktionell werden 4) die hyalinen Knorpelplatten der Wirbelkörper ebenfalls zu dem Discus intervertebralis hinzugerechnet.

1.3 Übersicht über die histo-morphologischen Kenntnisse des Discus intervertebralis

Aus zellbiologischer und allgemein histologischer Sicht bietet die Zwischenwirbelscheibe einige interessante Besonderheiten. In ihr kommen auf kleinem Raum unterschiedliche Binde- bzw. Stützgewebsformen vor und gehen hier ohne scharfe Begrenzung ineinander über:

straffes Bindegewebe, Faserknorpel, hyaliner Knorpel und das gallertige Gewebe des Nucleus pulposus. Funktionell bilden diese Gewebe eine Struktur, die manche Ähnlichkeiten mit einem Gelenk hat.

1) Die große Mehrzahl der histologischen und mikroskopisch- anatomischen Befunde am Discus intervertebralis stammen vom Gewebe des Menschen. Im Normalfall besteht die äußere Zone des Anulus fibrosus aus Lamellen straffen Bindegewebes, die innere Zone aus

faserknorpelähnlichem Gewebe, welches ohne scharfe Begrenzung in den Nucleus pulposus übergeht (TÖNDURY und TILLMANN, 2003).

KNESE (1979) beschreibt fließende Übergänge vom straffen Fasergewebe zum Faserknorpel, wie auch zum hyalinen Knorpel mit jeweils entsprechender Transformation der Zellgestalt, Anordnung und des Charakters der Fibrillen. Knorpelbestandteile der inneren Lamellen des Anulus fibrosus können in den Gallertkern einbezogen werden (BRETTSCHEIDER, 1952).

Die äußeren Faserlamellen des Anulus fibrosus sind in den Randleisten der Wirbelkörper verankert, weiter innen strahlen sie kontinuierlich in den hyalinen Knorpelbelag der Wirbeldeckplatten ein, wobei sich die Kollagenfasern des Anulus fibrosus in der hyalinknorpeligen Interzellulärsubstanz verankern. Damit entsteht eine synchondrotische Verbindung der Wirbelkörper (PUTZ und MÜLLER-GERBL, 2002). Die Fasern des Anulus fibrosus verlaufen in schräger Richtung schraubig zur Längsachse der Wirbelsäule und kreuzen sich in 10 bis 15 aufeinanderfolgenden Schichten. Auf dieser Anordnung beruht hauptsächlich die Hemmung stärkerer Bewegung der Wirbel untereinander (KNESE, 1979).

Unterliegen diese Fasern einer pathologischen Belastung, folgen degenerative Veränderungen der Wirbelkörper (Spondylosis deformans).

Die oben beschriebene Faserarchitektur dient dem Aufnehmen von Schubkräften, die vom Nucleus pulposus übertragen werden, wobei sowohl zentrische als auch exzentrische Kraftwirkungslinien in variabler Höhe des Discus intervertebralis abgefangen werden (TÖNDURY und TILLMANN, 2003).

An Zellen treten in der Zwischenwirbelscheibe Fibroblasten und Knorpelzellen auf. Die Fibrozyten kommen im Faserring vor und haben die Gestalt von Flügelzellen. Die flügel förmigen Fortsätze schieben sich zwischen die Fasermassen und nehmen stetig an Dicke ab (bis auf 70 nm).

Beim Übergang zum Faserknorpel runden sich die Zellen ab, und wandeln sich kontinuierlich in Knorpelzellen um. Sie werden von einem Hof aus spezieller Matrix umgeben. Gleichzeitig vergrößern sich die Räume mit amorpher Matrix zwischen den Kollagenfibrillen (KNESE, 1979, SCHAFFER, 1930). Die Chondrozyten haben zum Teil untypische lange, dünne Fortsätze. Einzelne Zellen zeigen Zeichen der Degeneration mit Verschwinden des endoplasmatischen Retikulums und geschrumpften Kernen, andere Zellen sind zu einem Detritus zerfallen (KNESE, 1979). Die Kapsel bzw. der Hof, (als Kapsel wird oft die proteoglykanreiche innerste Zone des Hofes bezeichnet), mit einem Durchmesser von mehr als $10 \times 15 \mu\text{m}$, enthält relativ wenig sehr dünne feine Kollagenfibrillen und besteht vorwiegend aus Proteoglykanen. In diese Matrix sind unterschiedlich große, fein homogene bzw. granuläre Areale eingelassen, die den Zusammenlagerungen bei der Elastogenese ähnlich sein sollen (KNESE, 1979). Im Hof verlaufen die feinen Kollagenfibrillen (Durchmesser 40-150 nm) häufig parallel zueinander, wobei über eine kürzere oder längere Strecke eine periodische Gliederung von 60 nm erscheint (KNESE, 1979). Beim Menschen treten faserige Elemente auf, die eine Periode von 100 nm haben (MEACHIM und CORNAH, 1970). Die Autoren sprechen von geometrisch regelmäßigen Aggregaten, die möglicherweise eine besondere Art Kollagenzusammenlagerung darstellen. Im Randgebiet des Hofes stehen die feinen Fibrillen mit den 40-150 nm dicken Kollagenfibrillen in Verbindung. Es besteht die Annahme, daß die in den Knorpelhöfen des Faserknorpels vorhandenen Proteoglykane die Bildung von feinen Kollagenfibrillen begünstigen. Im Knorpelhof treten vereinzelt amorph erscheinende, dunkel kontrastierte Massen ungeklärter Natur und Herkunft auf (MEACHIM und CORNAH, 1970). Vermutlich handelt es sich um abgestoßene und degenerierende Zellfortsätze (KNESE, 1979). Bei der Einstrahlung von kräftigeren Kollagenfaserbündeln in den hyalinen Knorpel scheinen sich dicke (40-50 nm) in dünnere (8-10 nm) Fibrillen aufzuspalten (KNESE, 1979).

Das Gesamtfeuchtgewicht des Anulus fibrosus enthält etwa zu 16% Kollagen (HALLEN, 1962; DICKSON et al., 1967; GALANTE, 1967). Die geformte Extrazellulärmatrix der Bindegewebslamellen des Anulus fibrosus setzt sich etwa zu 90% aus Kollagenfasern vor allem des Typ-I und seltener des Typ-II-Kollagens und etwa zu 10% aus elastischen Fasern zusammen. Das Typ-I-Kollagen befindet sich hauptsächlich in der Außenzone, das Typ-II-Kollagen hauptsächlich in der Innenzone am Übergang zum Nucleus pulposus (TÖNDURY und TILLMANN, 2003).

Morphologisch betrachtet stellt sich der Nucleus pulposus als undeutlich begrenzter, weichschleimiger Gallertkern mit einem feinen Faserwerk und wenigen rundlichen oder sternförmigen Zellen dar (BRETTSCHEIDER, 1952). Der Nucleus pulposus besteht hauptsächlich aus Typ-II-Kollagen, wobei sich der Anteil dieses Kollagentyps mit zunehmendem Alter erhöht. Bis zum mittleren Lebensalter bestehen die Glykosaminoglykane zu gleichen Anteilen aus Chondroitin-6-Sulfat und Keratansulfat, wobei mit zunehmendem Alter Dermatansulfat an deren Stelle tritt (TÖNDURY und TILLMANN, 2003). Chondroitin-6-Sulfat, Keratansulfat und Dermatansulfat übernehmen als hochpolymere, kovalent an Proteine gebundene Aminozuckerbindungen den verbindenden Teil der gallertigen Grundsubstanz, in dem sie Kollagenfibrillen miteinander verfilzen und andererseits einen Diffusionsraum schaffen. Außerdem binden Glykosaminoglykane K^+ , Na^+ , Ca^{2+} -Ionen und vor allem viel Wasser, wodurch der Nucleus pulposus die mechanischen Eigenschaften eines Wasserkissens übernimmt (TÖNDURY und TILLMANN, 2003).

Infolge des ständigen Drucks des Körpergewichtes bei aufrechter Körperhaltung werden die Zwischenwirbelscheiben durch Abpressen einer geringen Menge von Gewebsflüssigkeit etwas niedriger. Daher kann die gesamte Körperlänge am Abend bis zu 3 cm geringer sein als am Morgen nach der Bettruhe (PUTZ und MÜLLER-GERBL, 2002). Im Alter sind diese

Schwankungen geringer, da die Zwischenwirbelscheiben durch Wasserverlust von vornherein schmaler sind und damit auch ihre Nachgiebigkeit reduziert ist.

Der Nucleus pulposus übt unter normalen Bedingungen immer einen Druck auf seine Nachbarschaft aus und versucht die Wirbel auseinander zu treiben. Gehindert wird er daran durch den Anulus fibrosus und durch Bänder, die Wirbelkörper und Bandscheiben in der ganzen Länge der Wirbelsäule vorn und hinten verbinden.

Das vordere Längsband, *Ligamentum longitudinale anterius*, verbindet die Wirbelkörper ventral und überspannt die Zwischenwirbelscheiben, ohne sich mit diesen fester zu verbinden. Umgekehrt haftet das hintere Längsband, *Ligamentum longitudinale posterius*, fest an den Zwischenwirbelscheiben, überspringt in der etwas ausgehöhlten Mitte die Wirbelkörper, die Austrittslöcher der Venae basivertebrales, und strahlt zusätzlich in die obere Randleiste und in das Periost der Pediculi ein. Die Bänder werden durch den inneren Druck der Zwischenwirbelscheiben in Spannung gehalten. Erst dadurch wird die Wirbelsäule zu einem beweglichen Stab, der nach einer Verbiegung wiederum zu seiner Ausgangsform zurückfindet. Beugt man die Wirbelsäule nach vorn, so werden die Zwischenwirbelscheiben auf der konkaven Seite niedriger und auf der entgegengesetzten Seite höher. Der Nucleus pulposus wirkt bei der Belastung als ein nicht komprimierbares Wasserkissen, das den Druck nach allen Seiten gleichmäßig verteilt und die Kollagenfasern des Anulus fibrosus dabei in Spannung versetzt. Infolge seines hohen Flüssigkeitsgehaltes ist er zwar verformbar, nicht aber komprimierbar. Dadurch hält er den Bandapparat sowohl bei axialem Druck als auch bei Verschiebung benachbarter Wirbel zueinander gespannt und überträgt den Druck gleichmäßig auf die angrenzenden Wirbelkörperendflächen. In der Ruhelage liegt der Gallertkern in der Mitte des Ringes oder mehr nach dorsal verschoben (im Brust- und Lendenbereich). Bei der Biegung verschiebt er sich etwas nach der Seite der Dehnung. Auf der Druckseite wird der Faserring zusammengepreßt, auf der Zugseite gedehnt (KNESE, 1979).

Im Nucleus pulposus bestehen nur 15-20% des Trockengewichtes aus Kollagen (HALLEN, 1962) und zwar vom Typ-II (DRENCKHAHN und HUNZIKER, 2002). Die Konzentration der Glykosaminoglykane nimmt von 14% des Trockengewichtes in der ersten Dekade auf 6% bei 90 Jahren ab (HALLEN, 1958), der Wassergehalt sinkt von 88% auf 69% (PÜSCHEL, 1930; KEYES und COMPERE, 1932; SCHÜMMELFELDER und SCHÜMMELFELDER, 1949; HEVELKE und HEVELKE, 1960).

In den nicht ganz regelmäßig verlaufenden Bindegewebszügen der äußeren Bezirke des Nucleus pulposus befinden sich vereinzelte Knorpelzellen (PEACOCK, 1952). Es schließen sich nach innen lamellenartige bindegewebige Strukturen an, die zum Zentrum breiter werden. Die Anzahl der Knorpelzellen vergrößert sich (KNESE, 1978). Nach STRASSER 1913, FRANCESCHINI, 1948, 1957, BRETTSCHEIDER, 1952, NAYLOR, 1962 scheint in den Lamellen eine rechtwinklige Kreuzung von Fasern stattzufinden.

Die Spongiosagefäße der Wirbelkörper und die Blutgefäße der Disci intervertebralis sind zu Beginn der Entwicklung voneinander getrennte Systeme, wobei die Knorpelplatte die Grenze zwischen beiden Versorgungsgebieten darstellt (TÖNDURY und TILLMANN, 2003).

FICK (1904); BRACK (1929); und PEACOCK (1952) beschreiben Blutgefäße ausschließlich im Anulus fibrosus, bei Kindern im Gebiet der knorpeligen Endplatte (ÜBERMUTH 1929, 1930; COVENTRY et al. 1945a). Die fetale Zwischenwirbelscheibe hat, vor allem dorsal, reichlich Blutgefäße (BRETTSCHEIDER, 1952), die aus der Gegend um die Foramina intervertebralia stammen (TÖNDURY, 1958). Beim Neugeborenen dringen die Gefäße von der Peripherie in die oberflächlichen Schichten ein. Sie bilden sich vom zweiten Jahr an zurück und fehlen nach dem vierten Lebensjahr (BRETTSCHEIDER, 1952, TAYLOR et al., 1992). Der Gallertkern wird nicht versorgt (KEYES und COMPERE, 1932, BRETTSCHEIDER, 1952).

2) Zur mikroskopischen Anatomie der Zwischenwirbelscheibe von Rhesusaffen liegen bisher keine Untersuchungen vor. Da in makroskopisch- morphologischer und physiologischer Hinsicht kaum wesentliche Unterschiede zwischen der Wirbelsäule der Makaken und des Menschen bestehen, können Untersuchungen an der Wirbelsäule des Makaken modellhaft für die Verhältnisse beim Menschen angesehen werden. Es soll jedoch darauf hingewiesen werden, daß a) aufgrund des unterschiedlichen Körpergewichtes und b) aufgrund der unterschiedlichen Lebensweise nicht völlige morphologische Übereinstimmungen zwischen einem höheren Affen und dem Menschen zu erwarten sind. Während der relativ große und schwere Mensch sich ganz überwiegend aufrecht auf zwei Beinen fortbewegt, ist die Körperhaltung der relativ kleinen und leichten Makaken sehr variabel, sie laufen im allgemeinen auf vier Beinen, können aber auch aufrecht stehen und sich sogar aufrecht fortbewegen. Im Sitzen nehmen sie meistens eine aufrechte Rumpfhaltung ein. Ein weiterer Unterschied betrifft das hochentwickelte Sprungvermögen der Makaken.

1.4 Degenerative Veränderungen der Wirbelsäule des Menschen und Krankheitssymptome

Alle an der Bewegung beteiligten Strukturen der Wirbelsäule (Wirbel, Zwischenwirbelscheiben, Intervertebralgelenke, Deck- und Grundplatten der Wirbelkörper, Ligamente) unterliegen im Laufe des Lebens einem natürlichen Abnutzungsprozeß, der sich am ehesten und stärksten dort abspielt, wo die Beanspruchung am größten ist. Dies sind beim Menschen vor allem die Umschlagstellen der physiologischen Krümmungen der Wirbelsäule und die Übergänge von gut zu weniger beweglichen Abschnitten: in erster Linie die Lumbosakralregion, dann die untere Halswirbelsäule (C4-C6), je nach der Rückenform und Besonderheiten der Belastung auch die untere Brust- sowie die obere Halswirbelsäule mit der Verbindung zum Hinterhaupt.

Degenerative Veränderungen an der Wirbelsäule müssen nicht mit Beschwerden verbunden sein, sind aber ein beträchtliches Krankheitspotential von großer sozialmedizinischer Bedeutung (RÖSSLER und RÜTHER, 2000).

Die meisten degenerativen Wirbelsäulenerkrankungen gehen direkt oder indirekt von den Zwischenwirbelabschnitten aus. Die durch Bandscheibendegeneration hervorgerufenen Krankheitsbilder werden als Wirbelsäulensyndrome bezeichnet. Wirbelsäulensyndrome sind sehr häufig, führen zu 20% aller krankheitsbedingten Ausfälle (Krankschreibungen) und sind in fast 50% Gegenstand vorzeitig gestellter Rentenanträge (KRÄMER, 1993).

Je nach Lokalisation unterscheidet man *Zervikal-, Thorakal- und Lumbalsyndrome*. Zwei Drittel der Erkrankungen entfallen auf den unteren Abschnitt der Lendenwirbelsäule, etwa ein Drittel auf die Halswirbelsäule und nur ein geringer Anteil von etwa 2% betrifft die Brustwirbelsäule. Bleiben die Beschwerden auf die betroffenen Wirbelsäulenregion beschränkt, spricht man von *lokalem Zervikal-, Thorakal- oder Lumbalsyndrom*. Strahlen die Schmerzen durch Wurzelkompression oder pseudoradikuläre Symptomatik in die Extremitäten aus, so bezeichnet man diese Syndrome als *Zervikobrachialgie* bzw. an der Lendenwirbelsäule als *Lumbo-ischialgie*. An der Brustwirbelsäule ersetzt man jetzt die vorher übliche Bezeichnung "Intercostalneuralgie" mit *thorakalem Wurzelsyndrom*.

Alle mit der Bandscheibendegeneration zusammenhängenden biomechanischen und pathologisch-anatomischen Veränderungen am Zwischenwirbelabschnitt bezeichnet man als "*Diskose*". Dazu gehören Quelldruckverlust, Rißbildungen und Zermürbungserscheinungen, die den Zustand der Lockerung der Zwischenwirbelscheibe ergeben. *Spondylose* und *Osteochondrose* sind knöcherne Reaktionen der angrenzenden Wirbelanteile und stellen keine Diagnose sondern nur ein röntgenologisches Symptom der durchgemachten Bandscheibenlockerung dar.

Im Rahmen der Bandscheibendegeneration kommt es zu intradiskalen Massenverschiebungen mit Sequesterbildung. Für den therapeutischen Ansatz ist entscheidend, ob das nach dorsal verschobene Bandscheibengewebe nur zu einer *Protrusion*, d. h. Vorwölbung des noch erhaltenen Anulus fibrosus, geführt hat oder ob der Sequester unter Perforation der äußeren Bandscheibenbegrenzung als *Prolaps* bzw. Vorfall nach außen getreten ist.

Anhaltend starke axiale Druckbelastungen durch den aufrechten Gang und verlangsamter Stoffaustausch im Zwischenwirbelabschnitt durch mangelnde Bewegung sind wesentlich für das frühzeitige Auftreten degenerativer Veränderungen der Bandscheiben. Blutgefäßlose bradytrophe Gewebe neigen ohnehin zu rascher Alterung, insbesondere dann, wenn statisch-mechanische Belastungen hinzukommen.

Lumbale Bandscheiben stellen die größten zusammenhängenden, nichtvaskularisierten Gebilde im Organismus dar. Neben vertikaler Wirbelsäuleneinstellung und Haltungskonstanz wirken auch anlagebedingte Faktoren beim Auftreten degenerativer Bandscheibenveränderungen mit. Genetische Faktoren sollen u. a. für die Qualität und Anordnung der Kollagenfasern im Anulus fibrosus verantwortlich sein (Krämer, 1993).

Die Involution der Zwischenwirbelscheiben beginnt schon gegen Ende des Wachstumsalters. Nach dem 20. Lebensjahr läßt die Fähigkeit des Nucleus pulposus, Wasser zu binden, deutlich nach und nimmt im 3. Dezennium rapide ab. Im Anulus fibrosus kommt es unter dem Einfluß der funktionsmechanischen Beanspruchung (Belastung und Bewegung) zu Strukturauflockerung und Auffaserung; es bilden sich Spalten und Risse. Der geschwächte Faserring ist dem Innendruck des Nucleus pulposus nicht mehr gewachsen: er buckelt sich vor (*Protrusio*) oder läßt Anteile des Gallertkerns durch seine Faserschichten hindurch nach außen dringen (*Nucleus-pulposus-Prolaps, Bandscheibenvorfall*). Geschieht dies in dorsaler Richtung zum Wirbelkanal hin (unter Vorwölbung bzw. Durchwanderung des Lig. longitudinale dorsale),

werden das Rückenmark bzw. die Fasern der Cauda equina komprimiert (medianer Prolaps). Bei dem häufigeren dorsolateralen Vordringen kommt es vornehmlich zur Druckschädigung der Spinalwurzel. Diese als *Chondrosis intervertebralis* bezeichneten Vorgänge werden durch die Reaktion der angrenzenden knorpelig-knöchernen Wirbelabschlußplatten bald zur *Osteochondrosis intervertebralis*, die sich im Röntgenbild nicht nur durch eine Verschmälerung des betroffenen Intervertebralspaltes zu erkennen gibt (wie die Chondrose), sondern auch durch Unregelmäßigkeit der knöchernen Endflächenkonturen und reaktiven Knochenverdichtung (RÖSSLER und RÜTHER 2000).

Durch die Höhenabnahme der Bandscheibe läßt die auf eine bestimmte Distanz ausgelegte Spannung des Bandapparates nach, und die bisher durch diese Bandspannung und die distrahierende Kraft der Bandscheibe aufrechterhaltene Stabilität im Segment geht verloren. Diese Lockerung veranlaßt zu ständiger (unbewußter) Haltungskorrektur durch die Muskulatur mit fortgesetzten Zerrungsreizen der sensibel versorgten Bänder und Gelenkkapseln sowie auch zu verstärkter Flächenpressung der Intervertebralgelenke mit daraus folgenden Beschwerden (Facettensyndrom). Sie äußern sich als lokale Rückenschmerzen oder werden in die Muskulatur, bei der Irritation von Nervenwurzeln auch von diesen fort, geleitet.

Eine weitere Folge der Höhenabnahme des Zwischenwirbelraumes ist die Lageabweichung des höherstehenden Wirbels: Er kann in einer bestimmten, meist um die Längsachse rotierten Stellung blockiert oder um ein geringes nach hinten verlagert werden (Dorsaldislokation).

Aus der vermehrten und pathologischen Beanspruchung der Intervertebralgelenke resultiert der gleiche Vorgang wie bei der Arthrosis deformans an anderen Körpergelenken: Es kommt zur *Spondylarthrosis deformans* mit Knorpeldegeneration und Bildung von osteophytären Randwucherungen, die ihrerseits eine Raumbeeinträchtigung im Foramen intervertebrale zur Folge haben können.

Höhenminderung des Intervertebralraumes mit Ausweitung des Anulus fibrosus und Abheben der Bänder von den Wirbelkörperkanten üben dort unter dem Einfluß der ständigen Bewegungsreize eine reaktive Knochenneubildung aus, die zur Bildung wulst-, sporn- und spangenförmiger Osteophyten führt: *Spondylosis deformans*.

Im Laufe der Zeit nähern sich die benachbarten Wirbelkörper immer mehr, bis es durch bindegewebige Obliteration zu einer spontanen Abstützung kommt. Wie bei der Arthrosis deformans tritt dabei keine knöcherne Verbindung ein, aber durch die nunmehr eintretende "Ruhe im Bewegungssegment" hören gewöhnlich die Beschwerden auf. Es kann aber jederzeit zu neuerlichen Schmerzen kommen.

Involution und Degeneration sind schicksalhafte Vorgänge, auf deren Beginn, Zeitablauf und Intensität genetische und stoffwechselbedingte Gegebenheiten (Konstitution) ebenso Einfluß haben wie berufliche und andere Belastungsmodalitäten, Haltungsfehler und traumatische Einwirkungen. Die damit verbundenen Veränderungen stellen ein beträchtliches Krankheitspotential dar, das bei den meisten Menschen früher oder später zu Beschwerden führt, aber keineswegs führen muß (RÖSSLER und RÜTHER, 2000).

2 Material und Methoden

2.1 Material

Die in dieser Studie verwendeten Gewebe entstammen der Wirbelsäule von fünf adulten männlichen Rhesus-Affen (*Macaca mulatta*) aus dem Deutschen Primatenzentrum (DPZ) Göttingen, sowie von zwei Pavianen (*Papio anubis*), die im Rahmen anderer genehmigter wissenschaftlicher Projekte geopfert wurden. Den Professoren F. J. Kaup, E. Fuchs und U. Jürgens (alle DPZ) bin ich für die großzügige Überlassung von bereits fixiertem Wirbelsäulenmaterial der Rhesusaffen sehr dankbar. Das Pavianmaterial überließ mir freundlicherweise Herr Dr. med. Stefan Milz, Anatomische Anstalt der LMU, dem ich für das Material sehr dankbar bin. Das Pavianmaterial wurde für diese Studie nur als „interner“ Vergleich herangezogen und ist im Text nicht erwähnt.

2.2 Präparation und Fixation der Gewebe für Paraffinschnitte

Das frisch entnommene Gewebe wird ohne Zeitverzögerung in eine gepufferte Fixationslösung, bestehend aus einem Teil 37% Formaldehyd und neun Teilen 0,1 M Phosphatpufferlösung gegeben. Nach 24 Stunden haben sich die Proteine vollständig vernetzt, wodurch eine Fixation des Gewebes erreicht wird. In einer aufsteigenden Alkoholreihe (drei mal aufeinanderfolgend jeweils für acht Stunden Gewebelagerung in 70%igem Alkohol, danach Gewebelagerung in 80%igem Alkohol für acht Stunden, anschließend Gewebelagerung in 96%igem Alkohol für ebenfalls acht Stunden, daraufhin zweimal jeweils zehnstündige Lagerung des Gewebes in 100%igem Alkohol, dann einmal Baden des Gewebes für vier Stunden in Xylol, anschließend zweimal jeweils für drei Stunden Baden des Gewebes in Xylol) wird das Gewebe dehydriert. Für eine Dauer von 15 Stunden wird das Gewebe in flüssiges Paraffin eingelegt, anschließend noch einmal für 5 Stunden in einem weiteren

Paraffinbad gelagert. Anschließend erfolgt die Einbettung der Gewebeproben in einem auf 56°C erwärmten flüssigen Paraffin-Kunststoffgemisch in Einbettkassetten. Nach halbstündigem Auskühlen auf der gerätezugehörigen Kühlplatte sind die Gewebelöcke schneidbar.

2.3 Anfertigen der Paraffinschnitte

Für diese Methode werden spezielle, mit einer einseitigen elektrostatisch anziehenden Beschichtung versehenen Objektträger verwendet.

Die in Paraffinblöcke eingebetteten Gewebe werden mit dem Mikrotom in 5 µm dicke Schichten geschnitten, mit einer Pinzette oder einem Pinsel aufgenommen und auf die Oberfläche des dem Objektträger aufliegenden destillierten Wassers aufgelegt. Mit Hilfe einer Wärmeplatte werden die Objektträger und das ihnen aufliegende destillierte Wasser konstant bei einer Temperatur von 37°C gehalten, wodurch sich die bei Raumtemperatur befindlichen Paraffinschnitte strecken und somit von Faltungen befreien können. Auf dieser Wärmeplatte trocknen die Paraffinschnitte an und werden anschließend für 24 Stunden bei 37°C in einem Wärmeschrank vollends durchgetrocknet, wodurch eine Lagerungsfähigkeit von mehreren Monaten bei Raumtemperatur erreicht wird.

2.4 Färbemethoden

2.4.1 Masson-Trichrom-Färbung (Bindegewebs-Übersichts-Färbung)

Soweit nicht anders angegeben, wurden die Methoden nach den Vorschriften von ROMEIS (1989) durchgeführt.

Diese Färbemethode setzt sich aus den folgenden drei Färbungen zusammen:

1. Celestin-Blau-Hämalaun-Färbung, bei der sich die Zellkerne und Sekretgranula blau-schwarz färben,
 2. Säurefuchsin-Färbung, bei der das Zytoplasma, die Muskelzellen und Erythrozyten rot gefärbt werden,
 3. Methylblau-Färbung, bei der Kollagen und saure Mukosubstanzen blaue Farbe annehmen.
-
- 1.) Nach dem Entparaffinieren und Rehydrieren in absteigender Alkoholreihe (2 x 10 Minuten Xylol, jeweils 5 Minuten in Alkohol mit einer Konzentration von 100%, 95%, 90%, 80%, 70%, 60%, 5 Minuten destilliertes Wasser) werden die Schnitte in Leitungswasser gespült und noch feucht für 5 Minuten in Celestin-Blau-Hämalaun-Färbelösung gebadet. Kurzes Spülen in Leitungswasser entfernt die überschüssige Färbelösung aus dem Gewebe. Anschließend werden die Schnitte 5 Minuten lang in Hämatoxylin gefärbt. Unter fließendem Leitungswasser erfolgt daraufhin für 10 Minuten das sogenannte Bläuen, bei dem überschüssige Färbelösung ausgespült, der pH-Wert neutralisiert wird und die Färbung der Zellkerne von rot ins bläuliche umschlägt.
 - 2.) Nun erfolgt die Säurefuchsin-Färbung durch 5 minütiges Baden der Schnitte in Säurefuchsin-Lösung und anschließendes kurzes Spülen in Leitungswasser. Daraufhin werden die Schnitte für 5 Minuten in Phosphormolybdän-Säure gebadet.
 - 3.) Nach gründlichem Abtropfen der Phosphormolybdän-Säure erfolgt eine 5 minütige Färbung in Methylblau-Lösung mit anschließendem Spülen in fließendem Leitungswasser, zweiminütiges Baden in 1%iger Essigsäure schließt die Färbereihe ab.

Zur Fixation der gefärbten Gewebeschnitte werden die Präparate in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert (jeweils 5 Minuten in dest. Wasser, 60% Alkohol, 70% Alkohol, 80%

Alkohol, 90% Alkohol, 95% Alkohol, 100% Alkohol), zweimal für jeweils 10 Minuten in Xylol gebadet und mit Eukitt und einem Deckgläschen eingedeckt. Nach etwa 24 Stunden ist das Präparat ausgehärtet und fixiert.

2.4.2 Azan-Färbung

Nach dem Entparaffinieren und Rehydrieren in absteigender Alkoholreihe, (s. o.) werden die Gewebeschnitte für eine Dauer von 10–15 Minuten in eine im Wärmeschrank vorgewärmte Azokarminlösung bei 56°C gestellt. Anschließend werden die Schnitte mit dest. Wasser abgespült. Mit einer Anilin-Alkohol-Lösung (1ml Anilinöl auf 1000 ml 96%igen Alkohol) werden die Gewebeschnitte soweit entfärbt, bis nur noch die Zellkerne rot gefärbt sind. Um die Entfärbungsreaktion abubrechen, werden die Schnitte in Essigsäure-Alkohol (1 ml Eisessig auf 100 ml 96%igen Alkohol) ausgewaschen. Anschließend ein- bis dreistündiges Beizen in 5%iger wäßriger Phosphorwolframsäure. Daraufhin erfolgt ein kurzes Spülen in aqua dest., und ein 1 – 3-stündiges Färben in Anilinblau-Orange G-Essigsäure. Abschließend wird das Material mit dest. Wasser ausgespült, in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert und mit Eukitt und Deckgläschen eingedeckt.

Die Azan-Färbung markiert kollagene Bindegewebsfasern scharf blau, Interzellulärsubstanz im hyalinen Knorpel blaßblau, Zellkerne rot, Muskelgewebe rötlich bis orange, Erythrozyten rot, saure Mukosubstanzen blau, und elastische Fasernetze und elastische Membranen blaßrot.

2.4.3 Alcianblau-Färbung

Die Alcianblaufärbung zur Markierung von Polyanionen wird bei verschiedenen pH-Werten durchgeführt (SCOTT, J. E., 1996):

- a) mit dem pH-Wert von 2,5;
- b) mit dem pH-Wert von 1,0;

Für (a) die AB 2,5-Färbung wird 1 g Alcianblau in 3%iger Essigsäure gelöst und gefiltert, für (b) die AB 1,0-Färbung 1g Alcianblau in 0,1 M Salzsäure (niedrigere pH-Werte analog).

Nach der Rehydratation (s. o.) werden die Gewebeschnitte für drei Minuten in 3%iger Essigsäure (a) bzw. 0,1 M Salzsäure (b) gebadet, und anschließend für 30 Minuten in der jeweiligen Alcianblaulösung gefärbt. Anschließend wird der Farbüberschuß mit destilliertem Wasser ausgespült und die Gegenfärbung mit Kernechtrot für 3-5 Minuten durchgeführt. Wieder wird der Farbüberschuß mit destilliertem Wasser ausgespült, das Gewebe dehydriert und eingedeckt.

2.4.4 Lektin-Färbungen

Mit Hilfe der Lektinfärbungen werden im Gewebe bestimmte -im allgemeinen an Proteine gebundene- Zucker nachgewiesen, wobei die biologische Funktion der meisten Lektine bis dato nicht eindeutig geklärt ist (BROOKS et al. 2002).

Nach der Entparaffinierung der Schnitte in einer absteigenden Alkoholreihe (2 mal 5 Minuten Xylol, 2 Minuten 100% Alkohol, 2 Minuten 96% Alkohol, 2 Minuten 80% Alkohol, 1 Minute 70% Alkohol, 1 Minute 50% Alkohol, 5 Minuten destilliertes Wasser), wird die endogene Peroxidase mit 3%igem H_2O_2 (0,15 M NaCl, 203 ml PBS, 21 ml 30% H_2O_2) für 10 Minuten unter Lichtabschluß geblockt und anschließend für 15 Minuten in PBS in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur gepuffert (1% BSA in 0,01 M PBS bei 0,15 M NaCl). Daraufhin wird das jeweilige Lektin in seiner Verdünnung mit PBS entsprechend der Spezifität auf den Objektträger pipettiert, bei 4°C in einer feuchten Kammer für etwa 12 Stunden inkubiert und wieder in PBS gepuffert (2 mal 10 Minuten). Die eigentliche Anfärbung des an das je-

weilige Lektin gekoppelten Zuckers erfolgt mit DAB (1 ml DAB in PBS, 0,15 M NaCl, unter Zugabe von 2 ml H₂O₂ 3% als Katalysator) unter Lichtabschluß. Nach KLEIN 1991 wird unter oxidativer Polymerisation des DAB (Diaminobenzidin) und gleichzeitiger Zyklisierung ein unlösliches Polymer gebildet, das durch seine zahlreichen Doppelbindungen braun erscheint. Aufgrund seiner Unlöslichkeit sowohl in wässrigen Lösungen, als auch in Lipiden, ist das Polymer ortsständig fixier- und konservierbar.

Tab. 1: Verwendete Lektine und ihre Zuckerspezifität (nach BROOKS et al. 2002)

Lektin	Abkürzung	Zuckerspezifität
Lens culinaris Agglutinin	LCA	Mannose
Wheat germ agglutinin (Weizenkeim-Agglutinin)	WGA	N-acetylglucosamin
Maclura pomifera Agglutinin	MPA	Galactose
Peanut agglutinin (Erdnuß-Agglutinin)	PNA	Galactose
Wistaria floribunda Agglutinin	WFA	N-acetylgalactosamin
Helix pomatia Agglutinin	HPA	N-acetylgalactosamin
Ulex europaeus Agglutinin Typ-I	UEA I	Fucose
Canavalia ensiformis Agglutinin	ConA	D-Mannose

Um die Spezifität der Reaktion zu gewährleisten, werden die Schnitte mit der jeweiligen Zuckerlösung vorinkubiert und anstelle des Lektins nur mit dem Puffer beschickt.

2.4.5 PAS-Färbung (Periodic acid Schiff)

Die PAS-Färbung dient dem Nachweis von unsubstituiertem 1,2-Glykolen (neutrale Carbohydrate). Als erster Arbeitsschritt erfolgt das Entparaffinieren analog den oben genannten Methoden. Anschließend wird das Gewebe für 10 Minuten bei Raumtemperatur in 1%iger wäßriger Perjodsäurelösung oxidiert. Darauf folgt dreimaliges Spülen in destilliertem Wasser, 15-minütiges Einstellen in Schiff'scher Reagenz und Spülen in Sulfitwasser (18 ml 10%iger wäßriger Lösung von Natriumdisulfit in 300 ml Aqua dest., sowie 15 ml N HCl) (3 mal jeweils 2 Minuten), sowie 15 minütiges Spülen in Leitungswasser. Abschließend werden die Zellkerne mit Hämatoxylin gegengefärbt, die Gewebe erneut in destilliertem Wasser gespült, dehydriert und eingedeckt.

PAS-positive Strukturen färben sich gegenüber der zartrosa Hintergrundfärbung kräftig rotviolett. Neben Glykogen reagieren unter anderem neutrale Mukosubstanzen und Glykoproteine positiv.

2.4.6 Immunhistochemischer Nachweis von Dermatansulfat und Decorin

Für den immunhistochemischen Nachweis von Dermatansulfat und Decorin werden die Schnitte in einer absteigenden Alkoholreihe entparaffiniert und rehydriert, und die endogene Peroxidase 5 min. mit H₂O₂ 3% unter Lichtabschluß geblockt. Anschließend werden die Gewebeschnitte mit PBST (Phosphat buffered saline und 0,5% Tween 20) gepuffert.

Die unspezifischen Bindungen werden 10 min. lang mit Reagenz A (ZYMED) minimiert und anschließend für 60 min. der Primärantikörper (Dermatansulfat oder Decorin 1:10 verdünnt in PBST) aufpipettiert. Danach werden die Gewebeschnitte 3 mal mit PBST gespült. Der Sekundärantikörper (Reagenz B, ZYMED) wird für eine Einwirkzeit von 10 min. auf die Gewebeschnitte aufgetragen, und anschließend wieder 3 mal mit PBST gespült. Daraufhin wird

Reagenz C (Enzym-konjugat, ZYMED) für 10 min. auf die Schnitte aufgetragen, und anschließend wieder 3 mal mit PBST gespült. Im Anschluß daran erfolgt eine 5 minütige Einwirkzeit von Reagenz D (AEC-Single Solution=3-Amino-9-Ethylcarbazol), danach werden die Schnitte in destilliertem Wasser gespült, in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert und mit Kaisers Glyceringelatine fixiert.

2.4.7 Immunhistochemischer Nachweis von Chondroitin-6-Sulfat

Der immunhistochemische Nachweis von Chondroitin-6-Sulfat erfolgt durch Entparaffinieren und Rehydrieren der Gewebeschnitte in einer absteigenden Alkoholreihe. Die Schnitte werden in destilliertem Wasser gespült und 60 min. mit 0,25 U/ml Chondroitinase bei 37°C vorinkubiert. Anschließend wird die endogene Peroxidase 5 min. lang mit 3% H₂O₂ geblockt, das Gewebe mit destilliertem Wasser gespült und mit PBST (phosphat buffered saline und 0,5% Tween 20) gepuffert. Um unspezifische Bindungen auszuschließen wird das Gewebe 10 min. lang mit Reagenz A (ZYMED) inkubiert und danach 3 mal mit dem Puffer gespült. Der Primärantikörper in einer Verdünnung von 1:100 wird für 60 min. aufgetragen. Anschließend erfolgt dreimaliges Spülen mit dem Puffer, und das 10 minütige Bebrüten mit dem Sekundärantikörper (Reagenz B, ZYMED). Daraufhin werden die Schnitte erneut 3 mal im Puffer gespült und mit dem Reagenz C (Enzym-Konjugat, ZYMED) für eine Einwirkzeit von 10 min. versehen. Nach dreimaligem Spülen der Gewebeschnitte im Puffer erfolgt die Anfärbung der Reaktionsprodukte mit DAB (5 min. Einwirkzeit von 3´3-Diaminobenzidin-Tetrachlorid). Überschüsse werden durch Spülen in destilliertem Wasser entfernt. Abschließend werden die Gewebeschnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert, in Xylol überführt und mit Entellan eingedeckt.

2.4.8 Monoclonal-Mouse-Anti-Human-Zymed-Ki-67-Antigen-Reaktion

Dieser von der Firma ZYMED (San Francisco, USA) produzierte monoklonale Antikörper reagiert mit dem sogenannten Ki-67-Immunogen-Antigen, welches in den Kernen aller proliferierenden menschlichen Zellen exprimiert wird.

Nach dem bereits oben erwähnten Entparaffinierungsschema werden die Schnitte drei mal mit destilliertem Wasser für jeweils zwei Minuten gewässert und mit kochendem 0,01 M Citratpuffer im pH 6,0 für 10 Minuten gepuffert. Anschließend werden die Gewebeschnitte bei Raumtemperatur für 20 Minuten abgekühlt, und in PBS gebadet. Nun wird der Antikörper aufpipettiert und für 60 Minuten bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert. Danach folgt eine zehnminütige Spülung der Schnitte in PBS, um überschüssige nicht gebundene Antikörper auszuspülen.

Zur farbigen Markierung wird die DAB-Reaktion im Tauchbad unter Lichtabschluß durchgeführt. 0,07 g Diaminobenzidin und 0,05 g Imidazol werden in Lösung mit 70 ml Tris HCl gegeben und mit 50 ml H₂O₂ 30% wird die Reaktion gestartet. Nach zwei Minuten wird die Reaktion mit PBS, ebenfalls als Tauchbad, gestoppt. Anschließend werden die Gewebeschnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert und eingedeckt.

2.4.9 PCNA-(Proliferating Cells Nuclear Antigen)-Färbung

Der immunhistochemische Nachweis proliferierender Zellen erfolgte mit Hilfe eines monoklonalen Antikörpers (DAKO) gegen das „proliferating cell nuclear antigen“ bei einer Verdünnung von 1:200. Die Schnitte wurden zweimal mit Mikrowellenerwärmung vorbehandelt, nachdem sie zuvor jeweils 10 Minuten lang im Citratpuffer bei pH 6,0 gelegt worden waren. Der primäre Antikörper wurde mittels biotinyliertem Ziegen-Anti-Maus IgG (Sigma, Verdünnung 1:1000) nachgewiesen. Die Schnitte wurden zum Teil mit Hämatoxylin gegen-

gefärbt. Positivkontrollen erfolgten mit Hilfe von Schnitten des Dünndarmes des Menschen. Bei den Negativkontrollen wurde der primäre Antikörper durch irrelevante Maus-Antikörper oder Nicht-Immun-Mausserum ersetzt.

2.4.10 Objektträger für Semidünnschnitte

Standardisierte Glasobjektträger werden mit einer Lösung aus 1 µg Poly-L-Lysin pro 1 ml TBS-Puffer 1 Stunde lang benetzt und 12 Stunden lang bei 37°C im Brutschrank getrocknet.

2.4.11 Anfertigen der Semidünnschnitte

Zur Lokalisation der Schnitttiefe für die späteren Ultradünnschnitte werden vorerst Semidünnschnitte angefertigt.

Mit einer Skalpellklinge wird aus dem etwa 1 cm x 0,5 cm x 0,5 cm großen Kunststoffgewebepblock eine pyramidenförmige Probe geschnitten, die eine Grundfläche von 3 mm x 3 mm und eine Höhe von 1 mm nicht überschreitet. Aus dieser Probe werden mit einem Mikrotom 1 µm dicke Schnitte geschnitten und auf der Oberfläche eines kleinen Wasserbeckens aufgefangen. Die Oberflächenspannung des destillierten Wassers trägt die Semidünnschnitte, so daß sie mit einem Glasstab entnommen werden und auf die Poly-Lysin-beschichteten Objektträger aufgetragen werden können. Eine Streckung und Trocknung der Schnitte erfolgt analog den Paraffinschnitten.

2.4.12 Objektträger für Ultradünnschnitte

Kleine, handelsübliche, mit Polyvinylformal beschichtete kreisrunde Metallnetze, die sogenannten Nickelgrids, dienen für die Elektronenmikroskopie als Objektträger.

2.4.13 Anfertigen der Ultradünnschnitte

An einem Ultracut E-Mikrotom werden mit einer Diamantklinge 40 nm bis 60 nm dicke Schnitte aus der pyramidenförmigen Kunststoff-Gewebeprobe geschnitten. Die optische Kontrolle der Schichtdicke erfolgt über die grau-silbrige Farberkennung mit bloßem Auge. Von der Wasseroberfläche des Auffangbeckens werden die Gewebeschnitte mit Polyvinylformal beschichteten Nickelgrids entnommen.

2.4.14 CMB-Färbung (Cupromeronic-Blue-Färbung)

Glycosaminoglycane (GAGs) wurden mit cupromeronomischem Blau (CMB) und Scotts kritischer Elektrolytkonzentrationsmethode gefärbt (SCOTT und HAIGH, 1988). Mit Hilfe dieser Methode werden sulfatierte Glycosaminoglycane als Saccharidkomponenten von Proteoglycanen selektiv gefärbt und können als elektronendichte nadelförmige Präcipitate im Elektronenmikroskop sichtbar gemacht werden.

Die Gewebeprobe wurde 3 x 10 min. in 0.2 M Acetatpuffer (pH 5,6) gewaschen und dann über Nacht in 1% CBM (Aldrich Chemie, Steinheim) gefärbt. Das CBM war in 0.2 M Acetatpuffer, der 0.3 M MgCl₂ enthielt, gelöst. Nach 3 x 20 minütigem Auswaschen in der selben Lösung ohne Farbstoff wurde das Gewebe eine Stunde lang in 0,5% NaWO₄ über Nacht gefärbt. Das Gewebe wurde dann in Ethanol dehydriert und zwei Stunden lang in eine gesättigte Lösung von Uranylнитrat in 70% Ethanol eingelegt. Es folgte 3 x 20 min. Auswaschen in 70% Ethanol. Nach weiterer Dehydrierung in Ethanol wurden die Gewebeprobe in Propylenoxyd überführt und in Araldit (Merck) eingebettet.

Ultradünnschnitte wurden in einem Philips CM 10-Elektronenmikroskop untersucht. Für die Untersuchung des Bandenmusters der Kollagenfibrillen wurden die Schnitte für 20 min. in einer gesättigten Lösung von Uranylacetat in Methanol gefärbt.

2.4.15 Photodokumentation der Ergebnisse

Über das Elektronenmikroskop Philips CM 10 werden die Dünnschnitte mit einer integrierten Kamera Agfa Pan 100 der Firma Agfa fotografiert. Die Negative wurden in einer Standarddunkelkammer von Hand entwickelt und abgezogen. Die lichtmikroskopischen Präparate wurden mit einem Olympus-Photomikroskop (BH-Z) auf Diafilm (Fujichrome, 64 T) aufgenommen und in einem gewerblichen Labor entwickelt und abgezogen.

3 Befunde

3.1 Allgemeiner histologischer Aufbau der Zwischenwirbelscheibe bei *Macaca mulatta*.

Die vorliegende Untersuchung hat gezeigt, daß die Zwischenwirbelscheibe des Rhesusaffen grundsätzlich ähnlich aufgebaut ist wie beim Menschen, so daß hier auch die aus der Humanhistologie bekannten Termini gebraucht werden können.

In der Zwischenwirbelscheibe lassen sich unterschiedliche Bereiche feststellen, die schematisch auf den folgenden Zeichnungen dargestellt sind:

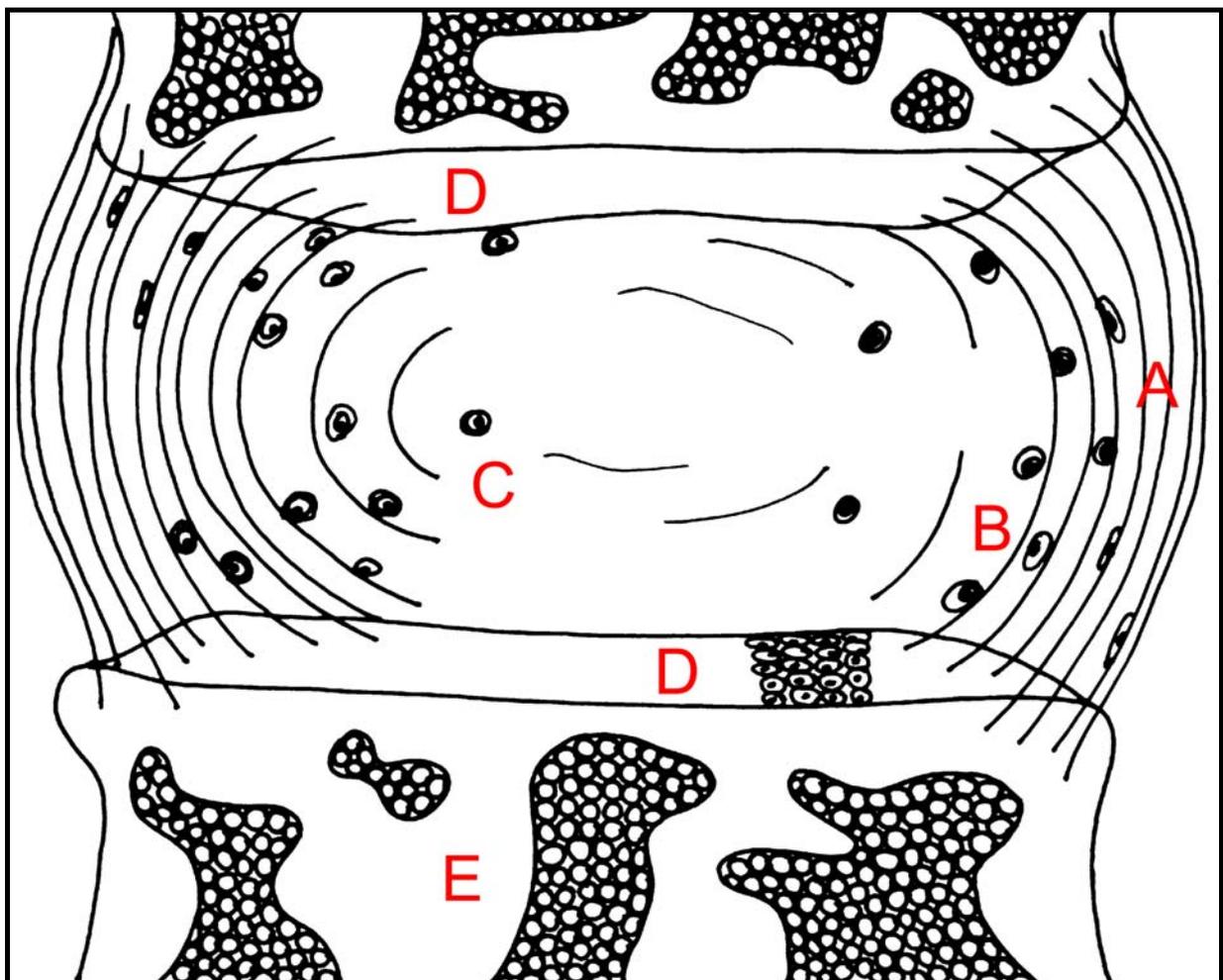


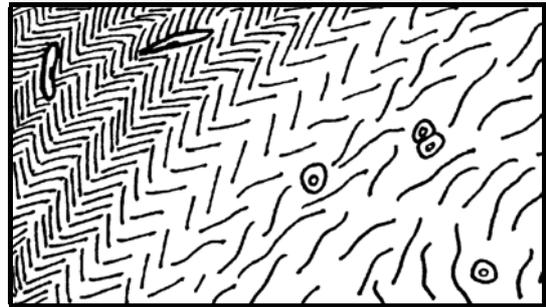
Abb. 1a: Schemazeichnung der Zwischenwirbelscheibe von *Macaca mulatta*.

A: Anulus fibrosus, Außenzone, B: Anulus fibrosus, Innenzone, C: Nucleus pulposus, D: knorpelige Abschlussplatte, E: Lamellenknochen

A) Anulus fibrosus, Außenzone



B) Anulus fibrosus, Innenzone



C) Nucleus pulposus



D) knorpelige Abschlußplatte

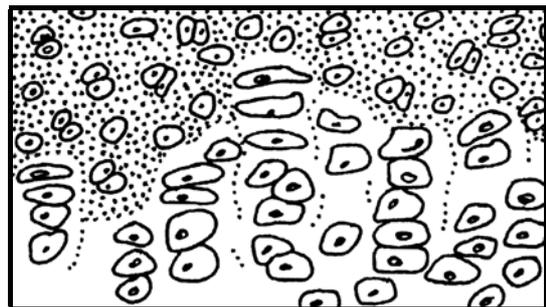


Abb. 1b: Schematische Darstellung der wesentlichen Bereiche der Zwischenwirbelscheibe von *Macaca mulatta*.

A) Knorpelige Abschlußplatte

Auf der knöchernen, nach vorn (oben, kranial) oder hinten (unten, kaudal) gerichteten Endfläche der Wirbelkörper befindet sich eine Schicht von hyalinem Knorpel, die knorpelige Abschlußplatte. Diese läßt zwei Anteile unterscheiden:

- 1) unmittelbar an den Knochen grenzt eine unterschiedlich dicke Schicht aus Säulen-Blasenknorpel, dessen Matrix verkalkt ist. In der Tiefe sitzt dieser Säulen-Blasenknorpel einer knöchernen Endfläche auf. Diese ist oft recht dünn und kann sogar Unterbrechungen aufweisen.

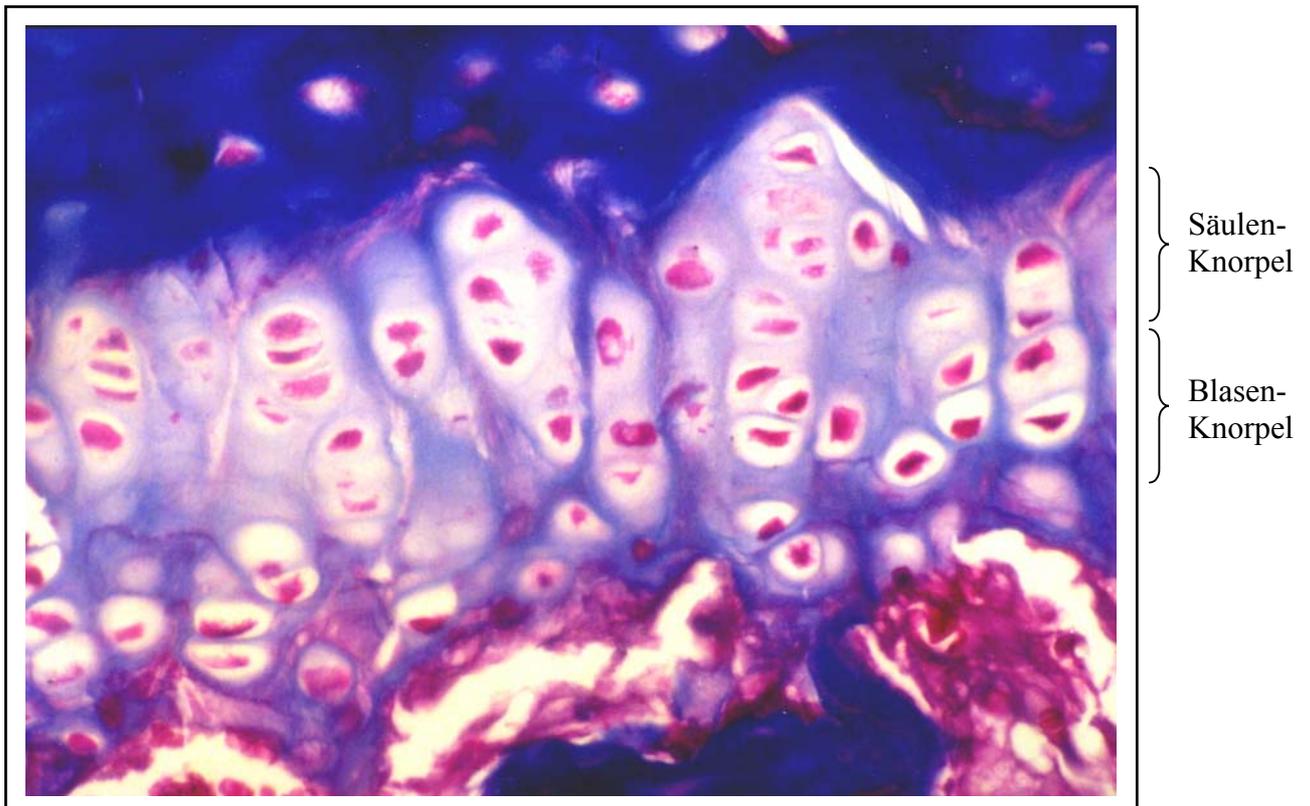


Abb. 2: knorpelige Abschlußplatte mit gut ausgebildeter Säulen-Blasenknorpelschicht (BWS), M-Tr., x 440.

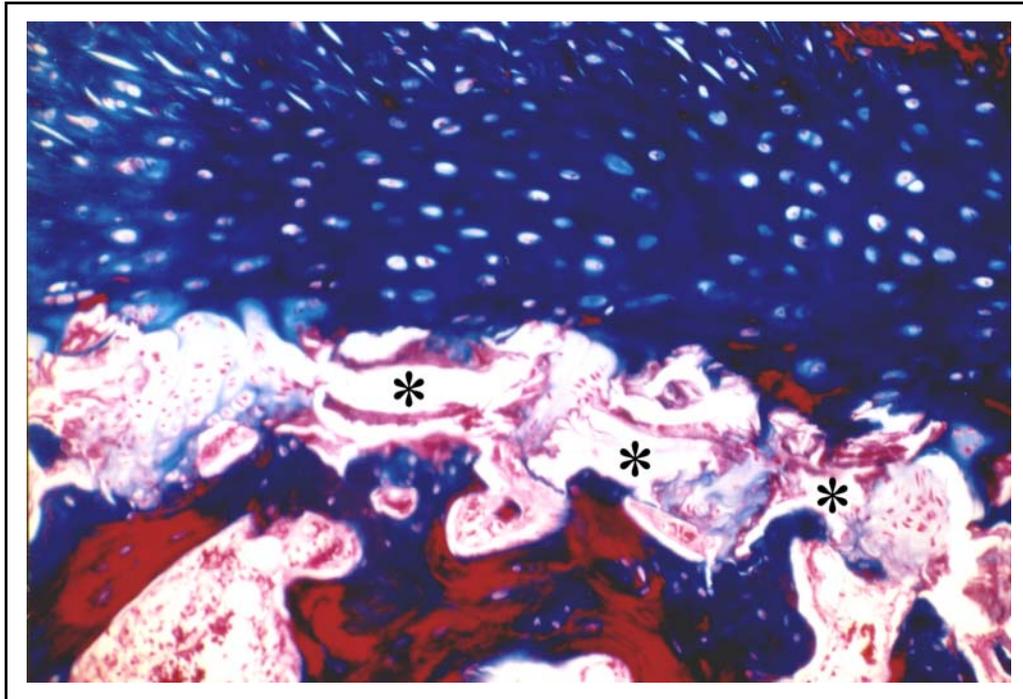


Abb. 3: knorpelige Abschlußplatte (BWS) mit Unterbrechungen (*) in der peripheren Knochen- und Blasenknorpelschicht, M-Tr., x 125.

Der Schicht aus Säulen-Blasenknorpel liegt eine kräftige Schicht nicht verkalkten hyalinen Knorpels auf. Zwischen beiden Schichten läßt sich oft eine klare, im Masson-Trichrompräparat rot gefärbte Linie erkennen, die der Grenzlinie (tide mark) im Gelenknorpel entspricht. Im nicht verkalkten Knorpel sind die Knorpelzellen relativ homogen verteilt. Im Schnittpräparat werden sie meist als Einzelzellen angetroffen, aber man findet auch regelmäßig Zweiergruppen. Die Knorpelzellen sind von einem Hof aus kräftig gefärbter Matrix umgeben. Zwischen den Knorpelzellen liegt eine blässere „interterritoriale“ Matrix. Die Gestalt der Knorpelzellen verändert sich mit zunehmendem Abstand von der Knochenoberfläche. In der Tiefe des nicht verkalkten Knorpels sind die Zellen abgerundet oder oval, in Nähe des Nucleus pulposus sind sie stark abgeflacht. Die knorpelige Abschlußplatte ist kaudal meist etwas dicker als kranial. In der Peripherie strahlen in diese Abschlußplatte Kollagenfasern des Anulus fibrosus ein, sie ähnelt hier z. T. Faserknorpel.

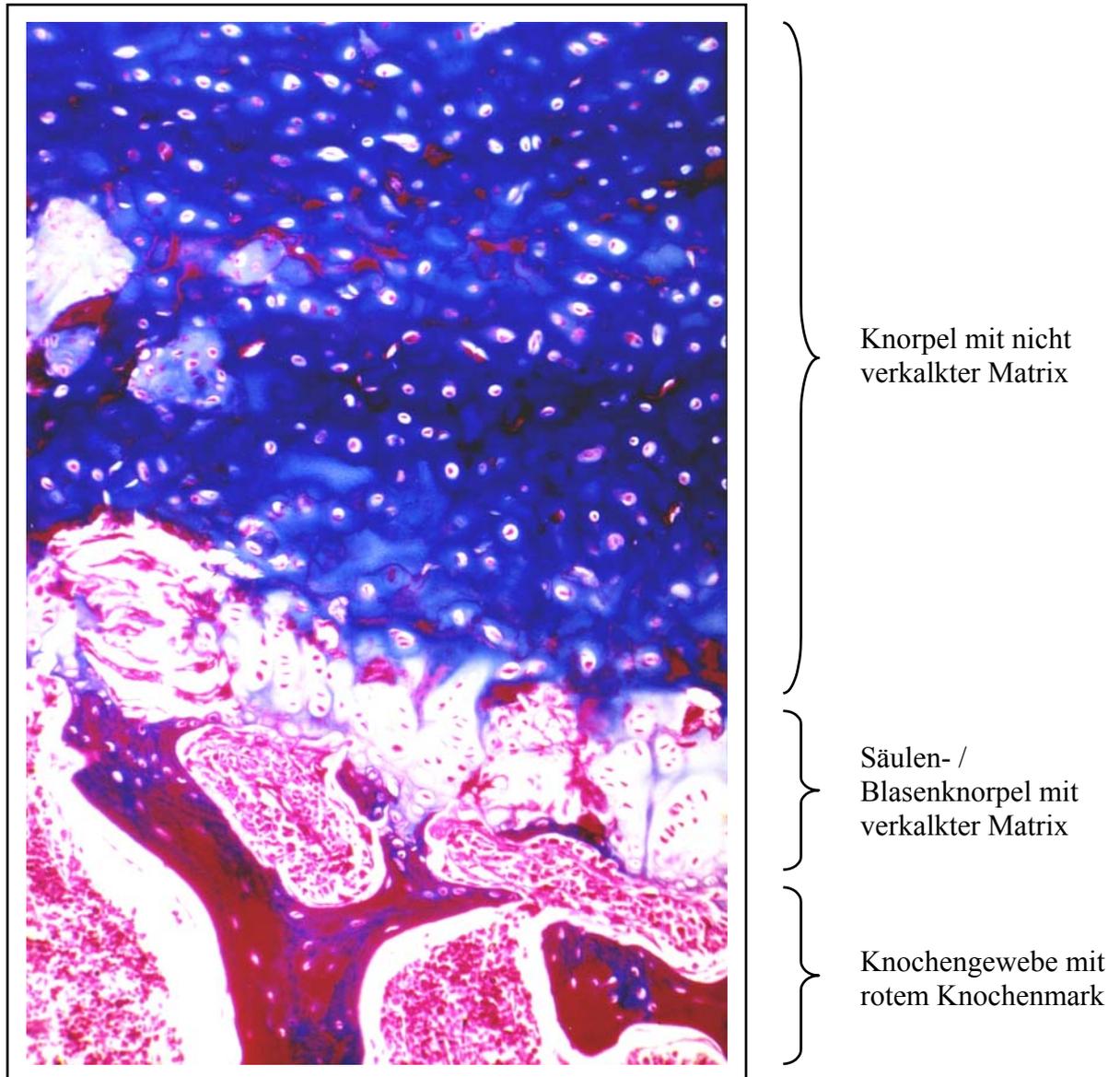


Abb. 4: knorpelige Abschlußplatte, BWS, Übersicht, M-Tr., x 220.

B) Anulus fibrosus

Der Anulus fibrosus besteht insgesamt aus etwa dreißig Schichten, die aus Kollagenfasern bestehen. In einer Schicht sind die Kollagenfasern annähernd parallel angeordnet. Die Ausrichtung dieser Kollagenfasern unterscheidet sich jedoch in benachbarten Schichten, sie treffen in einem Winkel von etwa 80° - 90° aufeinander. Zwischen den Kollagenfasern liegen abgeplattete Fibrozyten. Dieses Gewebe bildet die Außenzone des Anulus fibrosus.

Im inneren Drittel des Anulus fibrosus (Innenzone) treten zwischen den Kollagenfasern rundliche Knorpelzellen auf. Bei ihnen handelt es sich meistens um Einzelzellen, die von einer hofartigen homogenen Matrix umgeben sind. Ihre Zahl nimmt nach innen stetig zu. Diese Region mit den Knorpelzellen entspricht hinsichtlich der Gewebediagnose Faserknorpel.

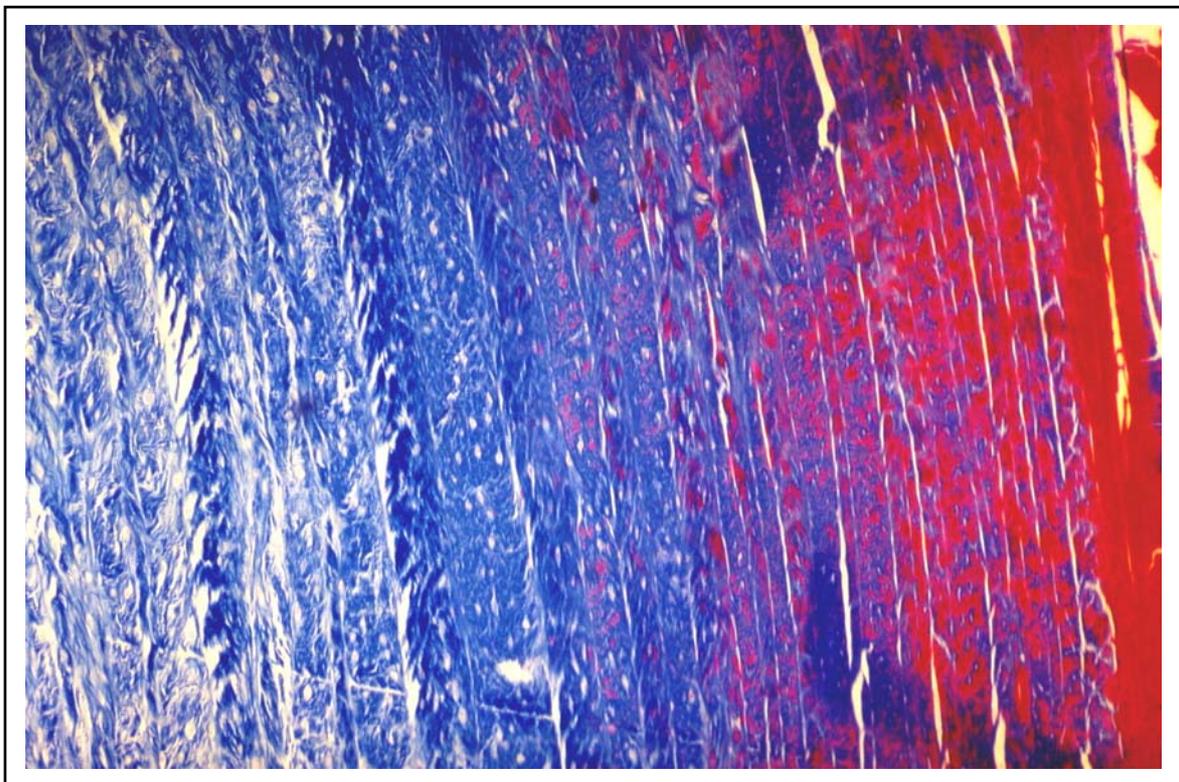


Abb. 5: Querschnitt durch die Zwischenwirbelscheibe, BWS, Anulus fibrosus, rechts Außen-, links Innenzone, M-Tr, x 110.

C) Nucleus pulposus

Der Nucleus pulposus ist ein zell- und faserarmes Gewebe. Speziell am Rande finden sich einzelne Kollagenfasern. Im histologischen Präparat treten weite strukturfreie Räume auf. Solche Räume können scharf begrenzt sein, ohne daß bei der eingesetzten Methodik die Natur der Grenzfläche erkannt werden kann. Zum Teil ist es schwer zu erkennen, ob die Struktur aufgrund der Entwässerung und Einbettung artifiziell verändert ist.

Reste der Chorda dorsalis wurden nie angetroffen. An Zellen treten vereinzelt Knorpelzellen mit deutlichem Hof auf. An der Grenze zur hyalin- knorpeligen Abschlußplatte, deren Oberfläche aus abgeflachten Zellen besteht, finden sich einzelne kleine ovale oder rundliche Knorpelzellen. Schwer zu beurteilen sind immer wieder anzutreffende, im Azan-Präparat rot gefärbte oft längliche Strukturen. Möglicherweise handelt es sich dabei z. T. um zugrunde-gehende Knorpelzellen.

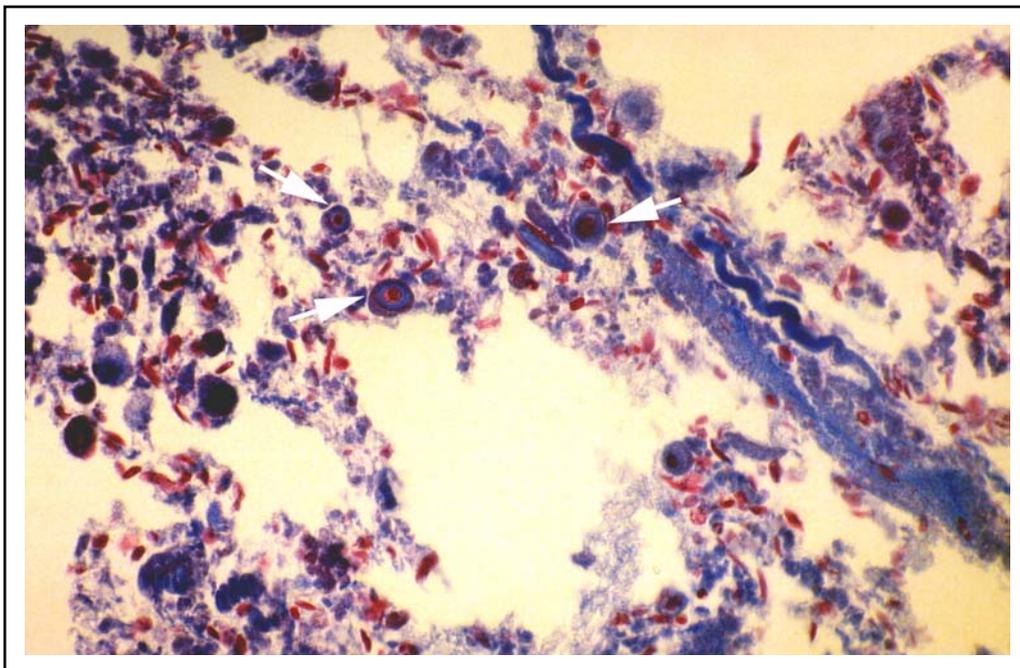


Abb. 6: BWS, Randzone des Nucleus pulposus, (→): Knorpelzellen, Azan, x 220.

3.2 Spezielle Darstellung der Zwischenwirbelscheibe verschiedener Wirbelsäulenabschnitte

3.2.1 Zwischenwirbelscheibe im Bereich der Halswirbelsäule (HWS)

Die Zwischenwirbelscheibe der HWS zeigt in typischer Weise alle Gewebebestandteile der Zwischenwirbelscheiben (Abb. 7). Die knöcherne Endfläche ist unterschiedlich dick, gemessen wurden Stärken zwischen 50 und 250 µm. Wie in anderen Wirbelsäulenbereichen kann sie Unterbrechungen aufweisen, so daß Knochenmarksräume mit Blutgefäßen bis an den verkalkten Knorpel herantreten. Das Knochengewebe besteht in der Grenzzone zum Knorpel überwiegend aus schräg oder annähernd parallel zur Oberfläche verlaufenden Lamellen, typische Osteone (Abb. 10) treten etwas tiefer auf.

Die knorpelige Abschlußplatte ist in die Zone des nicht-verkalkten hyalinen Knorpels und in die dem Knochengewebe anliegende verkalkte Zone des Säulen-Blasenknorpels gegliedert. Die Dicke der knorpeligen Abschlußplatte variiert etwas und ist im Zentrum dünner als in der Peripherie; die kraniale Abschlußplatte ist etwas dünner als die kaudale (siehe Tabelle 3 und 4).

Die Gestalt der Knorpelzellen im nicht verkalkten hyalinen Knorpel der Abschlußplatte ist relativ einheitlich; sie sind abgeflacht, jedoch ist deutlich, daß sie an der Oberfläche flacher sind als in der Tiefe. Die Matrix ist im M.-Tr.-Präparat tiefblau gefärbt. Die Zone des Blasen- und Säulenknorpels ist relativ gut gegen die des nicht verkalkten hyalinen Knorpels abgesetzt, da die Matrix im Masson-Trichrom-Präparat hier blaß ist. In der Zone des Säulen-Blasenknorpels liegen zumeist 5-10 Zellen übereinander. Die Knorpelzellen neigen zu Gruppenbildung (Abb. 8), wohingegen die Zellen im nicht verkalkten hyalinen Knorpel eher einzeln und nur relativ selten in Zweiergruppen in der Matrix liegen. Die Gruppenbildung in der Zone des Säulen-Blasenknorpels ist auch im Alzianblaupräparat gut erkennbar (Abb. 9).

Der Übergang des hyalinen Abschlußplattenknorpels zum Gewebe des Nucleus pulposus ist relativ scharf, wohingegen er zum Gewebe des Anulus fibrosus fließend ist. Es gibt jedoch nie eine scharfe Begrenzung des Abschlußplattenknorpels gegen die anderen Gewebeformen der Zwischenwirbelscheibe.

Der Anulus fibrosus ist – wie im allgemeinen Teil beschrieben – deutlich in zwei Zonen gegliedert. Die schmalere Außenzone besteht aus ca. 10 bis 12 Schichten straffen Bindegewebes, die breitere Innenzone aus Faserknorpel. Beide Zonen gehen fließend ineinander über. Die Zahl der Schichten aus Kollagenfasern beträgt in der Innenzone ca. 15 bis 20. Die Knorpelzellen der Innenzone liegen meistens einzeln, seltener bilden sie kleine Gruppen.

Der Nucleus pulposus ist durch sehr weite Interzellularräume gekennzeichnet, in denen nur vereinzelte Kollagenfasern vorkommen. Vereinzelt treten ganz unregelmäßig strukturierte Gebilde auf, in denen Kollagenfasern und Zellkerne sowie einzelne Knorpelzellen abgrenzbar sind. Im Randgebiet zum Anulus fibrosus kommen regelmäßig einzelne Knorpelzellen mit deutlichem Hof vor (Abb. 6).

Die Ergebnisse der Lektinfärbungen und der Alcianblaufärbung ähneln sich in allen Abschnitten der Wirbelsäule. Sie werden ausführlich im Abschnitt Brustwirbelsäule beschrieben und illustriert. Generell reagiert der Hof der Knorpelzellen kräftiger als die interterritoriale Matrix (Abb. 18). Die Zone des Säulen-Blasenknorpels der Abschlußplatten reagiert meistens stärker als der hyaline Knorpel und der Faserknorpel.

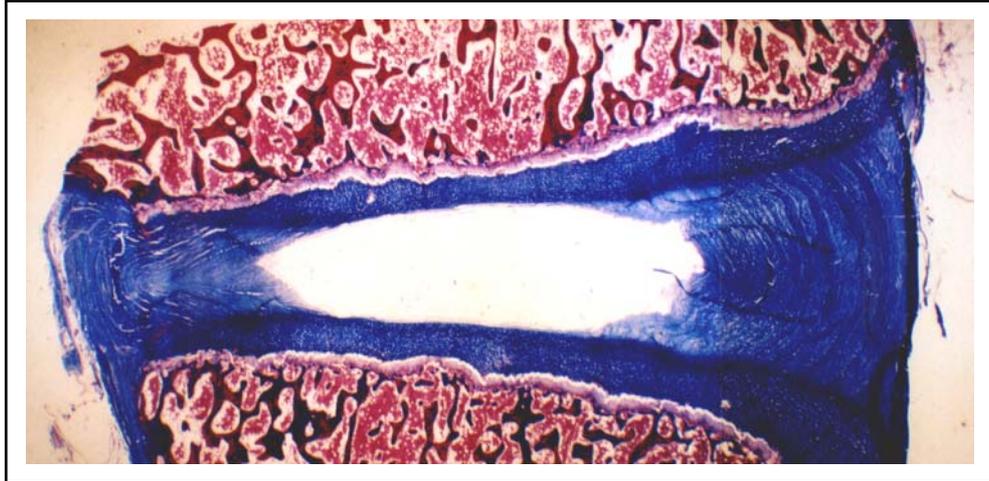


Abb. 7: Zwischenwirbelscheibe, HWS, Übersicht; die Zwischenwirbelscheibe ist einseitig belastet (links im Bild), wodurch der Anulus fibrosus unilateral komprimiert wird. Masson-Trichrom, x 12.

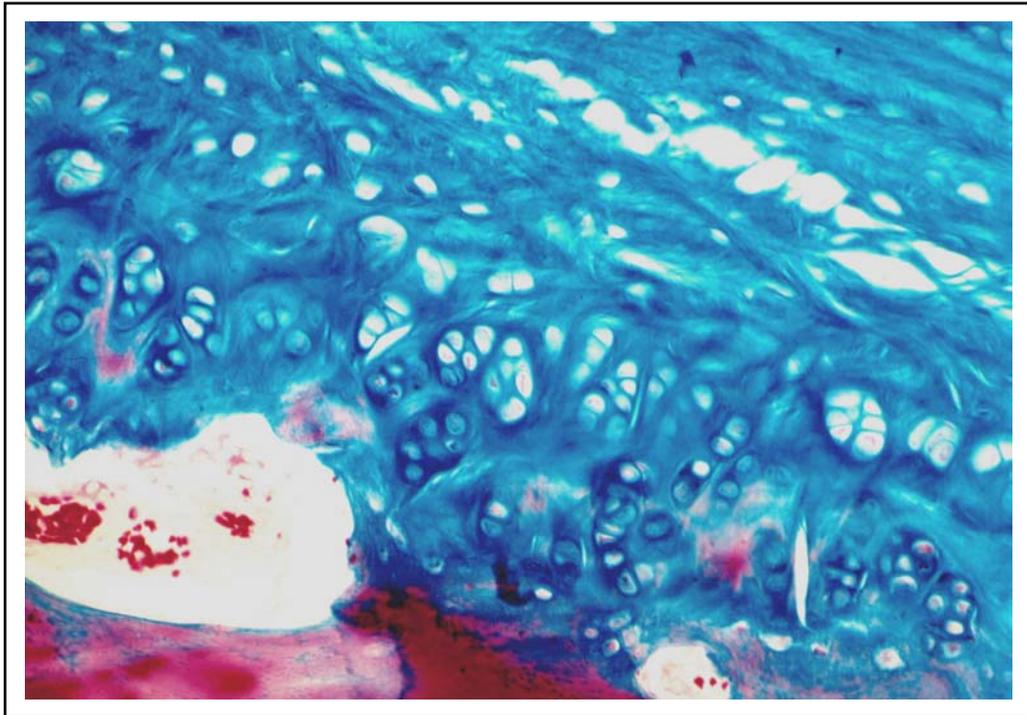


Abb. 8: Zwischenwirbelscheibe, HWS, knorpelige Abschlußplatte (Säulenknorpel) und Übergang zur knöchernen Endplatte, Masson-Trichrom, x 250.



Abb. 9: Proteoglykannachweis in der Zwischenwirbelscheibe, HWS. Unten: knorpelige Abschlußplatte und oben: Übergang zur Innenzone des Anulus fibrosus, Alzianblau (pH 2,5) und Kernechtrot, die territoriale Matrix hat den höchsten Gehalt an Proteoglykanen; x 250.

3.2.2 Zwischenwirbelscheibe im Bereich der Brustwirbelsäule (BWS)

Die knöcherne Endfläche besteht aus Lamellenknochen, jedoch treten typische Osteone (Abb. 10) nur in der Tiefe auf. Die Dicke der knöchernen Endfläche schwankt zwischen ca. 250 und 70 μm , regelmäßig finden sich in dieser Platte Lücken, so daß an solchen Stellen das Knochenmark direkt an den verkalkten Säulen-Blasenknorpel grenzt.

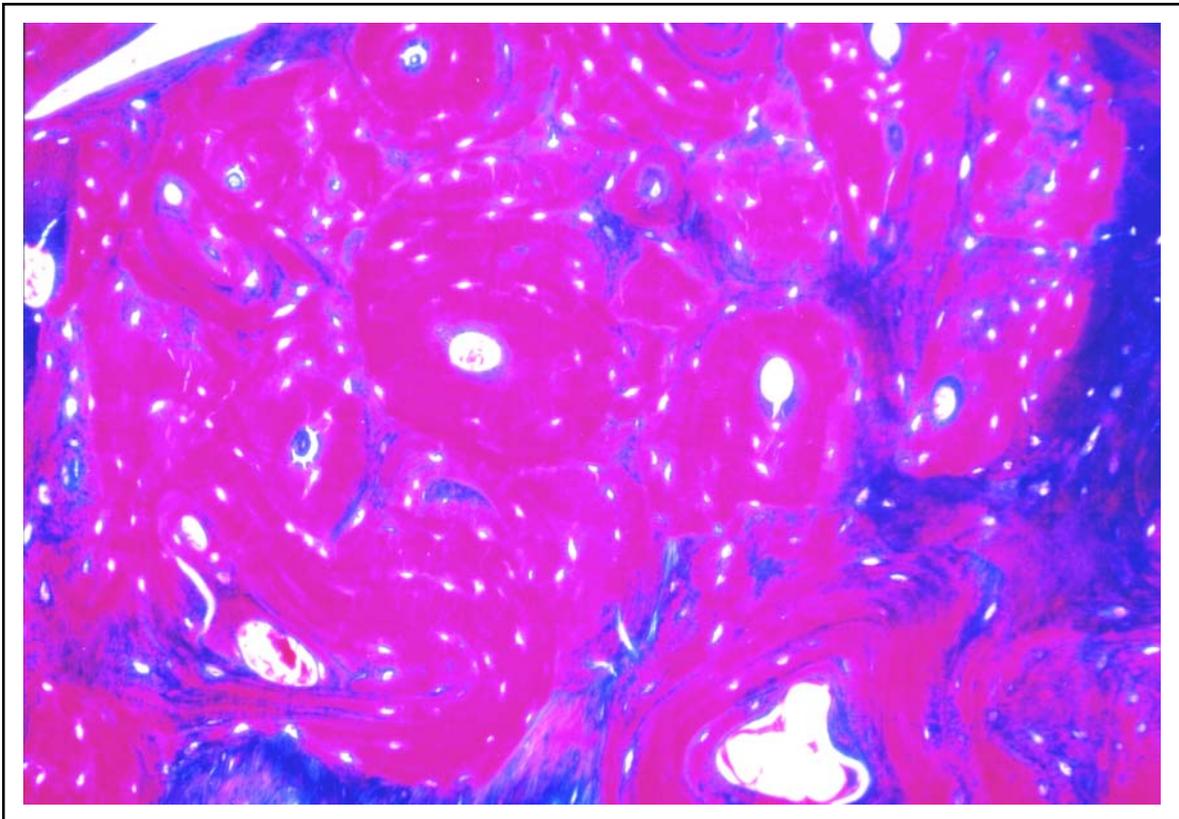


Abb. 10: BWS, Osteone in der knöchernen Endfläche, Flachschnitt, M-Tr., x 110.

Der Säulenknorpel zeigt eine blaßblaue Matrix und eher flache bis dreieckige Zellkerne. Die Matrix des nicht verkalkten hyalinen Knorpels ist intensiv blau, die Knorpelzellen selbst bleiben im Azanpräparat farblos, was zum großen Teil auf artifizieller Schrumpfung des Zytoplasmas beruht, sind aber von einem dunkelblauen Hof umgeben, die ovalen Zellkerne sind rötlich. Eine „tide-mark“ ist meist nicht erkennbar.

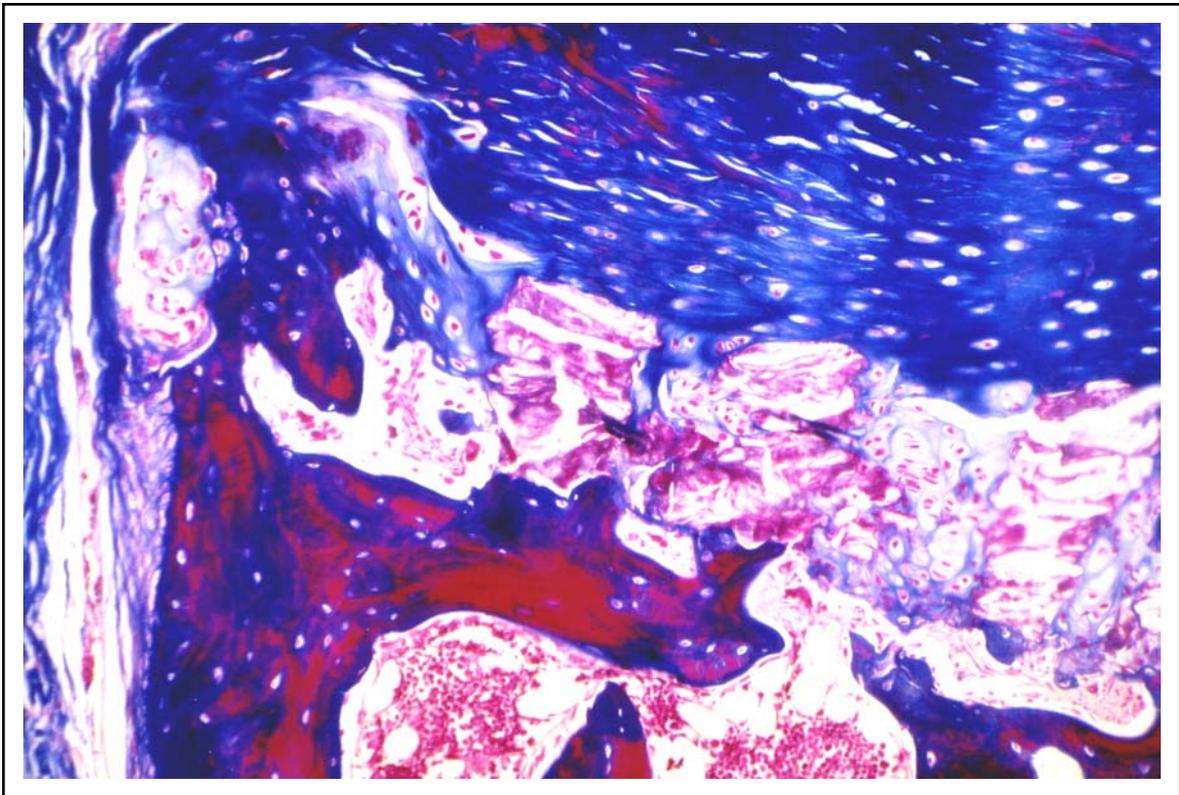


Abb. 11: Abschlußplatte am Rande des Wirbelkörpers (BWS); unten: knöcherne Endfläche, oben knorpelige Abschlußplatte. Die Zone mit Säulen- und Blasenknorpel ist vielfach unterbrochen, M-Tr., x 110.

In der Peripherie der Zwischenwirbelscheibe ist ein fließender Übergang vom hyalinen Knorpel zum Faserknorpel zu beobachten. Die homogene Matrix des hyalinen Abschlußplattenknorpels wandelt sich allmählich in die faserig-strukturierte Matrix des Faserknorpels um. Die deutlichen Kollagenfasern des Faserknorpels sind in der Matrix des hyalinen Knorpels verankert. Die ovalen Knorpelzellen des nicht verkalkten hyalinen Knorpels nehmen in der Übergangszone zum Faserknorpel eine rundliche Gestalt an. Im Faserknorpel sind die meist einzeln liegenden Knorpelzellen locker verstreut.

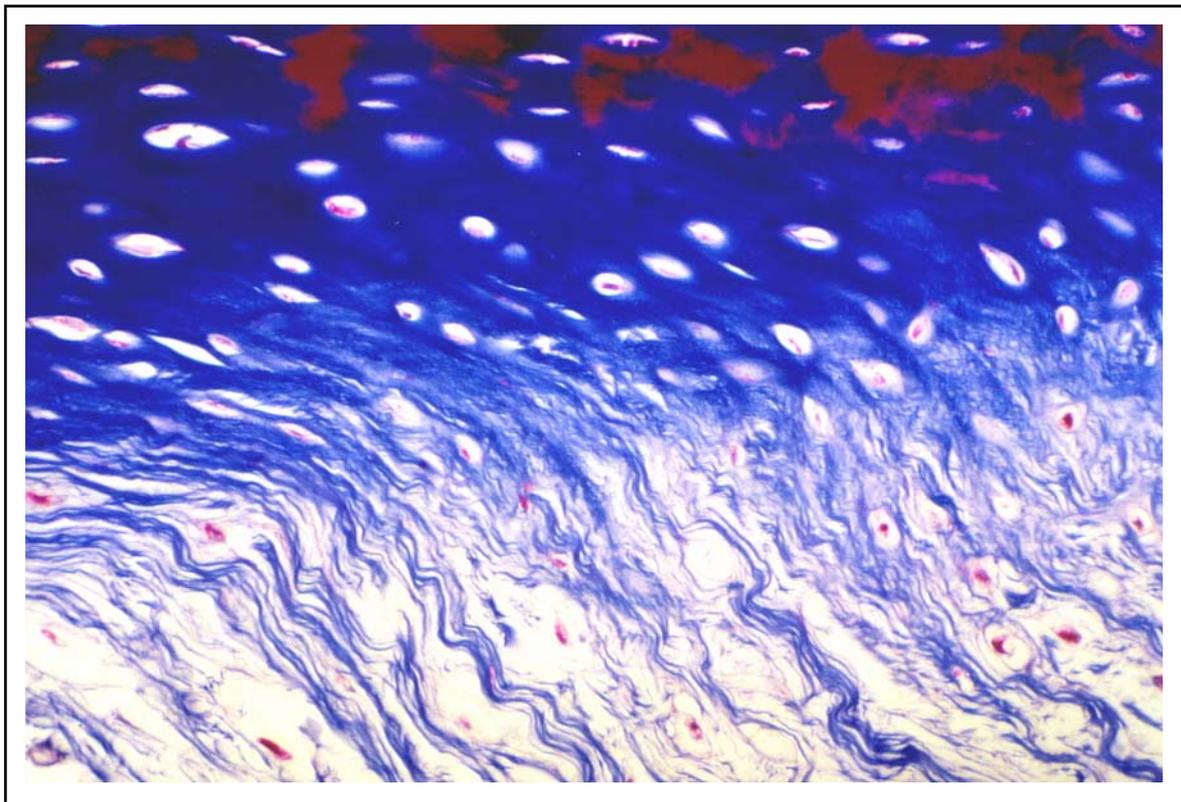


Abb. 12: Übergang vom hyalinen Knorpel der Abschlußplatte (oben) zum Faserknorpel der Innenzone des Anulus fibrosus (unten), (BWS), M-Tr., x 440.

Die Textur der einzelnen Kollagenschichten des Anulus fibrosus wird von innen nach außen immer straffer.

Der Übergang zum Nucleus pulposus erfolgt relativ abrupt. Als Übersichtsfärbung des Anulus fibrosus eignet sich die Azan-Färbung am besten, die Kollagenfasern blau färbt. Die einzeln liegenden Knorpelzellen der Innenzone erscheinen blau mit rotem Kern und violetter Hof. Der Nucleus pulposus zeigt weite ungefärbte Räume.

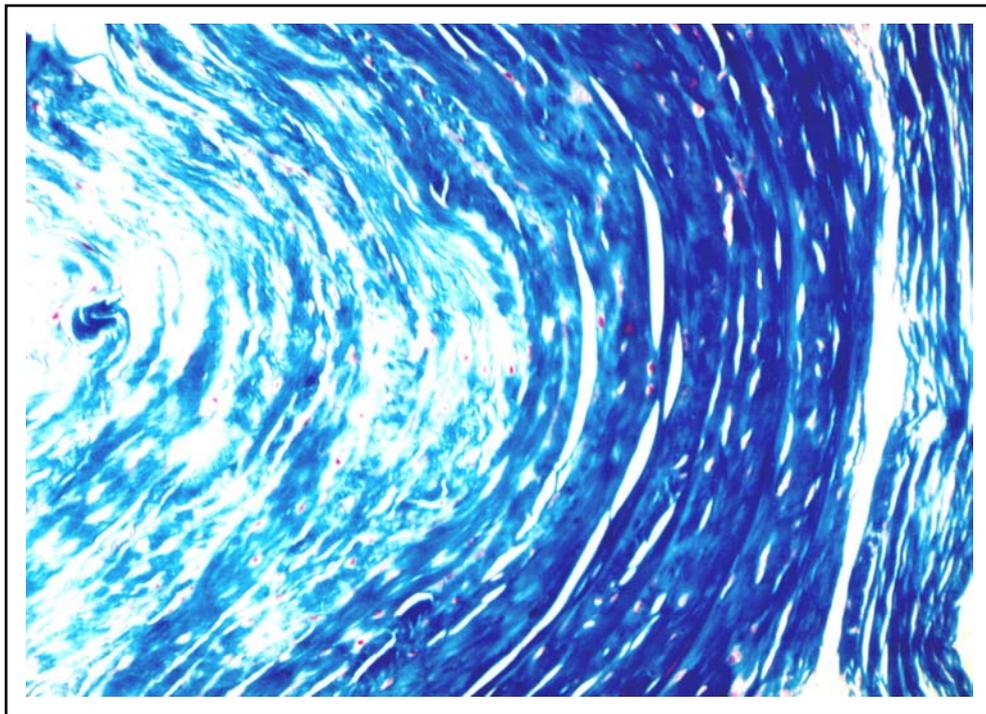


Abb. 13: Faserknorpel in der Innenzone (links im Bild) des Anulus fibrosus. Rechts: Außenzone des Anulus fibrosus mit straffen Bindegewebslamellen, BWS, M-Tr., x 220.

Die Alcianblau-Färbung markiert die knorpelige Abschlussplatte gut. Die Knorpelzellen bleiben farblos, dafür färbt sich die Matrix des Säulenknorpels in mittlerer Intensität, die Matrix des hyalinen Knorpels intensiv an, wobei die territoriale Matrix am kräftigsten reagiert. Die Färbung ist bei einem pH-Wert von 2,5 deutlich kräftiger als bei pH 1.

Im Säulenknorpel der Brustwirbelsäule treten Zellstapel von ca. 4 bis zu 13 Zellen auf.



Abb. 14: Säulenknorpel und nicht verkalkter hyaliner Knorpel in der knorpeligen Abschlußplatte eines Brustwirbelkörpers (oben). Aufgrund des Reichtums an Proteoglykanen färbt sich der Knorpel mit Alzianblau generell deutlich blau an. AB pH 2,5, x 440.

Zur Darstellung des Faserknorpels eignet sich die AB-Färbung ebenfalls. Sie zeigt deutlich die einzelnen Faserstränge, und markiert die Höfe der Knorpelzellen (Abb. 15).

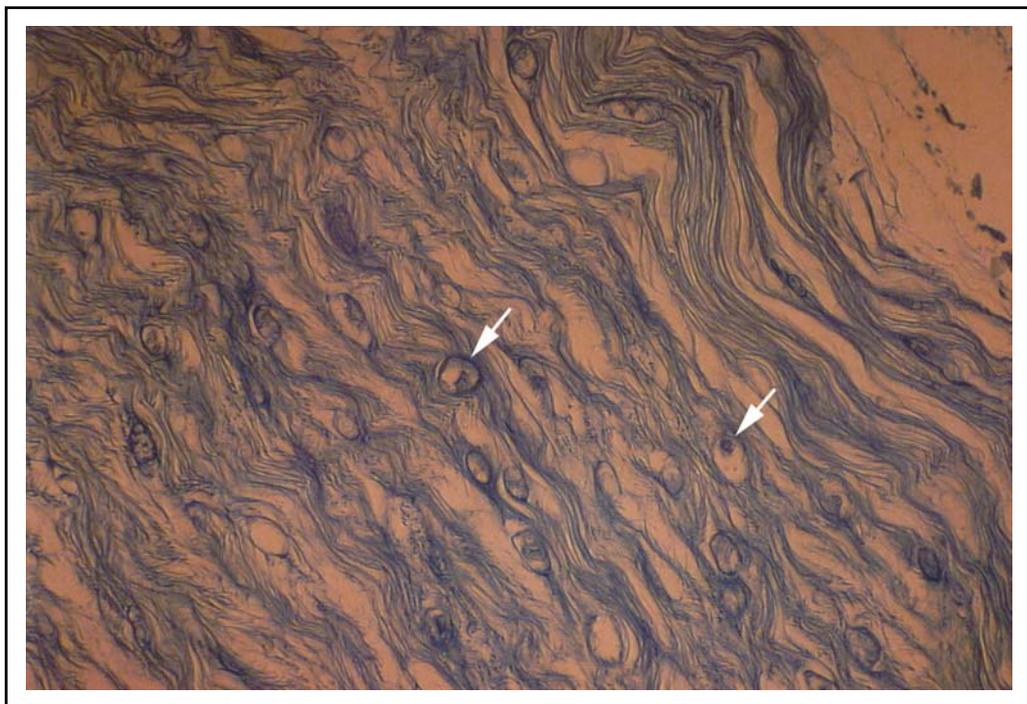


Abb. 15: Nachweis von Proteoglykanen im Faserknorpel des Anulus fibrosus einer Zwischenwirbelscheibe der Brustwirbelsäule (→: Knorpelzellen mit Hof), AB pH 2,5, x 220.

Auch der Nucleus pulposus lässt sich mit Alcianblau darstellen. Es zeigen sich hier mit dieser Methode weite ungefärbte Räume, unregelmäßig strukturiertes, blaugefärbtes Material und einzelne versprengte blaue Knorpelzellen mit dunkelblauem Hof.

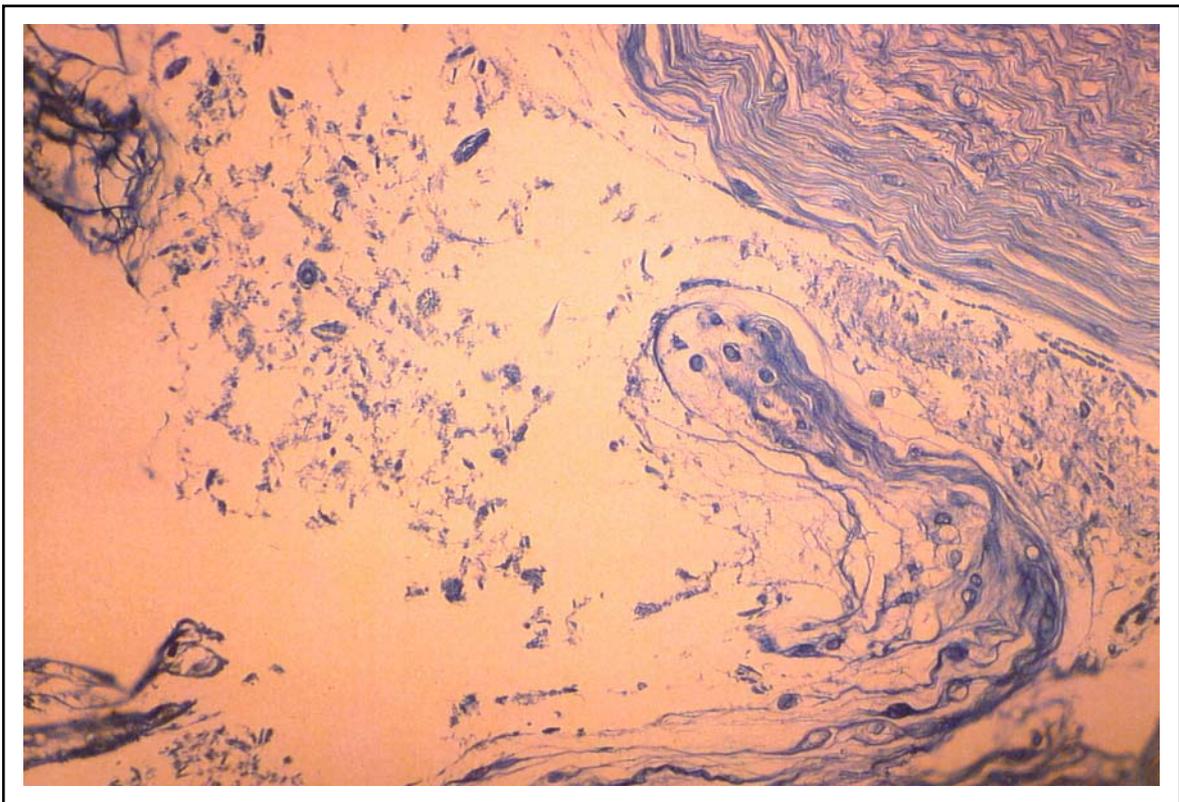


Abb. 16: Verteilung von Proteoglykanen und Glycosaminoglykanen im Nucleus pulposus im Bereich der Brustwirbelsäule, rechts oben: Innenzone des Anulus fibrosus, AB pH 2,5, x 110.

Die Färbung mit LCA (Lens culinaris Lektin) färbt die Matrix des hyalinen Knorpels schwach braun und den Hof der Knorpelzellen intensiv braun, läßt die Zellen selbst ungefärbt. Am Übergang zum Nucleus pulposus wird die Matrixfärbung intensiv braun. Im Nucleus pulposus selbst treten neben weiten ungefärbten Räumen einzeln versprengte Knorpelzellen auf, die schwach gefärbt und von einem intensiv braunen Hof umgeben sind (Pfeile).

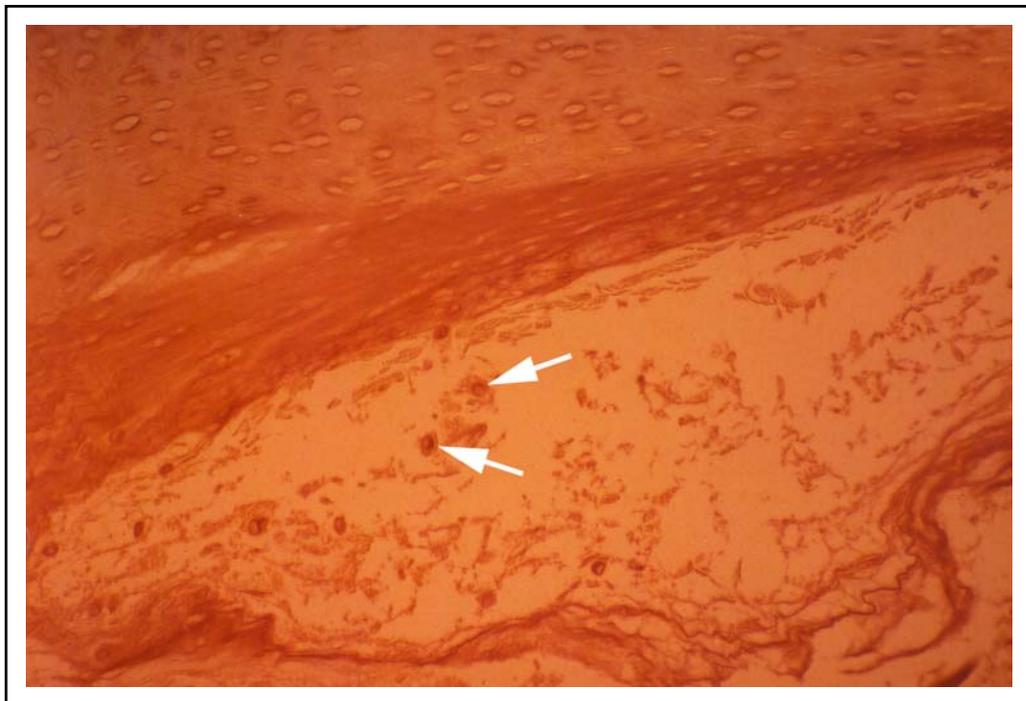


Abb. 17: Knorpelige Abschlußplatte (oben) eines Brustwirbelkörpers, Verteilung von LCA - Bindungsstellen. Unten: Nucleus pulposus, (→: Knorpelzellen im Nucleus pulposus), LCA, x 110.

Die WGA-Lektinfärbung eignet sich zur Darstellung aller Strukturen der Zwischenwirbelscheibe. Das Knochenmark der Wirbelkörper erscheint dunkelbraun, die Knochenmatrix selbst ist hellbraun, die Osteoidsäume sind intensiv braun gefärbt. Im Säulenknorpel ist die Matrix mittelbraun gefärbt. Die interterritoriale Matrix des hyalinen Knorpels erscheint mittelbraun, die Knorpelzellen selbst sind ungefärbt, besitzen jedoch einen breiten intensiv gefärbten Hof. In Richtung Nucleus pulposus wird die Matrixfärbung wieder (wie bei LCA) intensiv braun. Der Nucleus pulposus selbst zeigt weite ungefärbte Räume mit vereinzelt dunkelbraun gefärbter Matrix.

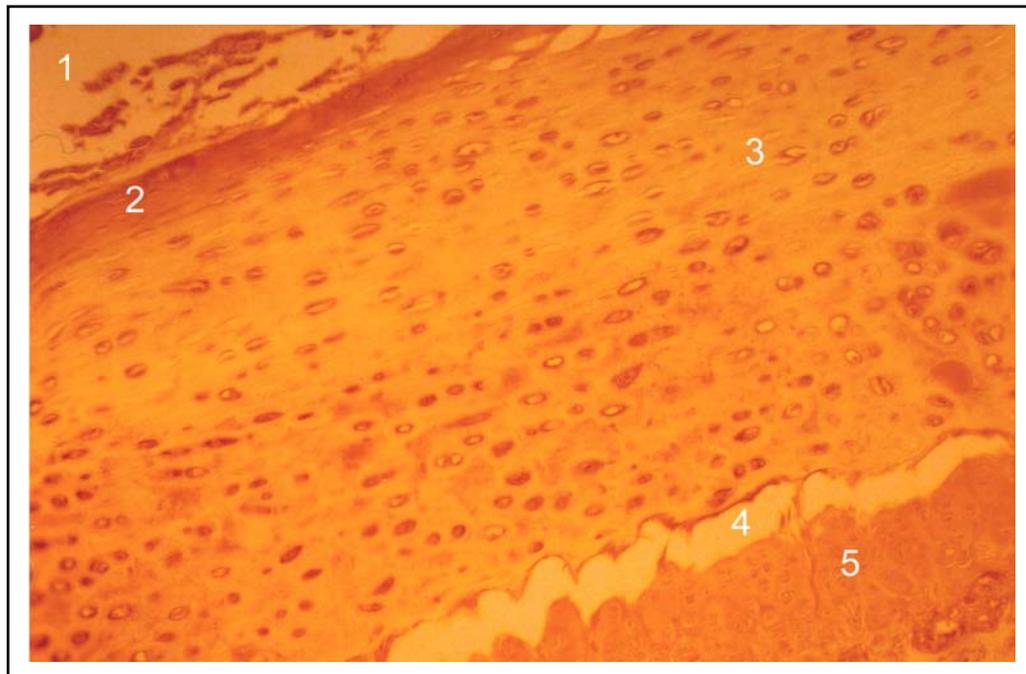


Abb. 18: WGA – Bindungsstellen in der knorpeligen Abschlußplatte, BWS, WGA, x 110,

- 1) Nucleus pulposus,
- 2) dichte Randzone des Nucleus pulposus,
- 3) hyaliner Knorpel,
- 4) artefizieller Spalt,
- 5) Zone des Säulen-Blasenknorpels.

Die Fasern des Anulus fibrosus färben sich mit WGA blaß braun. Die einzeln liegenden Knorpelzellen bleiben ungefärbt, ihr schmaler Hof ist intensiv braun gefärbt.

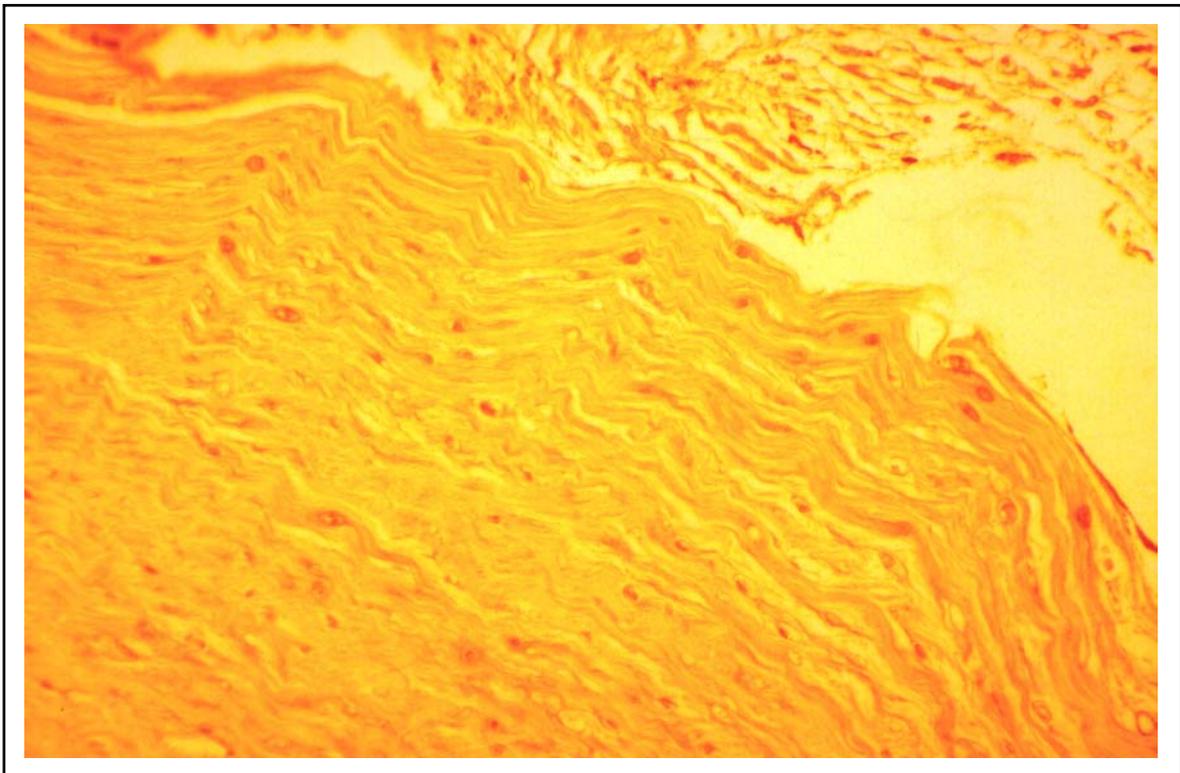


Abb. 19: WGA – Bindungsstellen im Faserknorpel (unten) und Nucleus pulposus (oben) einer Zwischenwirbelscheibe der Brustwirbelsäule, WGA, x 110.

Die MPA-Lektinfärbung eignet sich ebenfalls zur Darstellung aller Strukturen der Zwischenwirbelscheibe. Das Knochengewebe mit seinem Knochenmark erscheint mittelbraun. Die ihm aufliegende Säulenknorpelschicht reagiert besonders stark bei dieser Färbemethode, wobei die Knorpelzellen selbst ungefärbt bleiben, jedoch von einem dunkelbraunen Hof umgeben sind, die Kerne nur schwach angefärbt werden und die Matrix recht intensiv braun erscheint.

Im nicht verkalkten hyalinen Knorpel bleiben die Zellen ebenfalls ungefärbt und sind ebenso von einem dunkelbraunen Hof umgeben. Die interterritoriale Matrix erscheint hier jedoch wolkig strukturiert und reicht in ihrer Anfärbbarkeit von mittel- bis hellbraun.

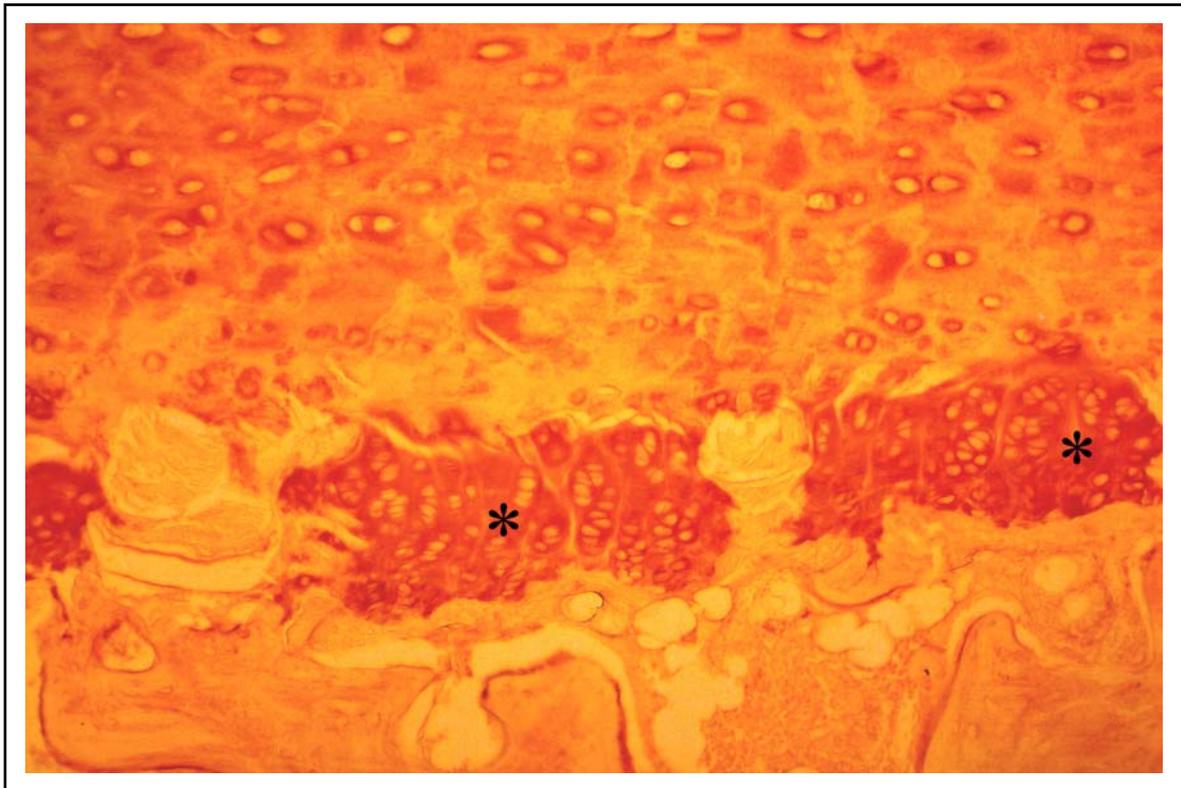


Abb. 20: MPA – Bindungsstellen (Galactose - Nachweis) in der Abschlußplatte eines Brustwirbelkörpers. Oben: nicht verkalkter hyaliner Knorpel, unten: kräftig gefärbtes Band des verkalkten Säulen-Blasenknorpels (*), MPA, x 220.

Im Anulus fibrosus lassen sich die einzelnen Fasern intensiv braun darstellen, die Höfe der Knorpelzellen der Innenzone lassen sich nur relativ schwach anfärben.

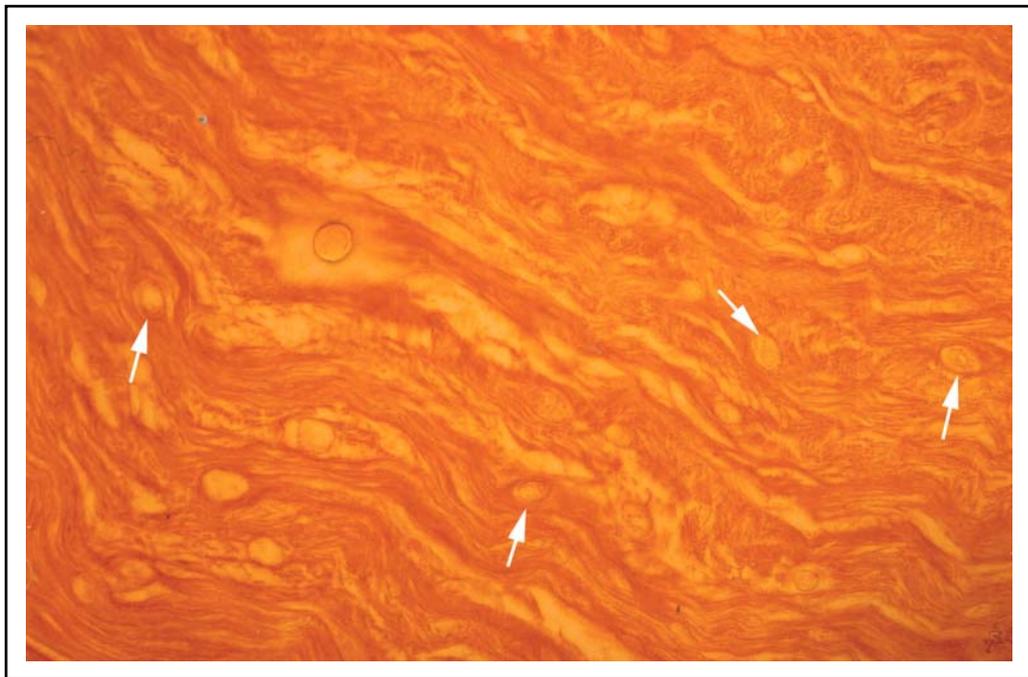


Abb. 21: MPA – Bindungsstellen in der Innenzone des Anulus fibrosus einer Zwischenwirbelscheibe der Brustwirbelsäule, (→: Knorpelzellen), MPA, x 220.

Die PNA-Lektinfärbung, die WFA-Lektinfärbung, die HPA-Lektinfärbung, und die UEA-Lektinfärbung erbringen gleiche Färbemuster wie die MPA-Lektinfärbung.

3.2.3 Zwischenwirbelscheibe im Bereich der Lendenwirbelsäule (LWS)

Die Zwischenwirbelscheibe der LWS ähnelt der der BWS. Auffallende Unterschiede zeigt insbesondere der Nucleus pulposus. Im Vergleich zum Nucleus pulposus der Brustwirbelsäule ist der Nucleus pulposus im Lendenwirbelbereich wesentlich stärker strukturiert, enthält weitaus mehr Knorpelzellen und Matrixbestandteile. Auch treten die Knorpelzellen vermehrt in Zweier- oder größeren Gruppen auf. Der Anteil an Kollagen ist ebenfalls erhöht. Strukturlose Räume sind im Vergleich stark reduziert, so daß insgesamt der Eindruck entsteht, das Nucleus pulposus-Gewebe sei dichter als in weiter oben gelegenen Bereichen der Wirbelsäule.

Die Azanfärbung eignet sich auch hier besonders gut zur Veranschaulichung der Gewebestruktur des Nucleus pulposus. Sie zeigt auch hier die Knorpelzellen (Pfeile) mit rotem Kern und blauen Hof, die kollagenen Fasern sind intensiv blau und Matrixbestandteile oft violett gefärbt.

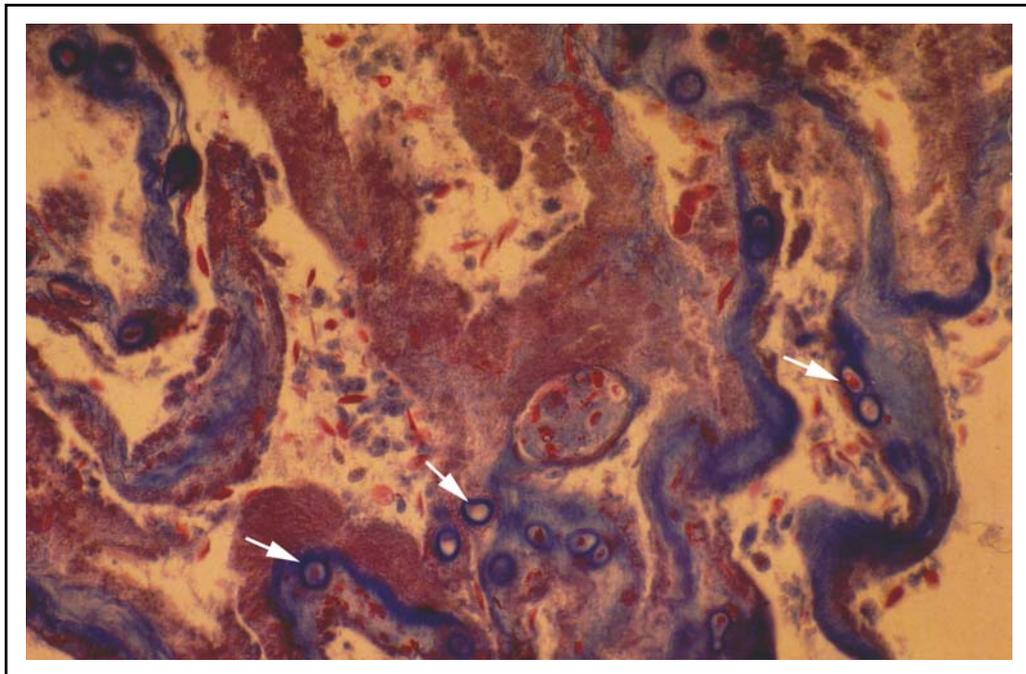


Abb. 22: Ausschnitt aus dem Nucleus pulposus der LWS, (→: Knorpelzellen), Azan, x 220.

Auch die übrigen Strukturen der Zwischenwirbelscheibe im Lendenwirbelbereich sind mit der Azanfärbung gut darzustellen. Der Anulus fibrosus ist deutlich in seinen annähernd parallel angeordneten Faserschichten zu erkennen. Die einzelnen Kollagenfasern sind dunkelblau angefärbt, die faserige Struktur deutlich erkennbar. Auch hier treffen die Kollagenfasern in den benachbarten Schichten in einem Winkel von etwa 80° - 90° aufeinander. Auffällig ist hier die besonders dichte Anordnung der Kollagenfasern, die im Vergleich zu weiter kranial gelegenen Wirbelsäulenabschnitten von einer erhöhten Zahl von flachen Fibroblasten mit rot gefärbtem Kern durchsetzt ist. Schon in der mittleren Zone des Anulus fibrosus sind die Zellen oft oval oder abgerundet und ähneln zum Teil schon Knorpelzellen (Abb. 23).

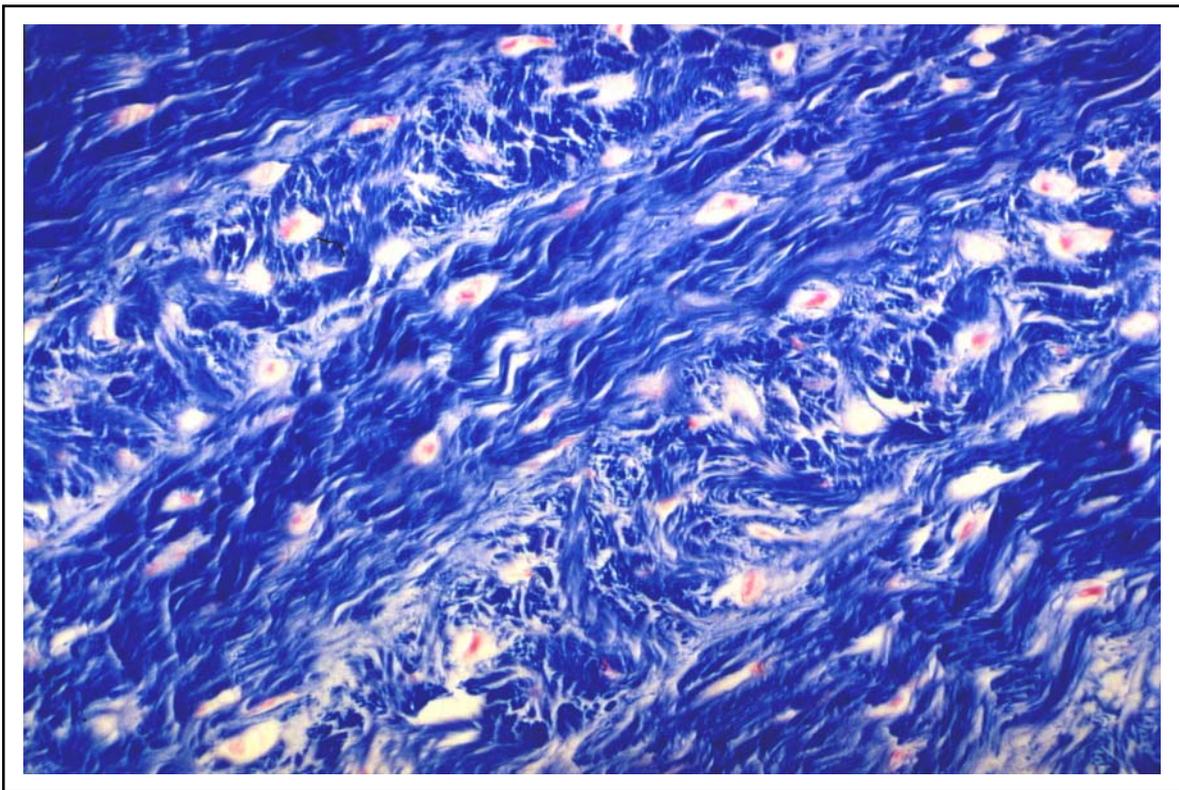


Abb. 23: Mittlerer Bereich des Anulus fibrosus mit Knorpelzellen einer Zwischenwirbelscheibe der LWS, die Schichten aus Kollagenfasern sind hier noch gut gegeneinander abgrenzbar, Azan, x 220.

In den weiter innen gelegenen Bereichen des Anulus fibrosus der Lendenwirbelsäule treten die Knorpelzellen vermehrt in Zweiergruppen auf, auch ist die Bänderung der Kollagenfasern homogener, was hier in der AB-Färbung mit einem pH-Wert von 1,0 gut dargestellt werden kann.

Die Knorpelzellen zeigen hier einen breiten blau gefärbten Hof (Abb. 24).

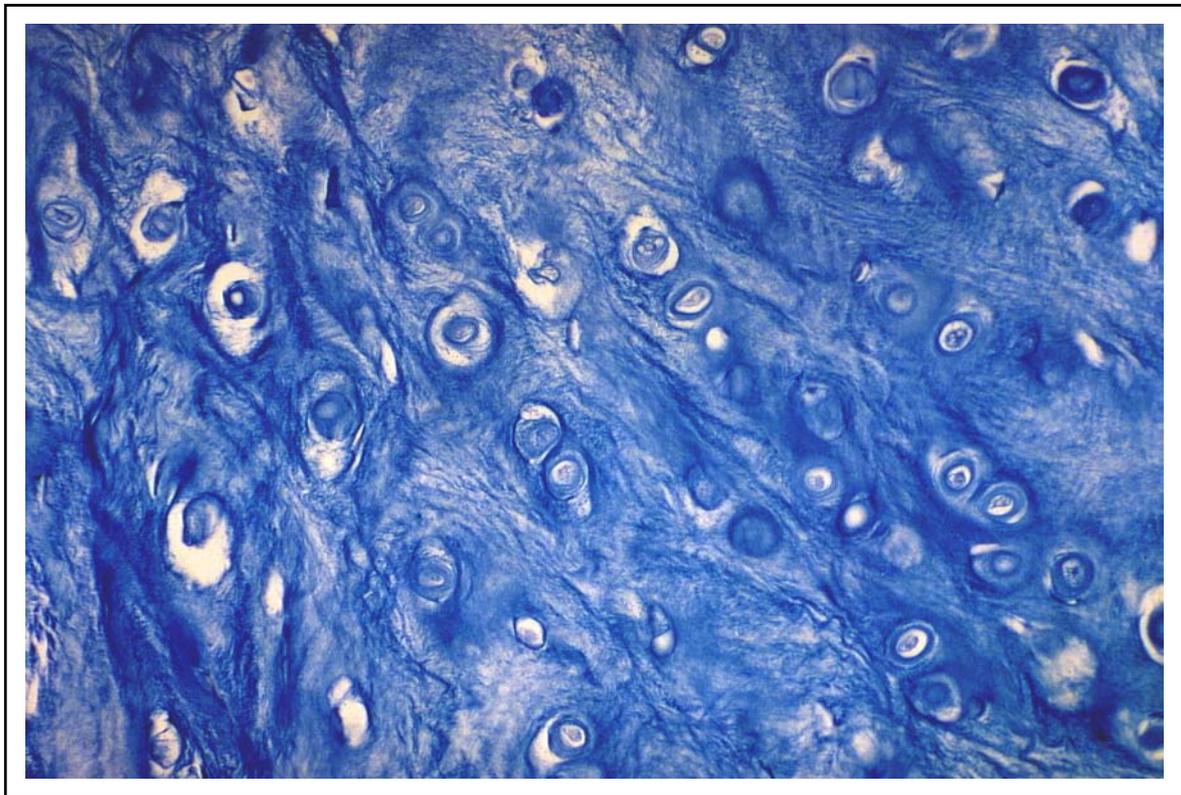


Abb. 24: Proteoglykannachweis im Anulus fibrosus innen, mit vielen Knorpelzellen, BWS, AB pH 1,0, x 220.

Die äußeren Schichten des Anulus fibrosus sind besonders dicht gelagert, was sich in der Azanfärbung durch eine deutliche Rotfärbung gegenüber des sonst blauen Kollagens abhebt.

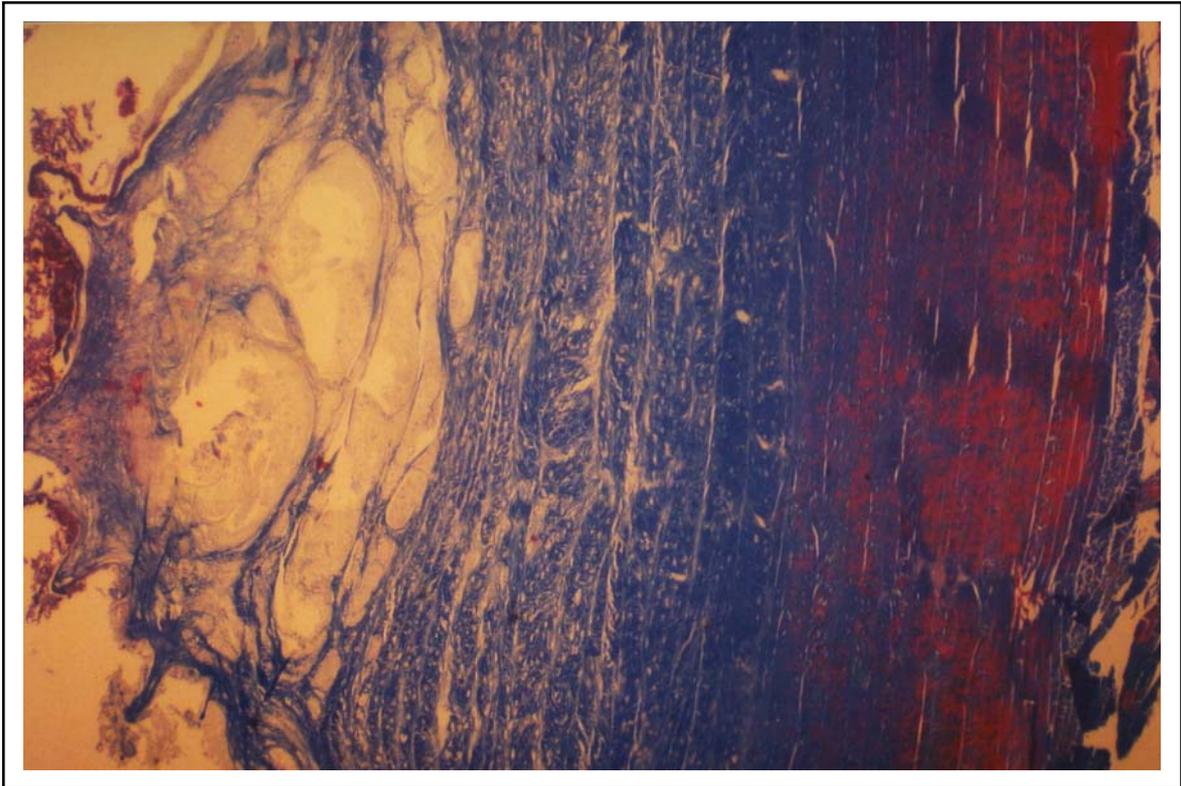


Abb. 25: Anulus fibrosus im Bereich der LWS, rechts: Außenzone, Mitte: Innenzone und links: Nucleus pulposus, Azan, x 22.

Der Übergang vom Anulus fibrosus zum hyalinen Knorpel der Abschlußplatten erfolgt auch in der Lendenwirbelsäule fließend (Abb. 26, links, ↑), die Matrix im Übergangsbereich weist jedoch ein deutliches Verkalkungsband („tide-mark“) auf, hier in der Azanfärbung gegenüber der sonstigen Blaufärbung rötlich gefärbt.

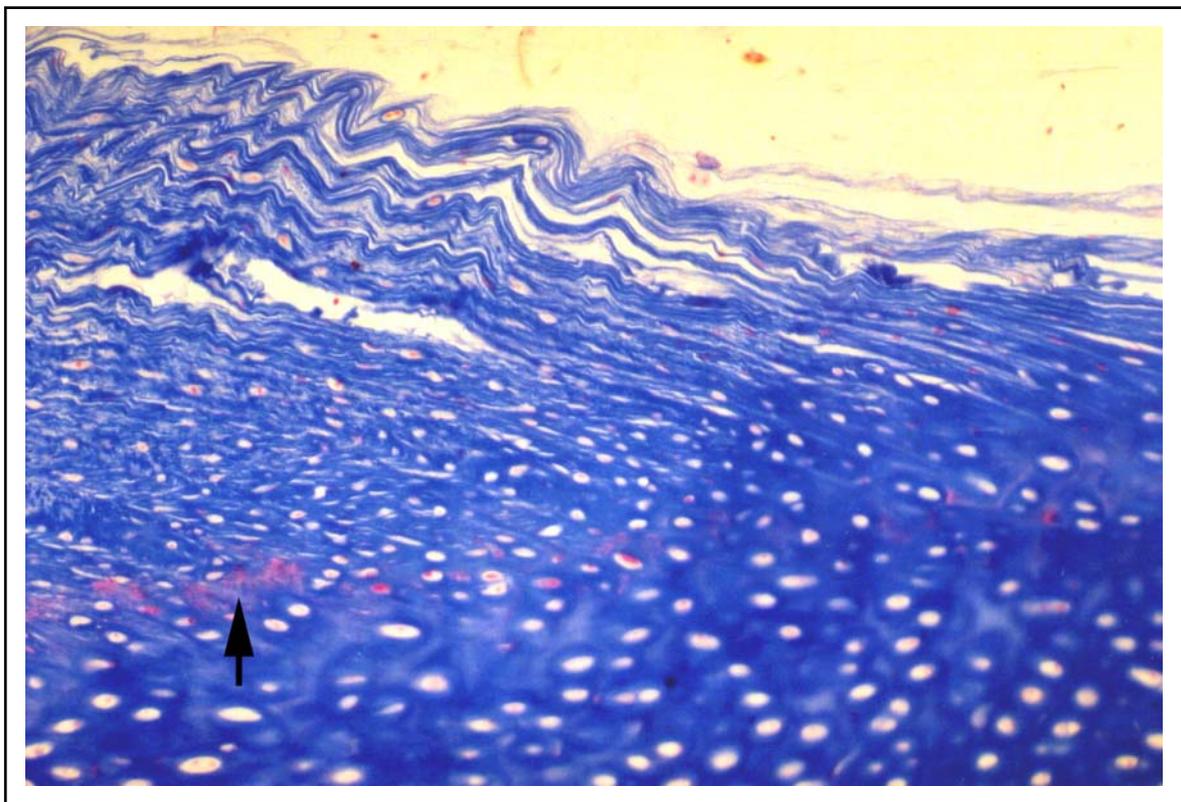


Abb. 26: Übergang Faserknorpel (links oben)/hyaliner Knorpel der Abschlußplatte (unten, mit rötlich gefärbter „tide-mark“: ↑). Rechts oben Nucleus pulposus, BWS, Azan, x 110.

Zwischen dem hyalinen Knorpel und dem Säulenknorpel findet sich fast immer ebenfalls eine rote Linie, die einer Grenzlinie („tide-mark“) entspricht.

Die Anzahl der Zellen in den Zellstapeln im Säulenknorpel erscheint im Lendenwirbelsäulenbereich höher als in weiter oben gelegenen Bereichen der Wirbelsäule. Es treten oft Zellstapel von bis zu 16 Zellen auf, wobei die Zellen hier in der Azanfärbung ungefärbt mit rotem Kern und hellblauer Matrix erscheinen.

Der Lamellenknochen und das Knochenmark grenzen sich durch ihre Rotfärbung klar vom Knorpelgewebe ab.

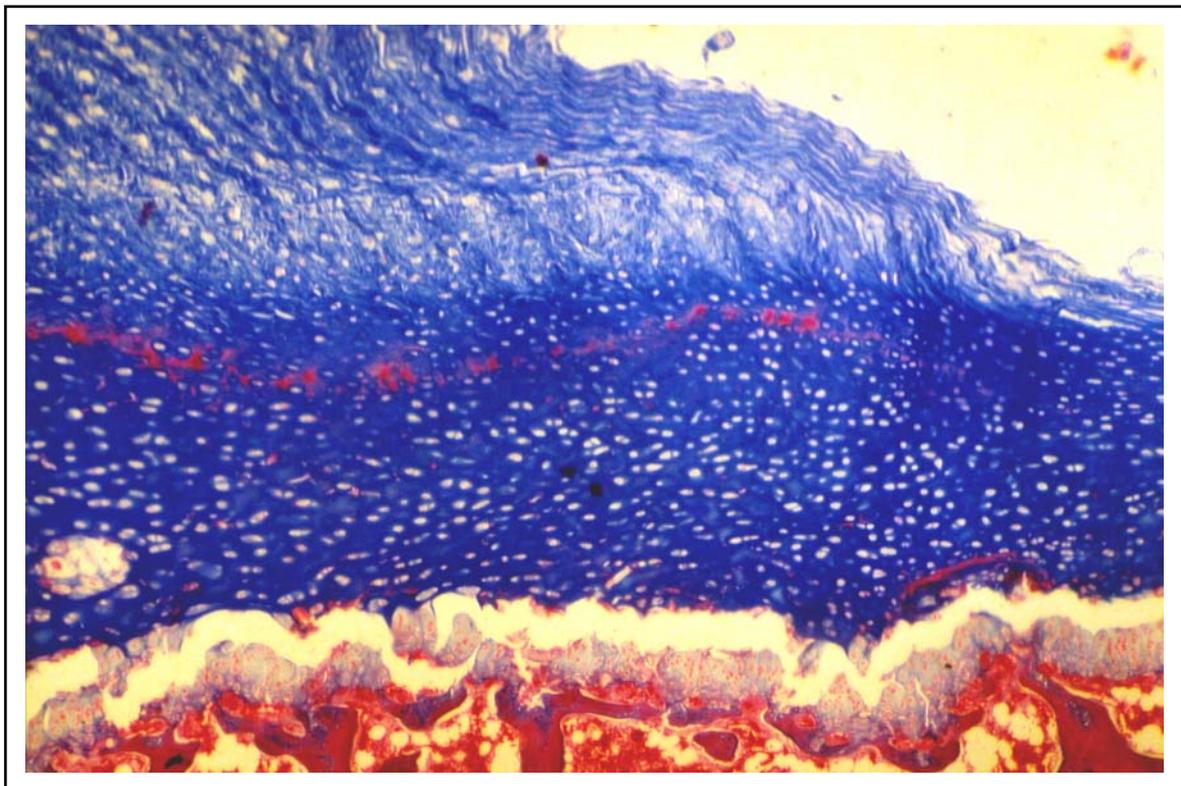


Abb. 27: Übersichtsaufnahme knöcherner Endfläche (unten) und knorpelige Abschlußplatte (Mitte des Bildes), oben: Faserknorpel und Nucleus pulposus, BWS, Azan, x 44.

3.3 Tabellarische Übersicht der Färbeergebnisse an den einzelnen histologischen Strukturen der Zwischenwirbelscheibe

Tab. 2: Färbeergebnisse der Zwischenwirbelscheibe

Färbemethode →	M-Tr	AB pH 2,5	Azan	LCA	WGA	MPA	PNA, WFA, HPA, UEA
anatomische Struktur ↓							
Osteone der knöchernen Endfläche	magenta-rot	ungefärbt	rot	hellbraun	hellbraun	mittelbraun	mittelbraun
Knochenmark	magenta-rot	ungefärbt	rot	hellbraun	dunkelbraun	mittelbraun	mittelbraun
Säulenknorpel	Matrix hellblau, Zytoplasma der Zellen farblos mit magenta-rottem Kern	Zellen ungefärbt, Matrix mittelblau	Zellen ungefärbt, Kerne rot, Matrix hellblau	Zellen ungefärbt, Kerne hellbraun, Matrix dunkelbraun	Zellen hellbraun, Matrix mittelbraun, Kerne dunkelbraun	Zellen ungefärbt, Kerne hellbraun, Matrix dunkelbraun	Zellen ungefärbt, Kerne hellbraun, Matrix dunkelbraun
nicht verkalkter hyaliner Knorpel	Matrix intensiv blau, Zytoplasma der Zellen farblos, Kerne rot	Zytoplasma der Zellen ungefärbt, Kerne braun, Matrix dunkelblau	Zytoplasma der Zellen ungefärbt, Kerne rot, breiter dunkelblauer Hof, Matrix blau	Zellen ungefärbt, Kerne schwach braun, Matrix schwach braun	Zellen ungefärbt, Kerne dunkelbraun, Hof farblos, Matrix mittelbraun	Kerne ungefärbt, Zellen schwachbraun, Hof dunkelbraun, Matrix mittelbraun mit hellen wolkigen Strukturen	Kerne ungefärbt, Zellen schwachbraun, Hof dunkelbraun, Matrix mittelbraun mit hellen wolkigen Strukturen

Anulus fibrosus	Kollagen blau, Fibroblastenkerne rot	generell mittelstarke Blaufärbung	Kollagen blau, Zytoplasma der Knorpelzellen ungefärbt mit rotem Kern	Kollagen hellbraun, Hof der Knorpelzellen dunkelbraun	Kollagen braun, Zellen ungefärbt, Hof der Knorpelzellen dunkelbraun	Kollagen braun, Zellen ungefärbt, Hof der Knorpelzellen dunkelbraun	Kollagen braun, Zellen ungefärbt, Hof der Knorpelzellen dunkelbraun
Nucleus pulposus	Geröllstrukturen blassrot, Kollagen blau, vereinzelte Knorpelzellen blassrot mit violetter Kern und blauem Hof	Knorpelzellen blau, Hof dunkelblau, kollagene Matrix blau	Kollagen blau, Knorpelzellen blaßrot, Kern rot, Hof blau, zum Teil violett, geröllartige Trümmerstrukturen blau	Knorpelzellen braun, Hof dunkelbraun, kollagene Matrix braun	Knorpelzellen braun, Hof dunkelbraun, kollagene Matrix braun	Knorpelzellen hellbraun, Kern und Hof dunkelbraun, Kollagen braun	Knorpelzellen hellbraun, Kern und Hof dunkelbraun, Kollagen braun

Übersichtstabelle der Färbeergebnisse an den jeweiligen anatomischen Strukturen der Zwischenwirbelscheibe.

3.4 Übersichtstabellen und Erläuterungen der lichtmikroskopischen Gewebemessungen an vier adulten männlichen *Macaca mulatta*

Im folgenden werden die lichtmikroskopischen Meßergebnisse hinsichtlich der Zellgrößen und Gewebedicken aufgeführt. Als Schnittpräparate dienten bei der Halswirbelsäule Proben aus dem Bereich der Zwischenwirbelscheibe zwischen dem 3. und 4. Halswirbelkörper, bei der Brustwirbelsäule Proben aus dem Bereich der Zwischenwirbelscheibe zwischen dem 8. und 9. Brustwirbelkörper, bei der Lendenwirbelsäule Proben im Bereich der Zwischenwirbelscheibe zwischen dem 3. und 4. Lendenwirbelkörper.

Tab. 3: Lichtmikroskopische Messung der Dicke der gesamten knorpeligen Abschlußplatte in der Halswirbelsäule.

HWS, gesamte Dicke der knorpeligen Abschlußplatte	
zentral kaudal	600 µm
zentral kranial	700 µm
peripher kaudal	700 µm
peripher kranial	850 µm

Tab. 4: Lichtmikroskopische Messung der Dicke der Zone des Säulen-Blasenknorpels in der Halswirbelsäule.

HWS, Dicke der Zone des Säulen-Blasenknorpels der Abschlußplatten	
zentral kaudal	90 µm
zentral kranial	110 µm
peripher kaudal	120 µm
peripher kranial	180 µm

Tab. 5: Lichtmikroskopische Messung der Dicke der gesamten knorpeligen Abschlußplatte in der Brustwirbelsäule.

BWS, gesamte Dicke der knorpeligen Abschlußplatte	
zentral kaudal	700 µm
zentral kranial	850 µm
peripher kaudal	1000 µm
peripher kranial	1250 µm

Tab. 6: Lichtmikroskopische Messung der Dicke der Zone des Säulen-Blasenknorpels in der Brustwirbelsäule.

BWS, Dicke der Zone des Säulen-Blasenknorpels der Abschlußplatte	
zentral kaudal	100 µm
zentral kranial	120 µm
peripher kaudal	150 µm
peripher kranial	200 µm

Tab. 7: Lichtmikroskopische Messung der Dicke der gesamten knorpeligen Abschlußplatte in der Lendenwirbelsäule.

LWS, gesamte Dicke der knorpeligen Abschlußplatte	
zentral kaudal	650 µm
zentral kranial	750 µm
peripher kaudal	1000 µm
peripher kranial	1200 µm

Tab. 8: Lichtmikroskopische Messung der Dicke der Zone des Säulen-Blasenknorpels in der Lendenwirbelsäule.

LWS, Dicke der Zone des Säulen-Blasenknorpels der Abschlußplatten	
zentral kaudal	130 µm
zentral kranial	130 µm
peripher kaudal	150 µm
peripher kranial	200 µm

Der Durchmesser der Knorpelzellen mit Hof im hyalinen Knorpel mißt im Durchschnitt etwa 40 µm (größter Durchmesser der überwiegend abgeflachten Territorien), im Faserknorpel etwa 25-27 µm (größter Durchmesser der meist ovalen Territorien), im Nucleus pulposus mißt er ebenfalls etwa 25-28 µm. Die Zellen liegen hier relativ isoliert und ihr Hof ist sehr deutlich abgrenzbar. Die Zellgröße variiert innerhalb eines Gewebetypes insgesamt nur wenig.

Generell fällt auf, daß die Dicke der knorpeligen Abschlußplatte kranial nahezu immer dicker ist als kaudal. Außerdem nimmt ihre Dicke von zentral nach peripher zu.

3.5 Befunde der lichtmikroskopischen Immunhistochemie

3.5.1 Immunhistochemischer Nachweis des Decorins

Decorin läßt sich in kräftiger Intensität im ganzen Anulus fibrosus nachweisen, also auch in der Zone des Faserknorpels (Abb. 28, 29). In der knorpeligen Abschlußplatte fällt die Färbung dagegen sehr viel schwächer aus und ist hier im Wesentlichen auf eine schmale Zone im Hof der hyalinen Knorpelzellen beschränkt. Im Nucleus pulposus treten einzelne deutlich angefärbte Faserzüge auf.

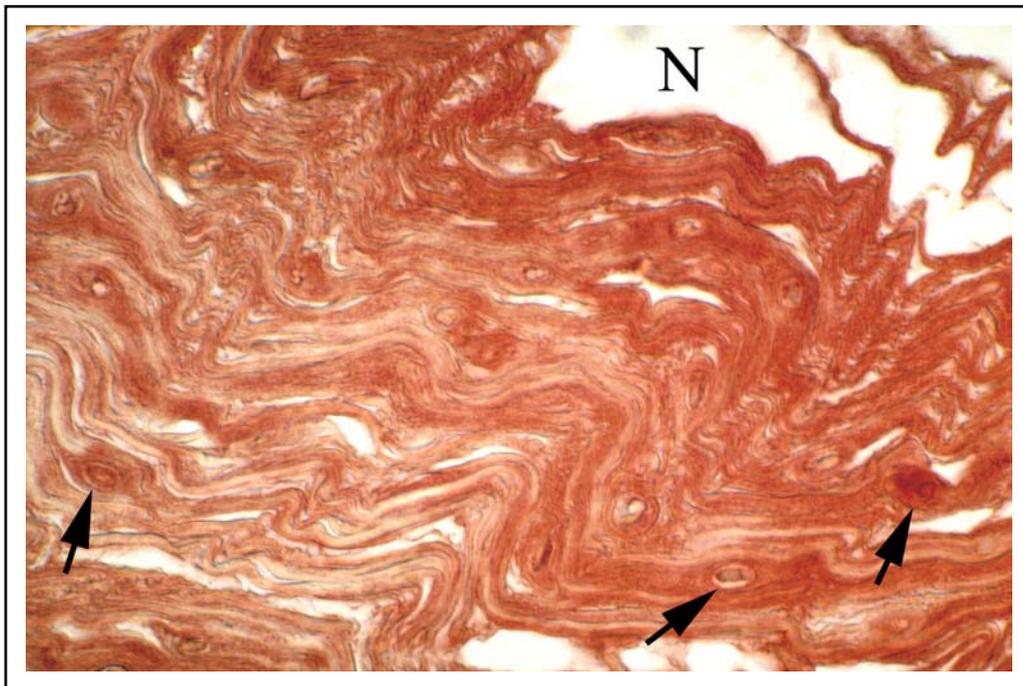


Abb. 28: Decorin-Nachweis im Faserknorpel in der Brustwirbelsäule des Rhesusaffen, (→: Knorpelzellen mit Hof, N: Nucleus pulposus), x 440.

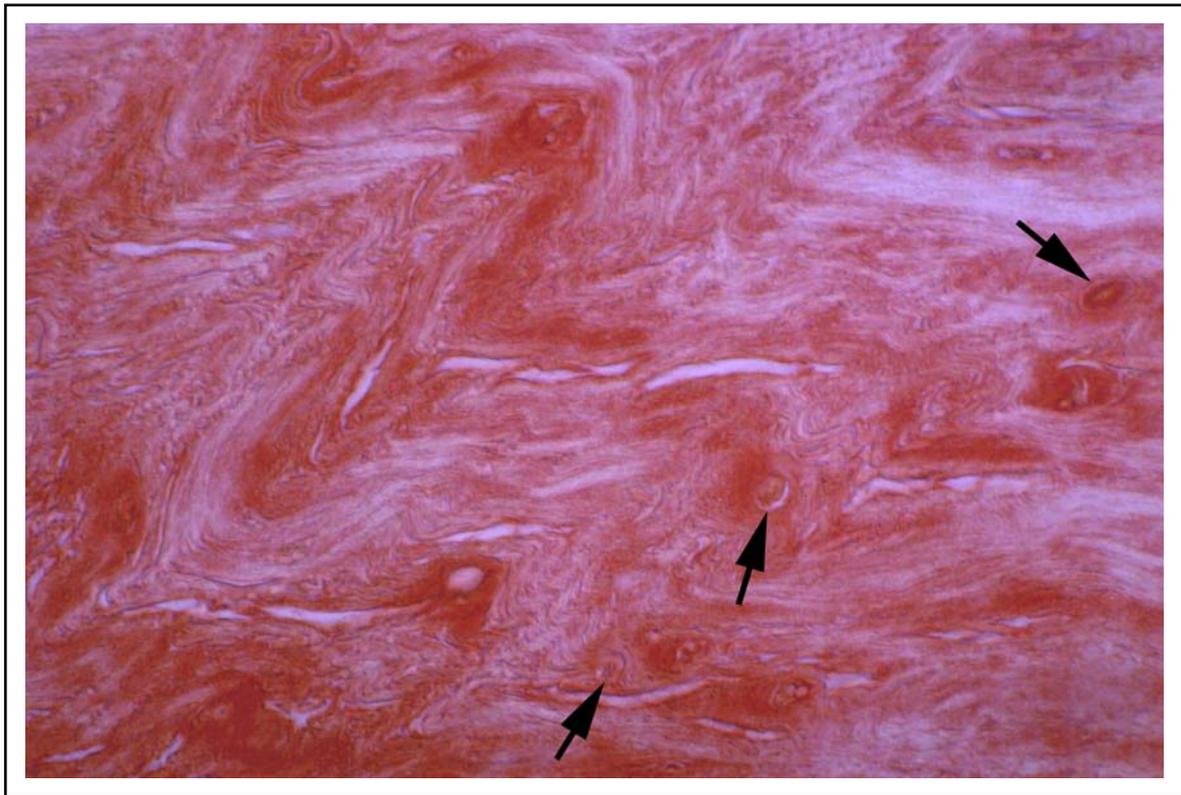


Abb. 29: Decorin-Nachweis im Faserknorpel in der Brustwirbelsäule des Rhesusaffen, (→: Knorpelzellen mit Hof), x 440.

3.5.2 Immunhistochemischer Nachweis des Chondroitin-6-Sulfats

Chondroitin-6-Sulfat kommt sowohl im Faserknorpel der Innenzone des Anulus fibrosus (Abb. 30 und 31) als auch im hyalinen Knorpel der Abschlußplatte vor. Eine schwach positive Reaktion ist in der Außenzone des Anulus fibrosus erkennbar.

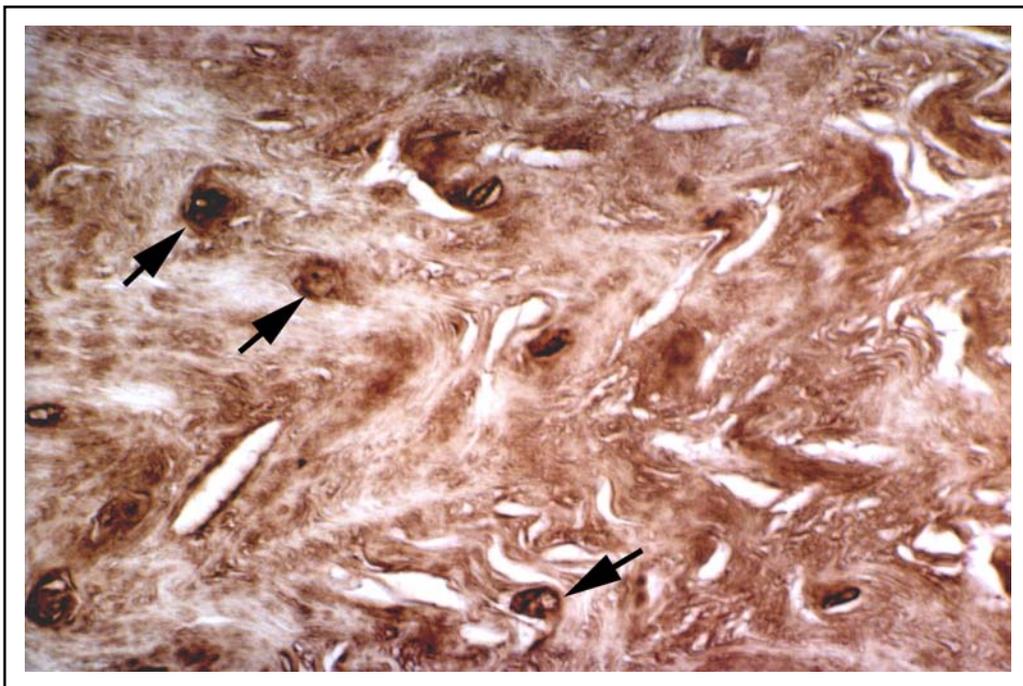


Abb. 30: Chondroitin-6-Sulfat-Nachweis im Faserknorpel in der Brustwirbelsäule des Rhesusaffen, (→: Knorpelzellen mit Hof), x 440.

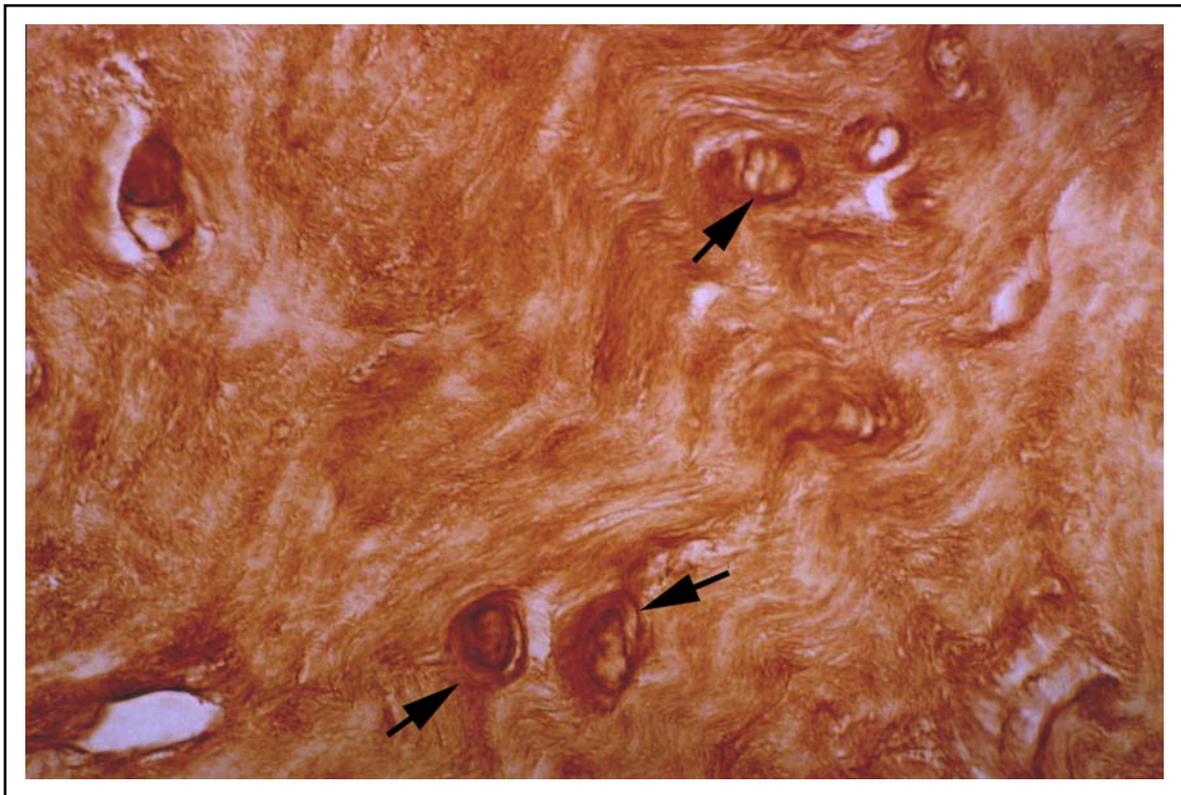


Abb. 31: Chondroitin-6-Sulfat-Nachweis im Faserknorpel in der Brustwirbelsäule des Rhesusaffen, (→: Knorpelzellen mit Hof), x 440.

3.5.3 Immunhistochemischer Nachweis des Dermatan-Sulfats

Dermatansulfat ist in kräftiger Reaktion im Faserknorpel der Innenzone des Anulus fibrosus (Abb. 32) und im hyalinen Knorpel der knorpeligen Abschlußplatte nachweisbar. Die Färbung der Höfe der Knorpelzellen ist intensiver als die der interterritorialen Matrix. Die Matrix des Blasenknorpels reagiert kräftig. Im Nucleus pulposus reagiert ein lockeres faseriges Netzwerk positiv.

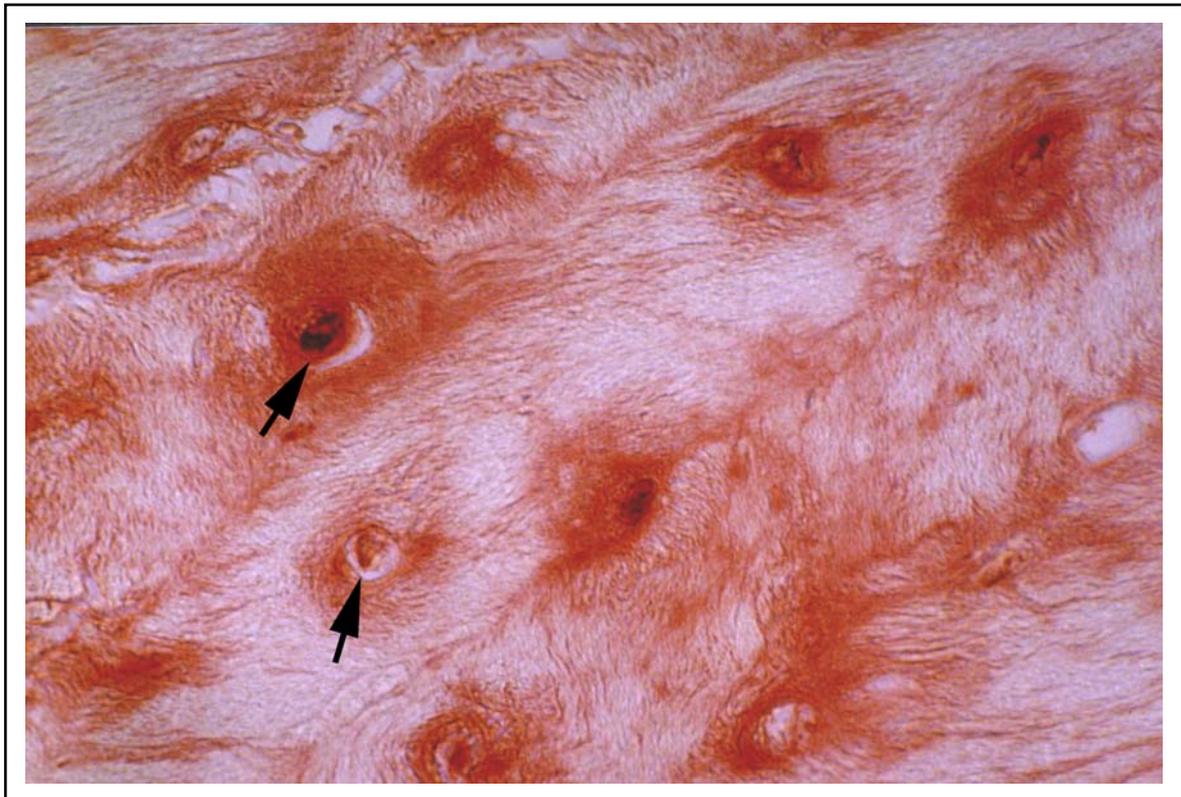


Abb. 32: Dermatan-Sulfat-Nachweis im Faserknorpel in der Brustwirbelsäule des Rhesusaffen, (→: Knorpelzellen mit Hof), x 440.

3.6 Färbeergebnisse zum Nachweis proliferierender Zellen im Bereich der Zwischenwirbelscheibe mit Ki-67 Antikörpern und PCNA (Proliferating Cells Nuclear Antigen)

Der immunhistochemische Nachweis proliferierender Zellen in der Zwischenwirbelscheibe ergab weitgehend negative Befunde. Nur ausnahmsweise fanden sich im Bereich der Innenzone des Anulus fibrosus und der knorpeligen Deckplatte der Wirbelkörper PCNA-positive Zellkerne (Abb. 33). Der Nachweis proliferierender Zellen mithilfe der PCNA-Immunhistochemie färbte generell nur relativ wenige Knorpelzellen. Abb. 33 zeigt einen deutlich positiven Zellkern einer Faserknorpelzelle.



Abb. 33: Zwischenwirbelscheibe, BWS, Faserknorpelzelle mit PCNA-positivem Kern (→), x 500.

3.7 Elektronenmikroskopischer Nachweis von Proteoglykanen in der Zwischenwirbelscheibe von *Macaca mulatta* unter Verwendung der CMB-Methode

CMB (Cupromeronic blue) markiert im Gewebe vorkommende Proteoglykane. Der elektronendichte Farbstoff CMB bindet an die negativen elektrischen Ladungen der Glykosaminoglykane in der extrazellulären Matrix des Bindegewebes. Das CMB bildet nadelförmige Präzipitate, die die Gestalt der Proteoglykane in situ wiedergeben. Generell ist die Dichte der CMB-Präzipitate bei 0.06 M Elektrolytlösung sehr viel dichter als bei 0.3 M.

Die CMB-Präzipitate finden sich in zwei Lokalisationstypen:

- 1) sie finden sich an der Oberfläche von Kollagenfibrillen, wo sie in allen möglichen Richtungen angeordnet sind und dicht gedrängt vorkommen (Abb. 34). Die feinen, nadelförmigen Präzipitate messen in der Länge ca. 120 nm. Sie können benachbarte Fibrillen verbinden. Die unregelmäßige Anordnung an der Oberfläche der Fibrillen macht es unmöglich zu bestimmen, wie viele Proteoglykane pro D-Periode an der Fibrille befestigt sind.
- 2) CMB-Präzipitate finden sich frei in der Matrix, ohne Beziehung zu Kollagenfibrillen.

Sehr interessant ist der Befund, daß sich auch im Inneren der Kollagenfibrillen zahlreiche sehr feine, 24 nm lange CMB-Präzipitate beobachten lassen. Diese sind bei 0.06 M Elektrolytlösung zahlreicher und kräftiger gefärbt als bei 0.3 M. Sie sind regelmäßig in bandenförmiger Periodik angeordnet (Abb. 36).

Auch in den CMB-Präparaten lassen sich Durchmesser und D-Periode der Kollagenfibrillen messen. Die D-Periode beträgt ca. 55 nm (Abb. 37). Der Durchmesser variiert von 75 nm bis 120 nm.

Die CMB-Präzipitate, die sich in Räumen finden, die kein Kollagen enthalten (Abb. 38), sind relativ groß und können verzweigt sein (Abb. 39).

In der Matrix der Randzone des Nucleus pulposus lassen sich einzelne elastische Fasern finden, deren Oberfläche dicht mit relativ kleinen CMB-Präzipitaten bedeckt ist (Abb. 40).

Die einzelnen Knorpelzellen am Rande des **Nucleus pulposus** besitzen in ihrem Zytoplasma regelmäßig große Lipideinschlüsse, (Abb. 41). An ihrer Oberfläche bilden sie viele unterschiedlich lange und oft verzweigte Fortsätze aus. An der Oberfläche der Zellmembran lassen sich bei 0.06 M Elektrolytlösung zahlreiche CMB-Präcipitate nachweisen (Abb. 43). Diese sind bei 0.3 M deutlich seltener. Sie sind von einem recht klar begrenzten Hof aus Proteoglykanen und Kollagenfibrillen umgeben (Abb. 41). Häufig finden sich in diesem Hof eigentümliche oft periodisch strukturierte Verdichtungen (Abb. 42).

Die Menge der CBM-Präcipitate ist bei einer 0.06 M Elektrolytlösung stets deutlich größer als bei 0.3 M.

Im Bereich des **Anulus fibrosus** sind die CMB-Präcipitate ganz überwiegend an der Oberfläche der dicht gelagerten Kollagenfibrillen zu finden. Sie sind hier, wie auf den Fibrillen der Peripherie des Nucleus pulposus, in ganz verschiedener Ausrichtung angeordnet (längs, schräg, ringförmig), oder sie verbinden benachbarte Kollagenfibrillen (Abb. 44, 45).

Im Inneren der Fibrillen treten regelhaft angeordnete kleine CMB-Präcipitate auf (Abb. 44).

In den kollagenfreien Räumen des **Faserknorpels** treten regelmäßig CMB-Präcipitate auf, die oft groß und verzweigt sind. Die Oberfläche der Knorpelzellen des Faserknorpels der Innenzone ist mit kleinen CMB-Präcipitaten besetzt.

Die D-Periode der Kollagenfibrillen der Innenzone beträgt ca. 55 nm. In der Außenzone beträgt sie ebenfalls 55 nm. Der Durchmesser der Fibrillen variiert und kann 145 nm erreichen. Die großen Knorpelzellen im Faserknorpel (Abb. 46) können Lipidtropfen

enthalten. Auffällig ist, daß sie oft große Sekretgranula (330 nm im Durchmesser) enthalten, deren Inhalt aus CMB-Präcipitaten besteht (Abb. 46). Sie sind von einem Hof umgeben, in dem typische Kollagenfibrillen selten sind. Die helle Innenzone des Hofes enthält locker verteilt CMB-Präcipitate. Die Außenregion des Hofes ist durch Material gekennzeichnet, das eine Streifenstruktur mit einer Periodik von ca. 75 nm aufweist (Abb. 46, 47). Die dunklen Banden dieses Materials bestehen aus feinen CMB-Präcipitaten. Außerdem sind regelmäßig unterschiedlich große scharf begrenzte Felder sehr dicht gelagerter kleiner CMB-Präcipitate zu beobachten (Abb. 46), in denen CMB-freie „Löcher“ auftreten.

Auch die **knorpeligen Abschlussplatten** sind reich an Proteoglykanen, die sich mit der CMB-Methode darstellen lassen (Abb. 48). Die Knorpelzellen sind von einem dichten Hof kleiner Präzipitate umgeben. In der interterritorialen Matrix treten in relativ großer Zahl 70nm- 80nm dicke Kollagenfibrillen mit gut erkennbarer Querstreifung auf. Sie gleichen den Kollagenfibrillen, die vom Typ I Kollagen aufgebaut werden, und sind dicht mit CMB-Präzipitaten besetzt.

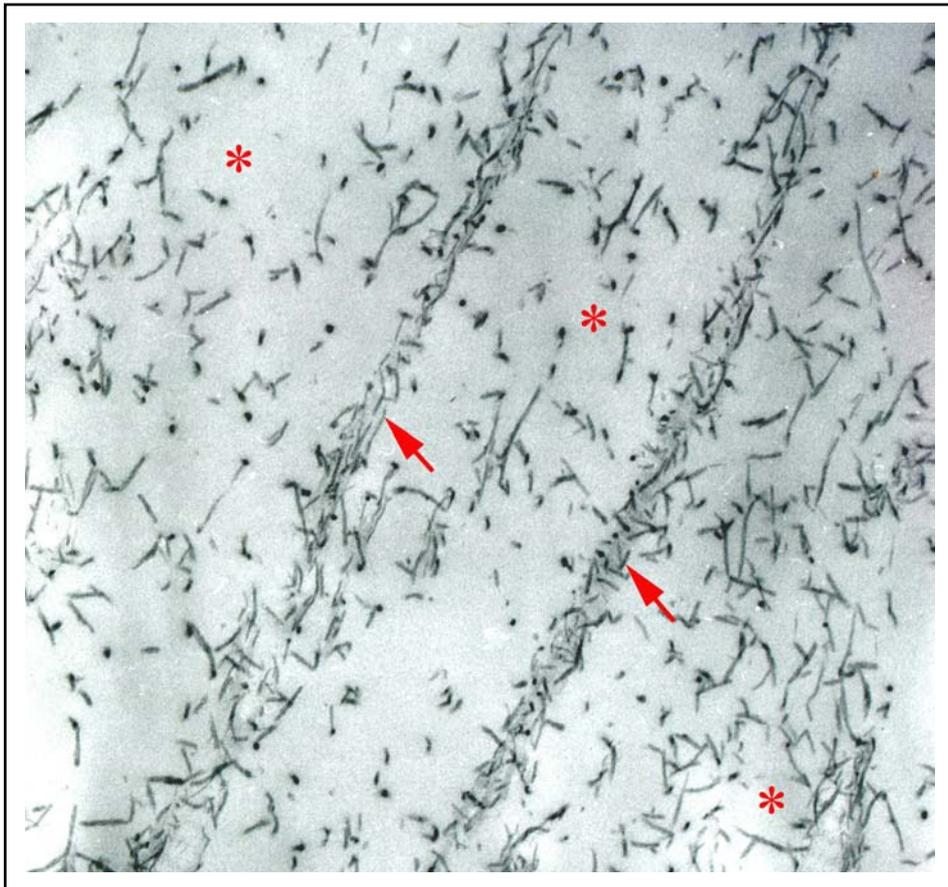


Abb. 34: BWS, Nucleus pulposus, Proteoglykannachweis mit CMB, 0.3 M. Tangentialschnitt durch zwei Kollagenfibrillen (→), die außen von Proteoglykanen bedeckt sind. Weite Zwischenräume (*) sind mit CMB-Präcipitaten ausgefüllt. Vergrößerung: x 65550.

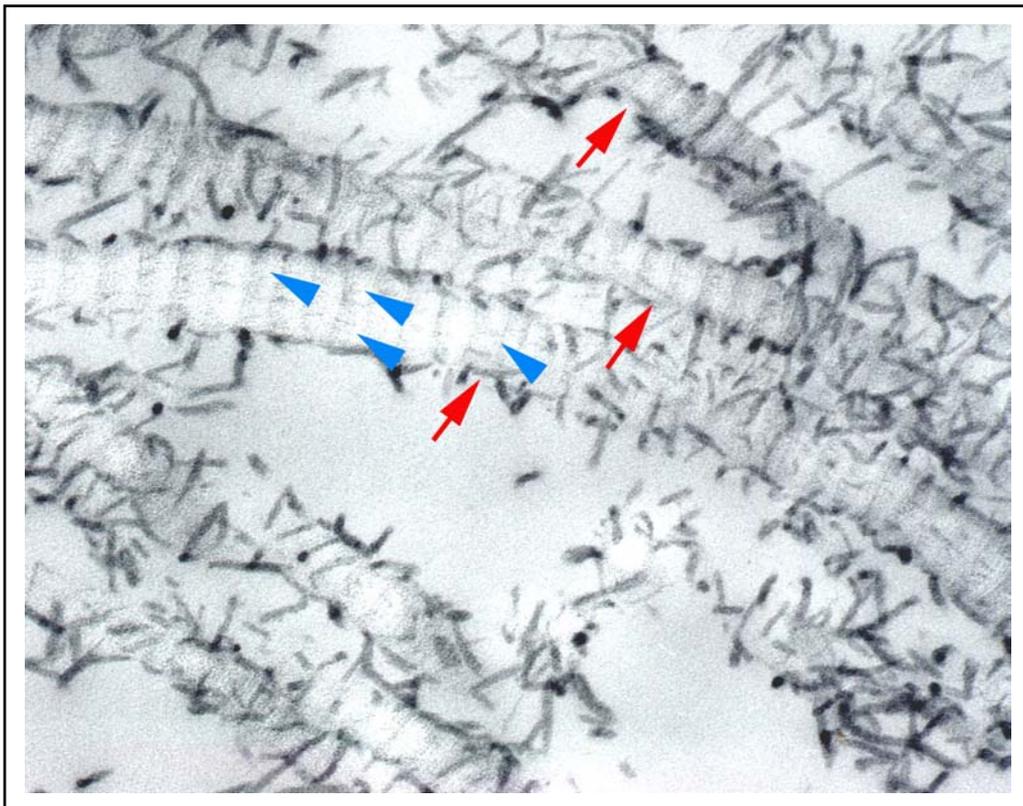


Abb. 35: BWS, Nucleus pulposus Außenzone, Proteoglykannachweis mit CMB, 0.3 M. Kollagenfibrillen (rote Pfeile) mit CMB-Präcipitaten dekoriert. Im Inneren der Fibrillen feine CMB-Präcipitate (blaue Pfeilköpfe). Vergrößerung: x 121716.

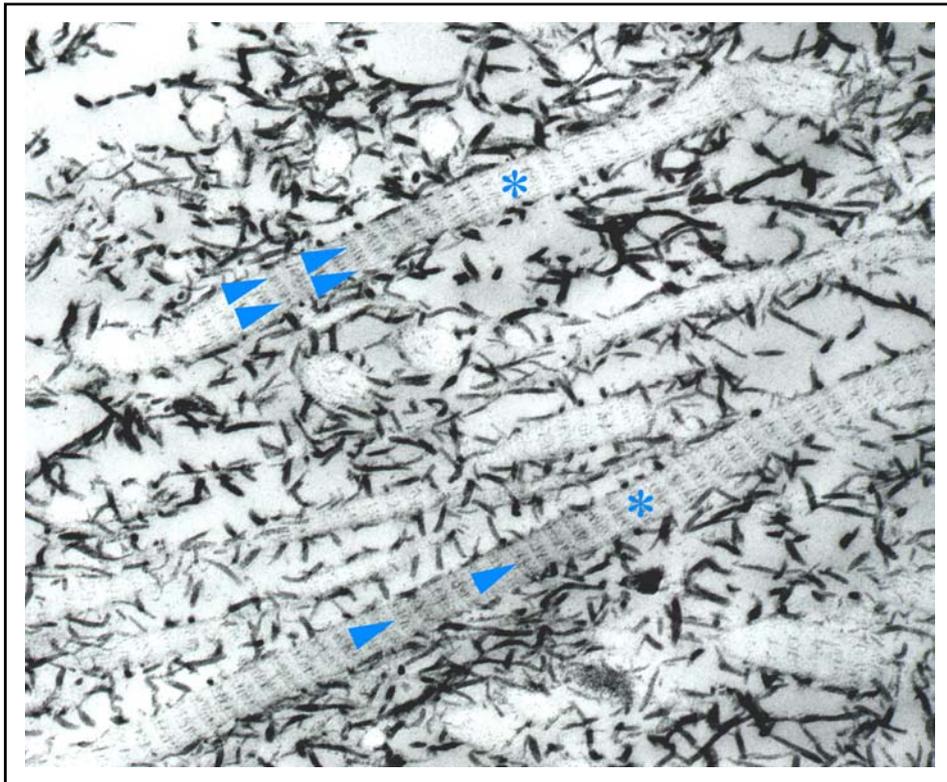


Abb. 36: BWS, Nucleus pulposus, Außenzone, Proteoglykannachweis mit CMB, 0.06 M. In den Kollagenfibrillen (*) sind deutlich regelmäßig angeordnete kleine CMB-Präcipitate zu erkennen (▶). An der Oberfläche der Fibrillen und im Zwischenraum reich entwickelte Proteoglykane. Vergrößerung: x 65550.

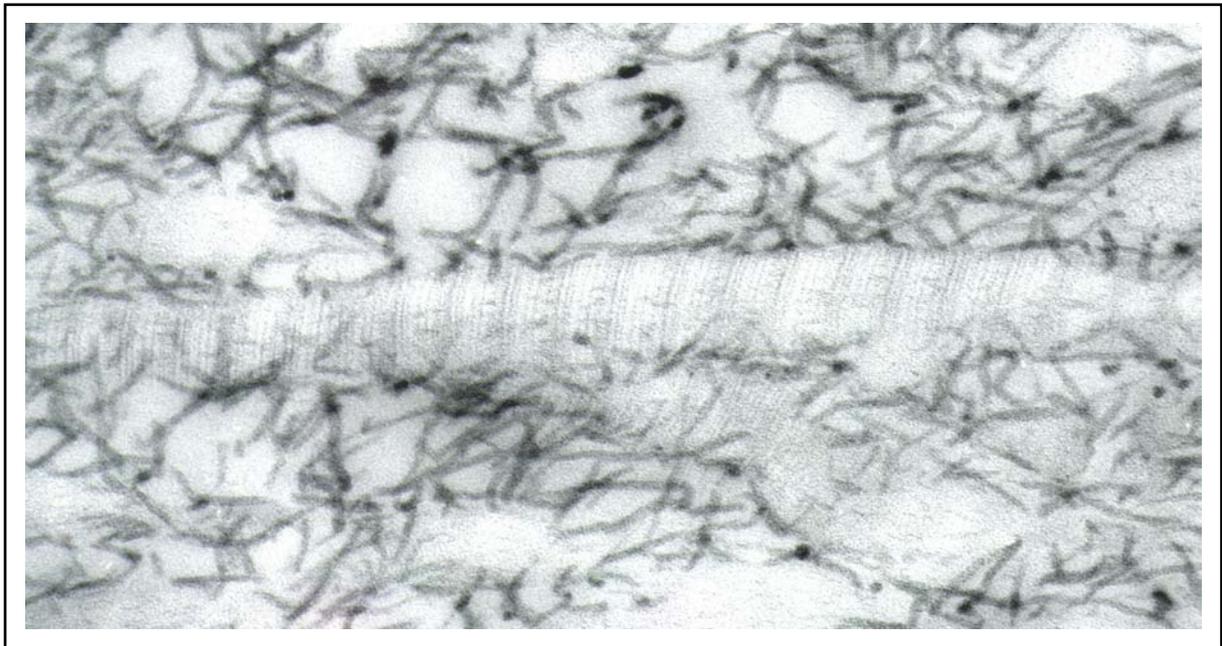


Abb. 37: BWS, Nucleus pulposus, Außenzone, Proteoglykannachweis mit CMB, 0.3 M. Kollagenfibrille (Typ I) mit gut erkennbarer Periodik. Vergrößerung: x 121716.

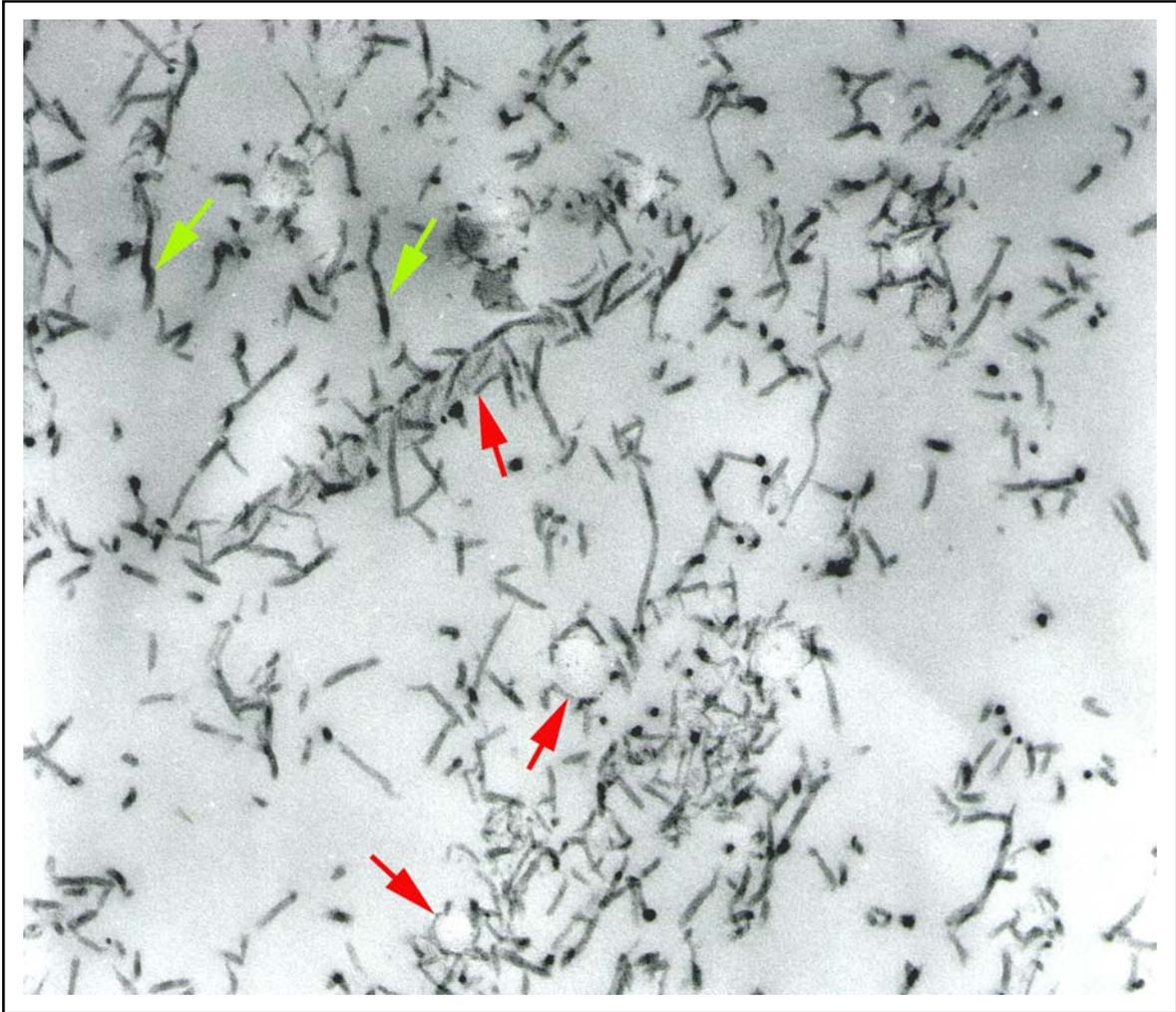


Abb. 38: BWS, Nucleus pulposus, Proteoglykan- und Glycosaminoglykannachweis mit CMB, 0.3 M. Region mit nur wenigen Kollagenfibrillen (rote Pfeile) und großen CMB-Präzipitaten (grüne Pfeile) in der amorphen Matrix. Vergrößerung: x 89700.

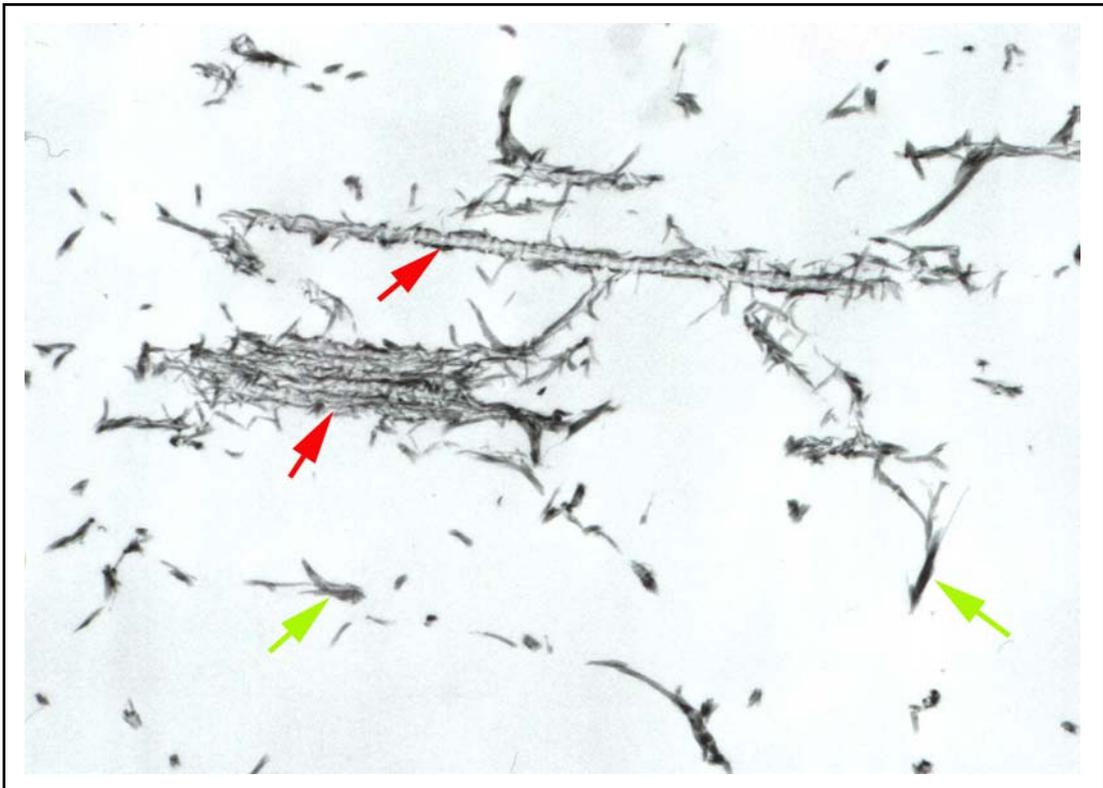


Abb. 39: BWS, Nucleus pulposus, Proteoglykan- bzw. Glycosaminoglykan- nachweis mit CMB, 0.6 M. Region mit nur wenigen Kollagenfibrillen (rote Pfeile) und sehr großen CMB-Präzipitaten (grüne Pfeile) in der amorphen Matrix. Vergrößerung: x 27167.

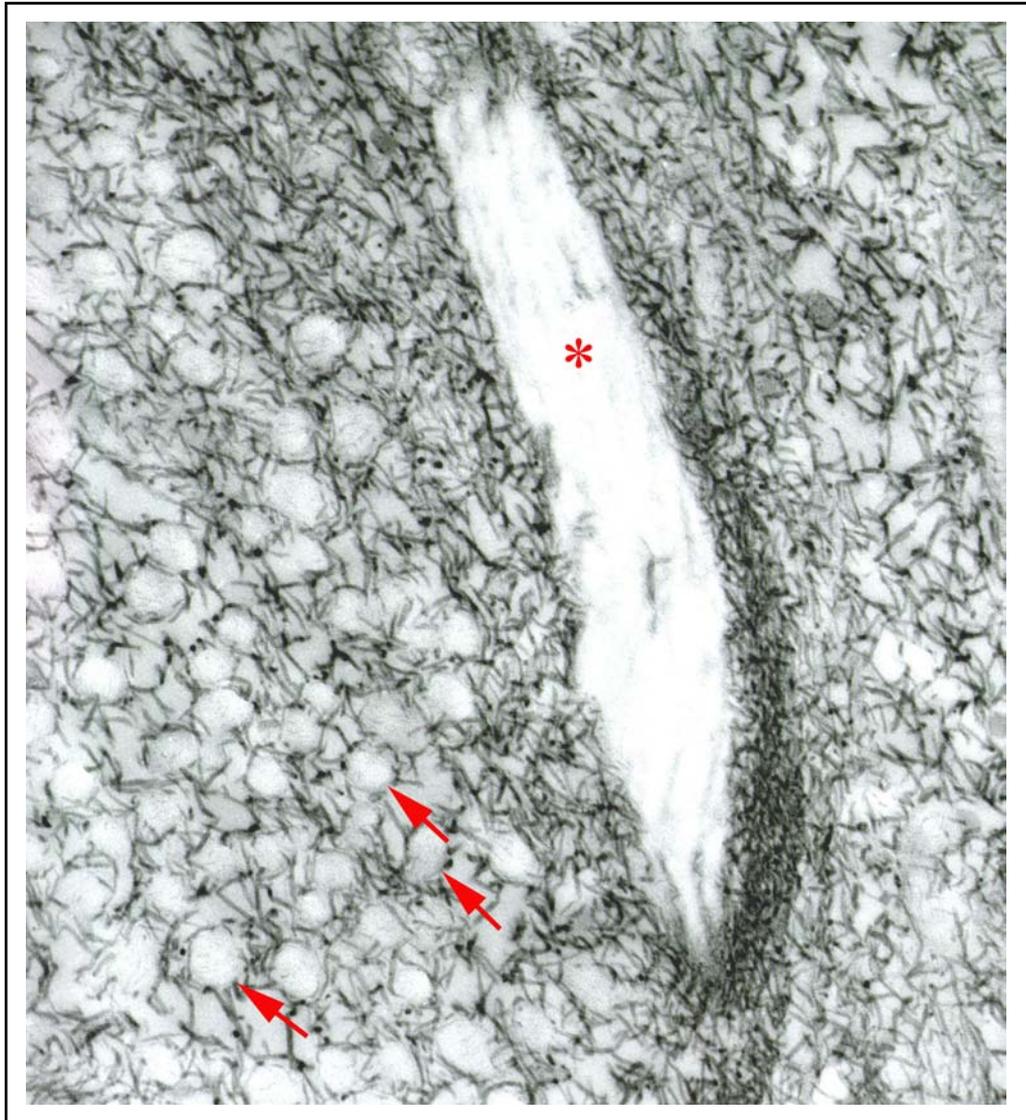


Abb. 40: BWS, Nucleus pulposus, Außenzone, Proteoglykannachweis mit CMB, 0.3 M. Eine elastische Faser (*), die außen dicht mit kleinen CMB-Präcipitaten bedeckt ist. (→: quergetroffene Kollagenfibrillen). Vergrößerung: x 66654.

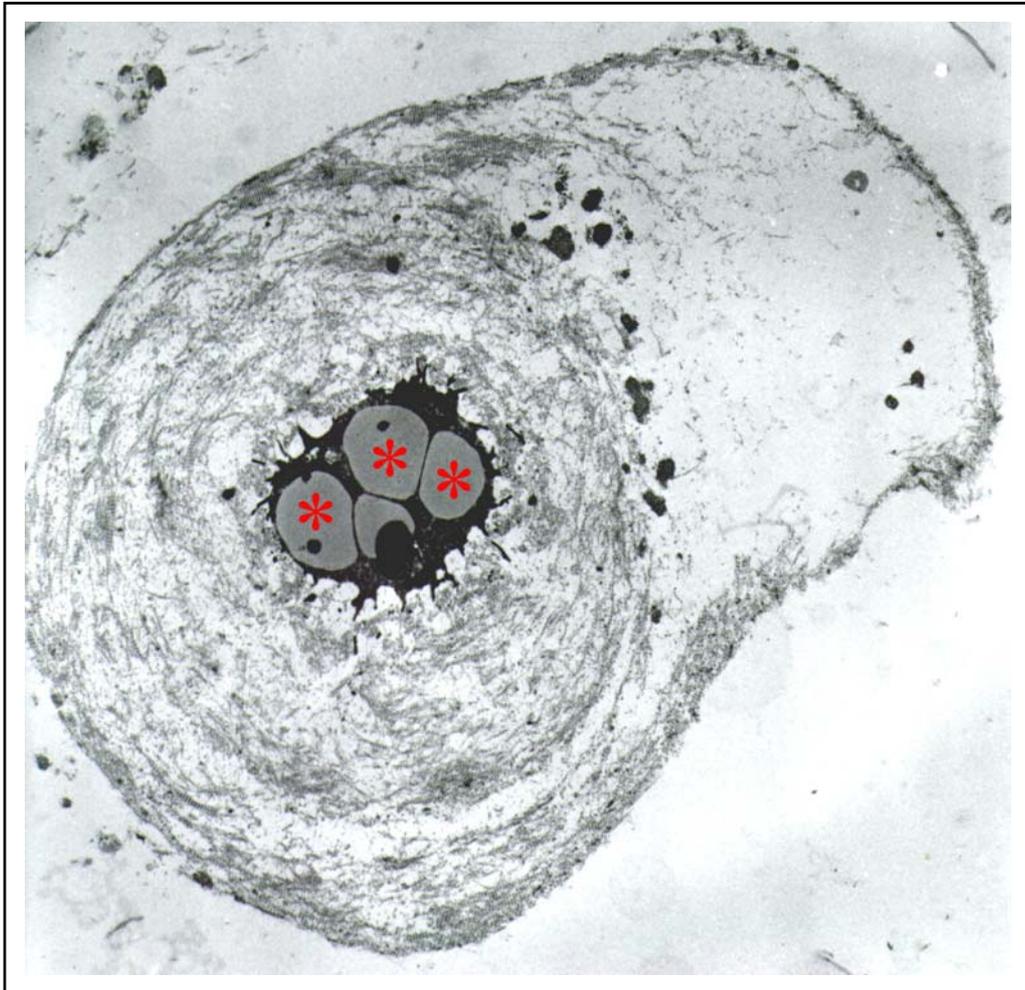


Abb. 41: BWS, Nucleus pulposus, Außenzone, Proteoglykannachweis mit CMB 0.3 M. Knorpelzelle, die große Lipidtropfen (*) enthält und von einem klar begrenzten Hof umgeben ist. Vergrößerung: x 6785.

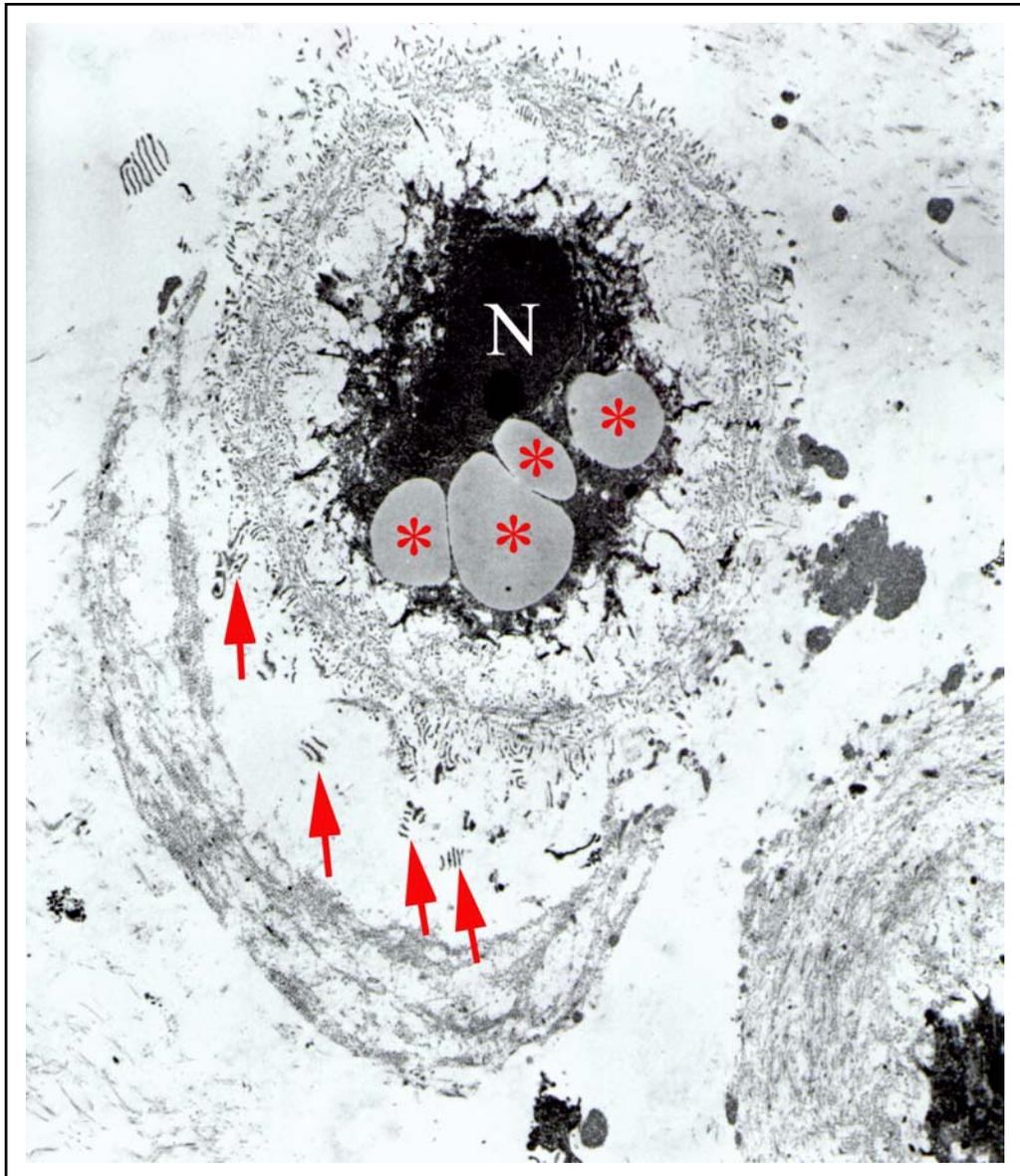


Abb. 42: BWS, Nucleus pulposus, Außenzone, Proteoglykannachweis mit CMB, 0.3 M. Knorpelzelle (N: Zellkern) mit Lipidtropfen (*) und großem Hof, der u. a. eigentümlich bandförmig organisiertes Material (→) enthält. Vergrößerung: x 6785.

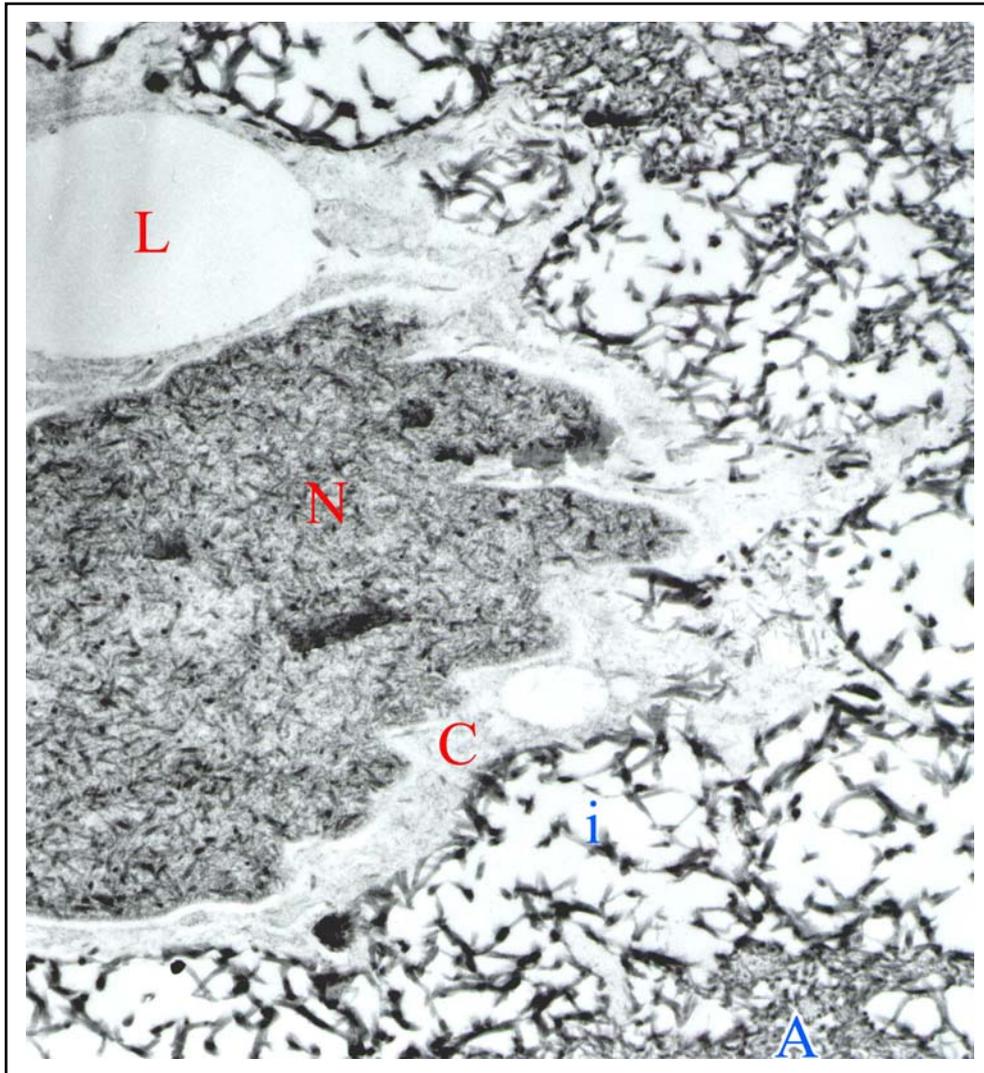


Abb. 43: BWS, Nucleus pulposus, Außenzone, Proteoglykannachweis mit CMB 0.6 M. Knorpelzelle (N: Kern, C: Zytoplasma, L: Lipideinschluß), deren Oberfläche dicht mit CMB-Präcipitaten besetzt ist. Die Proteoglykane der Innenzone (i) des Hofes sind lockerer angeordnet als in der Außenzone (A). Im Kern reagieren hier die negativ geladenen Kernsäuren. Vergrößerung: x 36609.

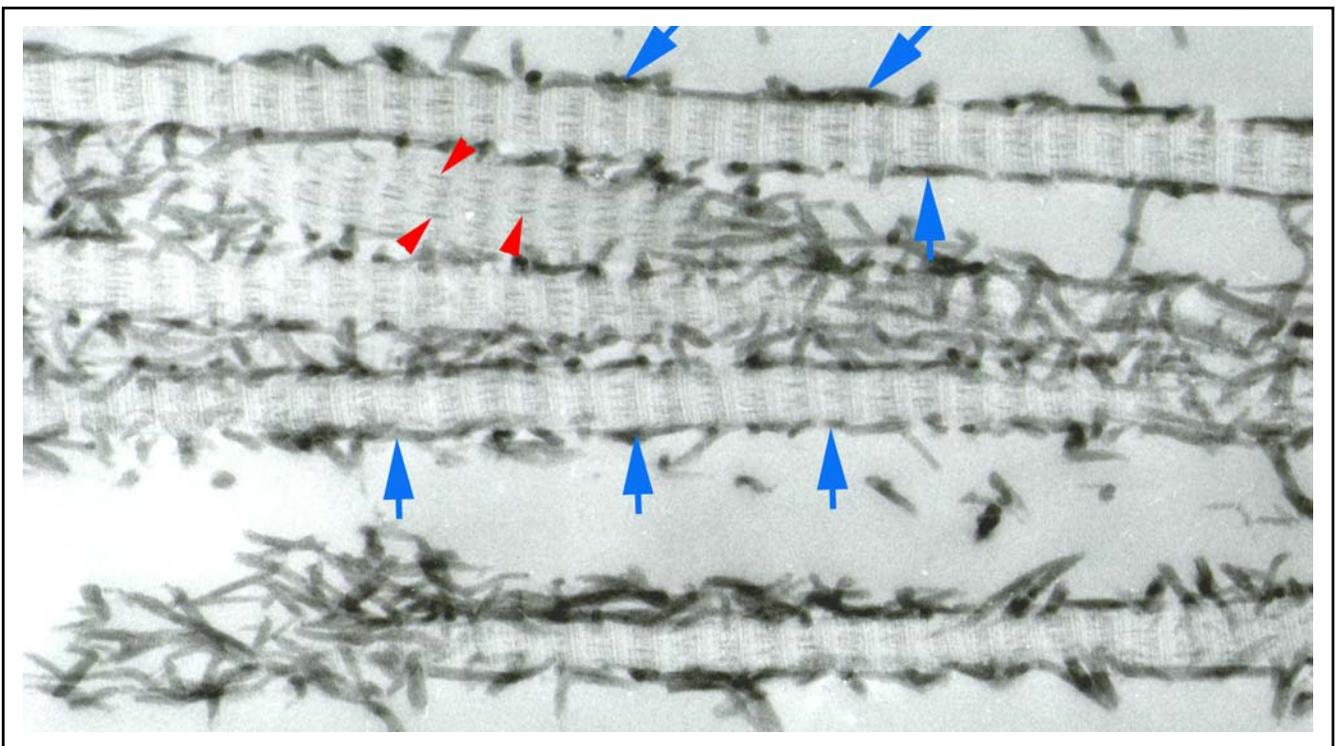


Abb. 44: BWS, Anulus fibrosus, Innenzone, Proteoglykannachweis mit CMB 0.6 M. Kollagenfibrillen, die außen dicht mit CMB-Präcipitaten umhüllt sind (→) und feine intrafibrilläre CMB-Präcipitate enthalten (▲). Vergrößerung: x 90293.

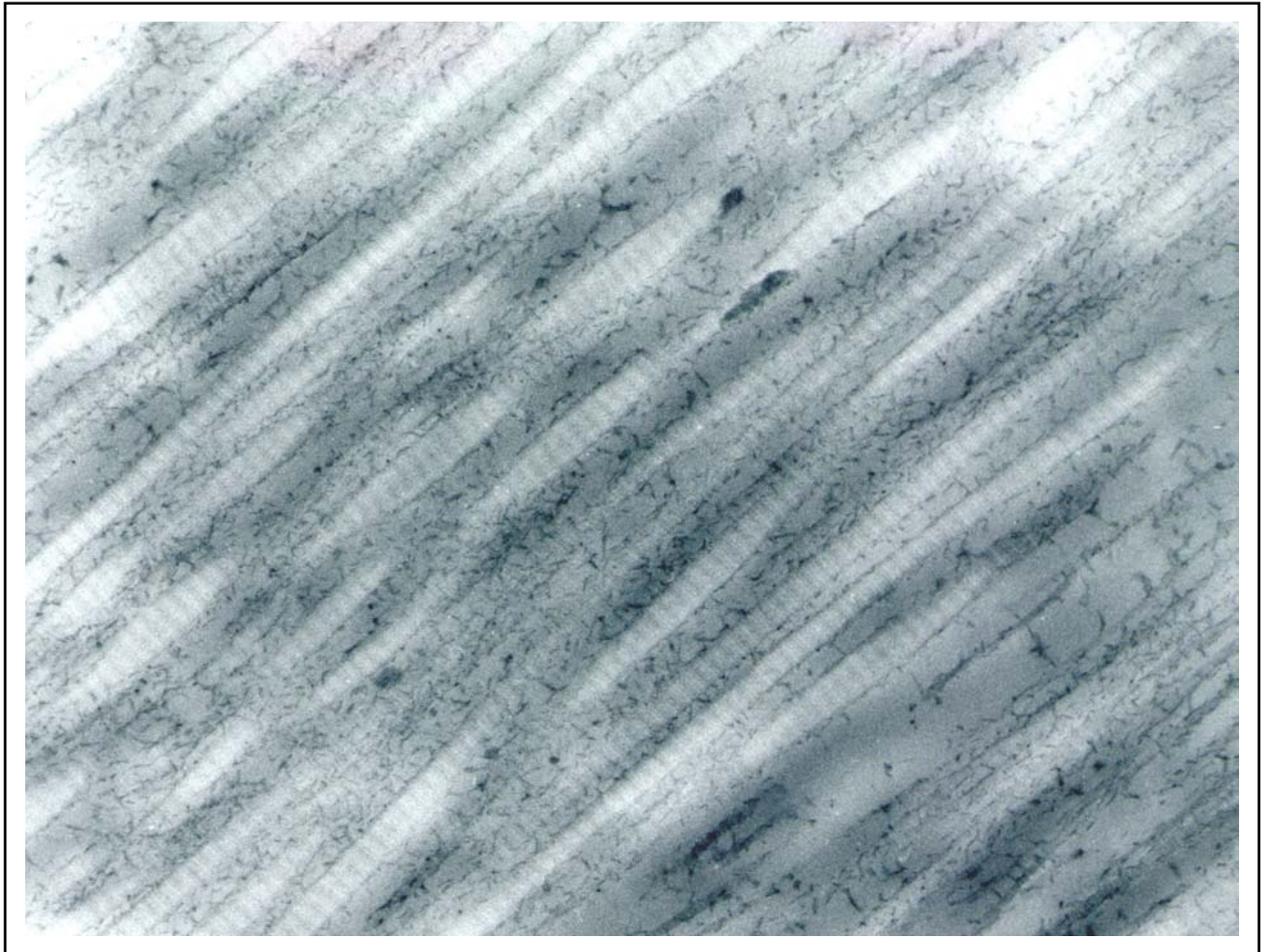


Abb. 45: BWS, Anulus fibrosus, Außenzone, Proteoglykannachweis mit CMB 0.3 M. Dichtgepackte Kollagenfibrillen, die außen mit CMB-Präcipitaten bedeckt sind. Vergrößerung: x 50000.

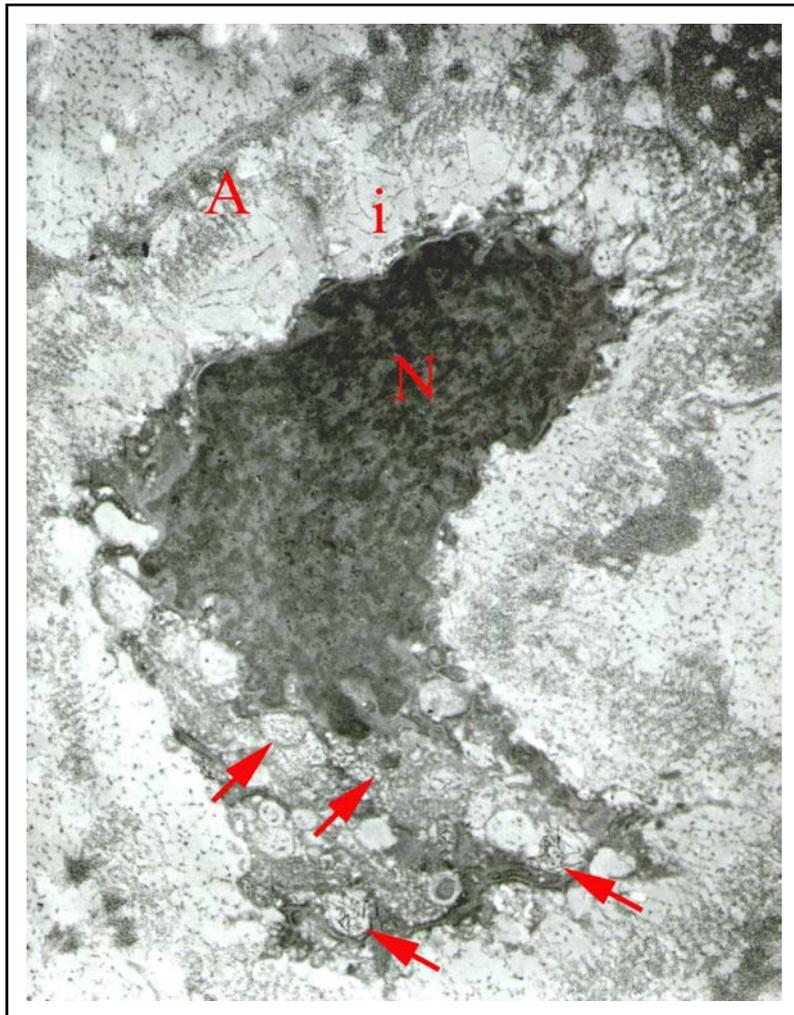


Abb. 46: BWS, Anulus fibrosus, Innenzone, Proteoglykannachweis mit CMB 0.3 M. Knorpelzelle (N: Zellkern) im Faserknorpel. Beachte die Sekretionsgranula mit CMB-Präzipitaten (→). Hof innen (i) lockerer als außen (A). Vergrößerung: x 27167.



Abb. 47: BWS, Anulus fibrosus, Innenzone, Proteoglykannachweis mit CMB 0.3 M. Äußerer Bereich des Hofes einer Knorpelzelle; auffällig ist die Zusammenlagerung kleiner CMB-Präzipitate zu streifenförmigen Strukturen (→). Vergrößerung: x 36600.

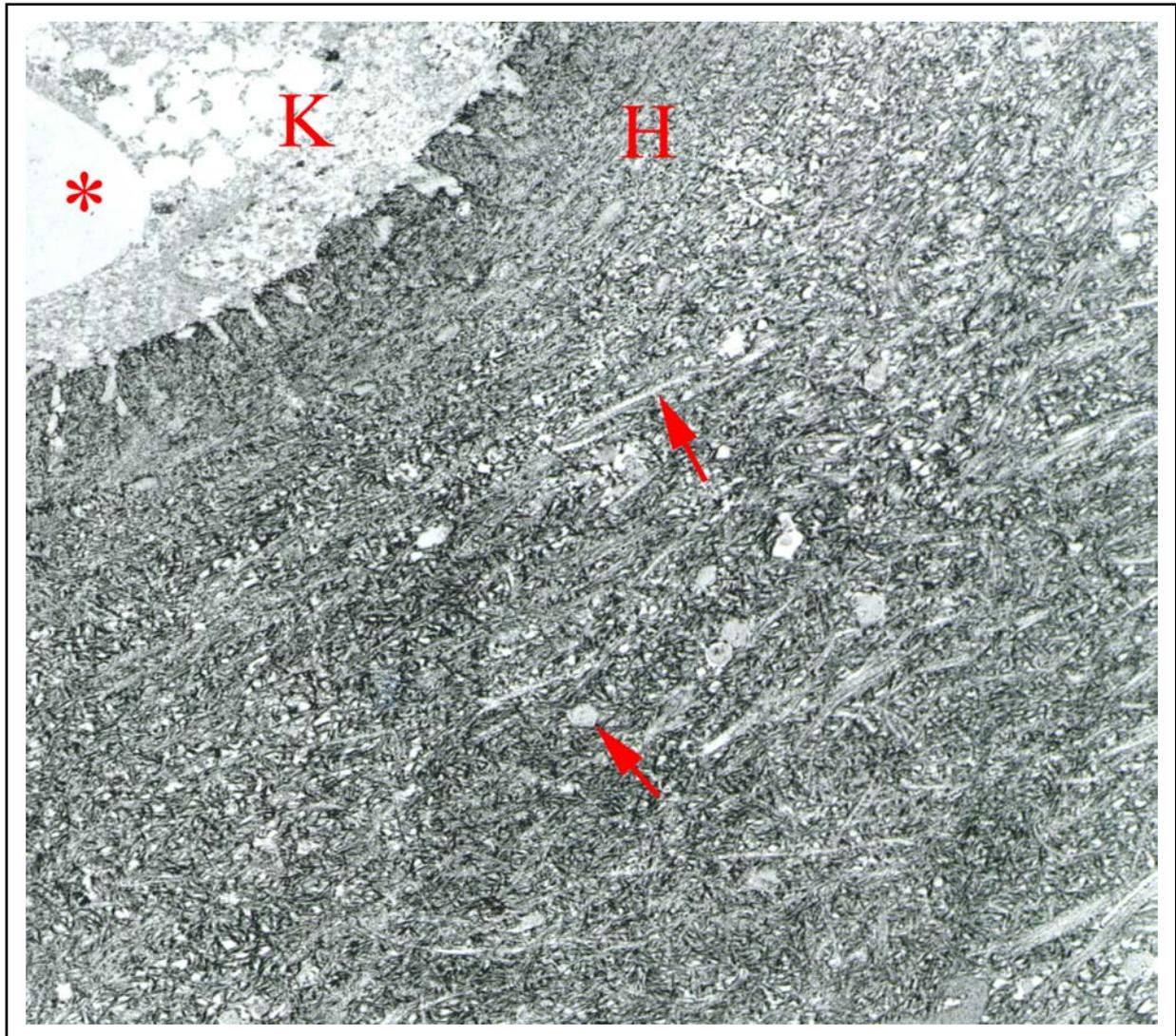


Abb. 48: BWS, knorpelige Abschlussplatte, Proteoglykannachweis mit CMB, 0.3 M; Knorpelzelle (K) mit Lipideinschlüssen (*). Schmalen Hof (H) mit zahlreichen Proteoglykanen. Beachte, dass in der interterritorialen Matrix, relativ viele Kollagenfibrillen auftreten (→), die den Kollagenfibrillen vom Typ I entsprechen. Vergrößerung: x 12006.

3.8 Zusammenfassung der Befunde

In der vorliegenden Arbeit wurde mit verschiedenen cyto- und histochemischen Methoden die Zwischenwirbelscheibe (Discus intervertebralis) in verschiedenen Abschnitten der Wirbelsäule von adulten Rhesusaffen (*Macaca mulatta*) untersucht.

Ziel der Arbeit war die Analyse des strukturellen Aufbaus und der Verteilung histochemisch und immunhistochemisch erfassbarer Komponenten der Zwischenwirbelscheibe eines höheren Primaten, der recht eng mit dem Menschen verwandt ist. Die Analyse des Aufbaus der Zwischenwirbelscheibe ist aus zellbiologischer Sicht von besonderem Interesse, weil hier auf engem gefäßfreiem Raum ganz unterschiedliche Formen des Binde- bzw. Stützgewebes vorkommen.

Schwerpunktmäßig kamen Methoden zum Einsatz, mit deren Hilfe Glykosaminoglykane und Glykoproteine im Schnittpräparat nachgewiesen werden können, wie z. B. Färbung mit Alcianblau, Cupromeronic Blue (CMB) sowie Lektine und Immunhistochemie.

Rhesusaffen sind höhere Primaten und können daher als Modellorganismen für den Menschen angesehen werden.

Durch lichtmikroskopische Färbeverfahren läßt sich der histologische Aufbau der Zwischenwirbelscheibe in verschiedene Bereiche gliedern: Die knorpelige Abschlußplatte mit hyalinem Knorpel, einschließlich Säulen- und Blasenknorpel, den Anulus fibrosus (Faserring) und den Nucleus pulposus (Gallertkern). Die Innenzone des Anulus fibrosus besteht aus Faserknorpel. Der Nucleus pulposus ist durch Übergangszonen mit seiner Umgebung verbunden. Auch der Faser- und hyaline Knorpel sind durch breite Übergangszonen verbunden.

Die Dicke der knorpeligen Abschlußplatte variiert. Sowohl in der Halswirbelsäule, der Brustwirbelsäule, als auch in der Lendenwirbelsäule ist die Knorpelplatte generell kranial

dicker als kaudal (kranial und kaudal: bezogen auf den Wirbelkörper), was möglicherweise auf die Druckbelastung durch das Körpergewicht der Rhesusaffen zurückzuführen ist.

Die Knorpelplatten werden sowohl kranial als auch kaudal in allen Wirbelsäulenbereichen zum Zentrum hin generell immer dünner, so daß der Eindruck einer Art Wanne für die Lagerung des Nucleus pulposus entsteht, was vermutlich die mechanisch günstige Kissenform des Nucleus pulposus unterstützt. Da der Nucleus pulposus sowohl von kranial als auch von kaudal schüsselförmig eingefäßt wird, wird somit sicherlich seine Lagestabilität gefördert.

Der Nucleus pulposus ist sehr locker strukturiert und enthält neben Kollagenfasern vor allem Glykosaminoglykane. Er entspricht einem ungewöhnlich faserarmen und glykosaminoglykan- sowie wasserreichem Bindegewebe. Zellen (meist Knorpelzellen) sind relativ selten.

Besonders auffällig sind Unterbrechungen in den knorpeligen Abschlußplatten, die jenen pathologischer Veränderungen der menschlichen Zwischenwirbelscheibe ähneln, wobei die Makakenwirbelsäule jedoch, anders als z. T. beim berufstätigen Menschen, durch artgerechte Haltung nicht unphysiologisch belastet wurde.

Mittels des immunhistochemischen PCNA-Nachweises (proliferating cells nuclear antigen) ließ sich zeigen, daß die Proliferationsrate von Knorpelzellen innerhalb der Zwischenwirbelscheibe des Rhesusaffen erstaunlich gering ist.

Faser- und hyaliner Knorpel sind insbesondere durch ihren Gehalt an spezifisch verteilten Kollagenen und Proteoglykanen gekennzeichnet. Die Innenzone des Anulus fibrosus ist reich an Decorin sowie Chondroitin-6-Sulfat und Dermatansulfat. Die letztgenannten Glykosaminoglykane sind aber auch in den knorpeligen Abschlußplatten und im peripheren Bereich des Nucleus pulposus immunhistochemisch nachweisbar.

Die elektronenmikroskopischen cytochemischen Untersuchungen der Zwischenwirbelscheibe der Rhesusaffen mit Hilfe der CMB – Methodik zeigen eine ungewöhnliche Anordnung von

extrazellulären Proteoglykanen. Diese stehen oft in direkter Beziehung zu Kollagenfibrillen. Die Mehrzahl der Proteoglykane liegt den Kollagenfibrillen direkt an, dies jedoch - im Gegensatz zu manchen anderen Geweben - ohne erkennbare Regelmäßigkeit. Sie können auch benachbarte Kollagenfibrillen verbinden, sowie frei in der Matrix enden. Bei diesen kollagenassoziierten Proteoglykanen handelt es sich - zumindest zum Teil - vermutlich um das Decorin. Ungewöhnlicherweise finden sich auch im Inneren der Kollagenfibrillen, speziell im Bereich des Anulus fibrosus, Glykosaminoglykane, die jedoch erheblich kleiner als die der Fibrille außen anliegenden Reaktionsprodukte sind. Die Funktion dieser intrafibrillären Proteoglykane ist bisher unbekannt, möglicherweise markieren sie Grenzen zwischen fibrillären Untereinheiten, den Protofibrillen. Außerdem lassen sich Glykosaminoglykane in kollagenfreien Räumen nachweisen. Hier sind sie zum Teil relativ groß und verzweigt. Auch die elastischen Fasern des Anulus fibrosus sind von Proteoglykanen umhüllt, deren Glykosaminoglykane vermutlich Heparansulfat entsprechen. In den Faserknorpelzellen der Innenzone des Anulus fibrosus lassen sich im Elektronenmikroskop neben relativ großen Lipideinschlüssen große Sekretgranula nachweisen, deren Inhalt aus kleinen Proteoglykanvorstufen besteht, die offensichtlich exozytotisch sezerniert werden.

4 Diskussion

Die vorliegende Untersuchung hat gezeigt, daß es hinsichtlich des histologischen Aufbaus der Zwischenwirbelscheibe von Mensch und Rhesusaffen zahlreiche Übereinstimmungen gibt, so daß in dieser Hinsicht die Makaken durchaus als Modellorganismen für den Menschen angesehen werden können. Die physischen und ethologischen Besonderheiten des Menschen, die sich im wesentlichen auf die Körpergröße, das Körpergewicht und die einseitig bipedale Fortbewegung beziehen, spiegeln sich qualitativ nicht im licht- und elektronenmikroskopischen Aufbau der Zwischenwirbelscheibe wieder. Daß die Zwischenwirbelscheibe und andere Anteile der Wirbelsäule für viele erwachsene Menschen ein Problem sein kann, kann oft damit korreliert werden, dass der moderne Mensch im allgemeinen ein sehr viel höheres Lebensalter als die Makaken erreicht und sich oft einer unnatürlichen Lebensweise befleißigt (ENGSTROM und BRATFORD, 2003).

In einer vergleichenden Studie der Wirbelkörper der Lendenwirbelsäule fanden BOSZCZYK et al. (2001), daß die Wirbelkörper des Menschen strukturelle Anpassungen an hohe axiale Belastungen zeigen, und zwar ist stets die kraniale Endfläche ungewöhnlich groß.

Auf die vielseitigen Bewegungsmöglichkeiten der Rhesusaffen wurde schon in der Einleitung hingewiesen. Auffällig ist, daß auch bei den Rhesusaffen der Rumpf sehr oft aufrecht gehalten wird.

Interessant ist, daß bei Rotgesichtsmakaken, denen ein bipedaler Gang antrainiert wurde, eine Tendenz zur Bildung einer Lendenwirbelsäulenkrümmung beobachtet wurde (PREUSCHOFT et al., 1988). Die Zwischenwirbelscheiben dieser etwas veränderten Wirbelsäulen wurden aber nicht histologisch analysiert.

Die Rückenmuskulatur der Makaken ähnelt sehr stark der des Menschen (HARTMAN und STRAUS, 1933).

Eine sorgfältige neuere histologische Analyse der Zwischenwirbelscheibe liegt innerhalb der Primaten bisher nur von *Homo sapiens* vor. Die in der vorliegenden Studie am Rhesusaffen nachgewiesenen Übereinstimmungen der histologischen Struktur der Zwischenwirbelscheibe von Makak und Mensch lassen sich am besten phylogenetisch, also aufgrund der engen biologischen Verwandtschaft, erklären. Zuzufolge eines proteinchemischen Vergleichs (BAUER und SCHREIBER, 1996) lebte der letzte gemeinsame Vorfahr von Makaken und Mensch vor ca. 31 Millionen Jahren im Oligozän.

Die wichtigsten makromolekularen Komponenten der Zwischenwirbelscheibe sind Kollagene und Proteoglykane (SCOTT, 2002). Mit Hilfe der Alcianblaufärbung wiesen TAYLOR und SCOTT (1992) nach, daß beim Menschen alle Glykosaminoglykane und Proteoglykane der Zwischenwirbelscheibe mit Hilfe der differenzierten Alcianblaufärbung dargestellt werden können. Das Alcianblau bindet an die elektrisch negativ geladenen Gruppen, z. B. Sulfat- und Hydroxylgruppen, der Glykosaminoglykane. Es zeigte sich dabei, daß vom 1. bis zum 10. Lebensjahr die Sulfatierung der Glykosaminoglykane zunimmt und danach konstant bleibt. Die größte Zunahme der Sulfatierung erfolgt nach Rückbildung der Blutgefäße (spätestens im 4. Lebensjahr). Auch im Zwischenwirbelscheibengewebe des adulten Rhesusaffen wurden wie beim erwachsenen Menschen keine Blutgefäße nachgewiesen. Vermutlich wird im Zuge der zunehmenden Sulfatierung Chondroitinsulfat zu einem erheblichen Teil durch Keratansulfat ersetzt, was letztlich durch O₂-Mangel ausgelöst wird. Die Zunahme der Sulfatierung ist nicht mit degenerativen Veränderungen, wie gelegentlich behauptet wurde, korreliert. Beim adulten Rhesusaffen konnten insbesondere im hyalinen (knorpelige Abschlußplatten) und im Faserknorpel Chondroitin-6-Sulfat sowie Dermatansulfat nachgewiesen werden. Diese Glykosaminoglykane sind ganz vorwiegend Komponenten von Proteoglykanen wie z. B. Aggrecan und Decorin (ALBERTS et al., 2002). Sie sind wie beim Menschen stets in den Knorpelhöfen in besonders hoher Konzentration nachweisbar.

Die Alcianblaufärbung war beim Affen am kräftigsten in den Knorpelanteilen, also im Faserknorpel der Innenzone des Anulus fibrosus und in den knorpeligen Abschlußplatten. Alcianblau-positive, d. h. proteoglykanreiche Strukturen finden sich aber auch in der Außenzone des Anulus fibrosus und im fließenden Übergang der Innenzone des Anulus fibrosus zum Nucleus pulposus. Der wasserreiche Nucleus pulposus blieb im untersuchten Material zumeist ungefärbt im Alcianblau-Präparat. Dies ist wahrscheinlich ein Artefakt, das dem drastischen Wasserentzug bei den Routineverfahren der histologischen Einbettung beruht. Der Nucleus pulposus dürfte eine spezielle Bindegewebsform darstellen, die nur sehr wenige Zellen und eine geringe Menge an Kollagenfibrillen enthält. Ganz überwiegend besteht er aus Glykosaminoglykanen und Wasser.

Interessant sind die regelmäßig zu findenden völlig strukturfreien Räume im Nucleus pulposus. Solche Räume können von den sehr locker strukturierten mehr peripheren Teilen des Nucleus pulposus durch eine scharfe Grenze abgetrennt sein. Die Natur der Grenze konnte nicht aufgeklärt werden, sie wird aber vermutlich durch kollagene Fasern aufgebaut. Solche strukturlosen Räume ähneln dem Binnenraum von echten Gelenken und betonen den gelenkähnlichen Charakter der Zwischenwirbelscheiben. Es ist daher vorstellbar, dass die Zwischenwirbelscheiben somit eine Zwischenstellung zwischen Synarthrosen und Diarthrosen einnehmen.

Die CMB (Cupromeronic Blue-) Färbung entspricht in ihrem Chemismus dem der Alcianblaufärbung. Aufgrund der größeren Elektronendichte ist das CMB im Elektronenmikroskop gut sichtbar (SCOTT und HAIGH, 1988).

Im Elektronenmikroskop zeigt sich eine sehr differenzierte Verteilung der CMB-positiven Strukturen, die Glykosaminoglykanen entsprechen.

Interessant ist ein Vergleich von CMB- und Alcianblaufärbung im Elektronenmikroskop. DECKER et al. (1994) untersuchten mit Hilfe des Alcianblau die Proteoglykane im Ligamentum cruciatum des Kniegelenks des Schafs. Die Proteoglykannachweise allein mit dem Alcianblau sind viel kontrastärmer und unschärfer als in Präparaten, wie den vorliegenden Zwischenwirbelscheibenschnitten, die mit CMB gefärbt werden. Dies beruht sicher auch darauf, dass bei der CMB-Färbung der Kontrast durch das Metall Wismuth in der Inkubationslösung verstärkt wird.

Auffallend und im Elektronenmikroskop deutlich sichtbar ist die enge Beziehung zwischen Kollagenfibrillen des Typ-I im Anulus fibrosus und den nadelförmigen CMB-Präcipitaten. Nach BROOKS et al. (2002) und SCOTT (2002) lagert sich das Proteoglykan Decorin typischerweise an der Oberfläche von Kollagen-Typ-I-Fibrillen an, so daß die CMB-Präcipitate, die in dieser Untersuchung an der Oberfläche der Kollagenfibrillen nachgewiesen wurden, dem Decorin entsprechen dürften. Der große Durchmesser der Kollagenfibrillen (75-120nm) spricht dafür, daß es sich bei ihnen um Kollagenfibrillen vom Typ-I handelt.

In verschiedenen anderen Geweben (ERLINGER 1995, ERLINGER et al. 1995, SCOTT 2002) ist das Decorin ganz regelmäßig entlang der Kollagenfibrille angeordnet, und zwar findet sich beim Säugetier – im transmissionselektronenmikroskopischen Präparat - ein CMB-Präcipitat (entspricht im Prinzip einem Decorinmolekül) pro D-Periode. Bei einigen Wirbellosen (Echinodermen) finden sich dagegen zwei Decorin-Moleküle pro D-Periode. Zuzufolge der genannten Autoren und SCOTT (1996) verbindet das Decorin benachbarte Kollagenfibrillen und hat eine wichtige Funktion bei der Ausrichtung der Fibrillen während des Wachstums. Weiterhin erhält es die Fibrillen in ihrer Lage und verhindert vermutlich auch ihre Verschmelzung. In der Zwischenwirbelscheibe dürfte dem Decorin eine vergleichbare Rolle zukommen. Auffallend ist aber, daß in der Zwischenwirbelscheibe das Decorin nicht

regelmäßig an den Fibrillen befestigt ist, sondern in allen möglichen Anordnungen zu finden ist, es kann z. B. parallel zur Längsachse der Fibrille oder auch zirkulär zu ihr angeordnet sein. Es finden sich daneben aber auch viele CMB-Präzipitate (entsprechen dem Decorin), die benachbarte Fibrillen verbinden. Weiterhin ist der Belag der Kollagenfibrillen mit CMB-Präzipitaten in der Zwischenwirbelscheibe sehr viel dichter als in anderen bisher untersuchten Geweben. Dies könnte eine ungewöhnlich enge Bindung zwischen benachbarten Fibrillen bedeuten. Es könnte aber auch bedeuten, daß noch andere Proteoglykane als das Decorin an der Oberfläche der Kollagenfibrillen vorkommen.

Lichtmikroskopisch gelingt der immunhistochemische Nachweis des Decorins in unmittelbarer Nähe zum Typ-I-Kollagen im gesamten Anulus fibrosus in kräftiger Intensität. In den knorpeligen Abschlußplatten fällt die Färbung dagegen sehr viel schwächer aus und ist hier im wesentlichen auf eine schmale Zone im Hof der hyalinen Knorpelzellen beschränkt. Im Nucleus pulposus treten einzelne deutlich angefärbte Faserzüge auf.

Das Chondroitin-6-Sulfat ist als Teil des Aggrecans (BROOKS et al., 2002) im Lichtmikroskop immunhistochemisch nachweisbar. Es kommt sowohl im Faserknorpel der Innenzone des Anulus fibrosus als auch im hyalinen Knorpel der Abschlußplatten vor.

Ein besonders kräftiger Nachweis gelingt – wie im Knorpelgewebe anderer Organe (ERLINGER, 1995) - in den Höfen der Knorpelzellen des Faserknorpels und des hyalinen Knorpels, eine schwach positive Reaktion findet sich in der Außenzone des Anulus fibrosus.

Im Bereich des Faserknorpels finden sich um die Knorpelzellen auffallende proteoglykanreiche Höfe, in denen kaum typische Kollagenfibrillen vorkommen. In diesen Höfen wurde in Untersuchungen anderer faserknorpeliger Strukturen wie z. B. dem Ligamentum transversum des Acetabulums des Hüftgelenkes (MILZ et al., 2001), der Trochlea des M. obliqu. sup., (KUMAI, 2002) neben Kollagen-Typ-II auch Kollagen von

Typ-III und Typ-VI nachgewiesen, und BOOS et al. (1997) fanden im Faserknorpel der Zwischenwirbelscheibe älterer Menschen hier auch Typ-X-Kollagen. In der vorliegenden Studie wurden keine immunhistochemischen Kollagennachweise geführt. Aus Gründen der evolutionären Homologie dürften sie hier aber auch beim Rhesusaffen vorkommen. In den Höfen der Faserknorpelzellen der Bandscheibe des Makaken kommt mit Hilfe der CMB-Nachweise ein hochdifferenziertes Proteoglykan- bzw. Glykosaminoglykanverteilungsmuster zum Vorschein.

Dieses Muster ist in seiner speziellen Bedeutung bisher nicht exakt analysiert, was späteren Untersuchungen vorbehalten bleiben muß. Ein überwiegender Teil der CMB-Präcipitate entspricht dem im Knorpel ubiquitären Aggrecan (ERLINGER, 1995, KUMAI, 2002). ERLINGER (1995) fand im Bronchialknorpel perizellulär größere CMB-Präcipitate, die Chondroitin- und Dermatansulfat-haltigen Proteoglykanen entsprechen. Unmittelbar an der Zelloberfläche findet sich möglicherweise (ähnlich wie bei Fibroblasten) das Proteoglykan Syndecan-1 (BROOKS et al., 2002). Die Bedeutung der beschriebenen periodischen bandartigen CMB-Präcipitate bleibt noch gänzlich unbekannt.

Interessant ist der Nachweis elastischer Fasern in der Außen- und Innenzone des Anulus fibrosus der Zwischenwirbelscheiben des Rhesusaffen. Diese sind von einer dicken Schicht kleiner CMB-Präcipitate umhüllt, die – in Analogie zum Lungengewebe (ERLINGER, 1995) - Heparansulfat darstellen könnten.

Eine Besonderheit vieler Kollagenfibrillen vom Typ-I ist in der Zwischenwirbelscheibe des Rhesusaffen offenbar das Vorkommen intrafibrillärer kleiner CMB-Präcipitate. Intrafibrilläre Glykosaminoglykane wurden vereinzelt bei Säugetieren und Haarsternen (Echinodermen) beschrieben (SCOTT, 1990, ERLINGER et al., 1993). In den Kollagenfibrillen der Haarsterne wurde vermutet, daß sie eine Rolle spielen könnten beim Zusammenhalt von ca. 10 nm dicken Untereinheiten der Fibrillen, sogenannter Protofibrillen (= Subfibrillen). Solche

Untereinheiten waren in Kollagenfibrillen der Ratte zuerst von SCOTT (1990) beschrieben worden. Es wurde vermutet, daß ihnen beim Wachstum der Fibrille eine Rolle zukommt. Ihre Funktion ist aber im wesentlichen ungeklärt. Die Tatsache, dass Kollagenfibrillen, wie sie mit ihrer typischen D-Periode im Elektronenmikroskop erkennbar sind, aus Protofibrillen bestehen, wurde mit verschiedenen elektronenmikroskopischen Methoden nachgewiesen (RUGGERI et al. 1979). Die Protofibrillen messen ca. 10 nm im Durchmesser und können geradlinig oder helicoidal angeordnet sein. In Sehnen von Ratten beobachtete SCOTT (1990), dass die intrafibrillären Proteoglykane in verschiedener Richtung angeordnet sein können. Ob dies auch in den Kollagenfibrillen der Zwischenwirbelscheibe der Fall ist, ist noch detaillierter zu untersuchen. Die vorliegenden diesbezüglichen Befunde lassen aber vermuten, dass sie hier parallel zur Längsachse der Fibrillen vorkommen. Sie sind relativ klein und sind offensichtlich auf eine bestimmte Zone der D-Periode beschränkt (Abb. 44), was so bisher nicht beschrieben wurde. Die Bedeutung dieser intrafibrillären Proteoglykane bleibt noch unklar.

Auffallend ist, dass einerseits in der Zwischenwirbelscheibe des Rhesusaffen – und anderer Säugetiere – auf engem Raum sehr unterschiedliche Binde- bzw. Stützgewebe vorkommen, dass aber andererseits breite Übergangszonen zwischen den jeweils typisch ausgeprägten Gewebetypen auftreten. Weitere Untersuchungen sollen klären, wie weit eine noch differenziertere Analyse auf dem Gebiet der Proteoglykane, die Unterschiede der verschiedenen Regionen auf eine breitere Grundlage stellen kann, womit vermutlich auch das funktionelle Verständnis vertieft würde. Weiterhin erhebt sich natürlich die Frage nach der genetischen Regulation der Unterschiede und auch der breiten Übergänge. Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass in den nicht verkalkten Arealen des hyalinen Knorpels offensichtlich verbreitet Kollagenfibrillen vom Typ I (Fibrillendurchmesser zwischen 70 und 80 nm) vorkommen, wodurch der scharfe Unterschied zwischen dem Faserknorpel und dem

Deckplattenknorpel verwischt wird. Möglicherweise erlangt der hyaline Knorpel durch die vielen Typ-I-Kollagenfibrillen eine besonders robuste Struktur. Im hyalinen Bronchialknorpel kommen keine Typ I Kollagenfibrillen vor (ERLINGER, 1995).

Schwer einzuordnen sind die Befunde zum Lektinbindungsmuster in der Zwischenwirbelscheibe des Rhesusaffen. Die Lektinbindungsstellen sind Zucker oder Aminozucker (BROOKS et al., 2002) und lassen sich schon früh in der Embryonalentwicklung der Zwischenwirbelscheibe nachweisen (GÖTZ et al., 1991). Die Lektinbindungsstellen sind vermutlich zum großen Teil Komponenten von Proteoglykanen oder auch Glykoproteinen. Dafür spricht z. B. ihr kräftiger Nachweis in den Knorpelhöfen. In der Zwischenwirbelscheibe des Rhesusaffen kommen besonders zahlreiche Bindungsstellen für LCA und WGA im Säulen-/Blasenknorpel der knorpeligen Abschlußplatte und in der Übergangszone dieser Platte zum Nucleus pulposus vor. Die spezifische funktionelle Bedeutung bleibt hier unklar, ob eine Korrelation zum Kollagen Typ-X besteht, das bei Kindern stark vermehrt in der Säulen-/Blasenknorpelzone (und auch im Nucleus pulposus) vorkommt (BOOS et al., 1997), ist ganz ungewiß.

Sehr schwer einzuordnen sind auch viele Einzelheiten der Struktur des Nucleus pulposus.

Noch gänzlich unbekannt sind die mit Hilfe der Azanfärbung rot anfärbbaren stark abgeflachten Strukturen. Sie erscheinen nur im Nucleus pulposus und treten immer einzelnstehend auf. Auch eine besondere Lokalisationsspezifität dieser Strukturen ist nicht zu erkennen, sie sind im Nucleus pulposus-Gewebe locker verteilt, wobei auch größere ansonsten zellfreie Räume des Nucleus pulposus von ihnen frei bleiben. Möglicherweise sind es zum Teil Zelltrümmer absterbender Blasenknorpelzellen.

Obwohl die Makaken dieser Studie artgerecht gehalten wurden, zeigen sie Unterbrechungen in der Knorpelschicht der Abschlußplatte, die jenen des unter degenerativen Wirbelsäulen-

erkrankungen leidenden Menschen ähneln. Diese degenerativen Erkrankungen können beim Menschen zu schmerzhaften Syndromen und frühzeitigem Ausscheiden aus dem Berufsleben führen (KRÄMER, 1993). Langjährige Rehabilitationsmaßnahmen sind die Folge.

Da solche Veränderungen bei den untersuchten Tieren in allen Etagen der Wirbelsäule regelmäßig gefunden wurden, ist zu vermuten, daß es sich beim Rhesusaffen nicht um pathologische Veränderungen sondern um normale Altersveränderungen handelt. Möglicherweise haben die Blutgefäße, die hier direkt in Kontakt mit den knorpeligen Abschlußplatten kommen, sogar ernährende Funktion.

Eine weitere Frage wird durch die Ergebnisse, die mit Hilfe der PCNA- und die Ki-67-Antikörper-Methode gewonnen wurden, aufgeworfen.

Diese Methoden dienen dem Nachweis proliferierender Zellen. In der Zwischenwirbelscheibe der in dieser Arbeit untersuchten Makaken zeigt sich eine erstaunlich geringe Proliferationsrate. Bei adulten Makaken scheint der zelluläre Turnover so gering zu sein, daß eine Rehabilitation von Degenerationszonen in der Zwischenwirbelscheibe langwierig und erschwert zu sein scheint. Zusätzlich gilt es zu bedenken, daß bei adulten Makaken, genauso wie beim adulten Menschen (TAYLOR et al., 1992) keine Vaskularisierung der Zwischenwirbelscheibe vorliegt. Dem Menschen und dem Makaken ist also die Neigung zu Veränderungen der knorpeligen Abschlußplatten in der Zwischenwirbelscheibe gemeinsam, wobei noch zu untersuchen wäre, welche Rolle in gewisser Weise statische Fehlbelastungen beim Menschen spielen. Auch unter diesem Aspekt könnte der Rhesusaffe bei der Entwicklung orthopädischer Rehabilitationsmaßnahmen für degenerative Wirbelsäulenerkrankungen als Modellorganismus dienen.

5 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1a: Schemazeichnung der Zwischenwirbelscheibe von <i>Macaca mulatta</i>	26
Abb. 1b: Schematische Darstellung der wesentlichen Bereiche der Zwischenwirbelscheibe von <i>Macaca mulatta</i>	27
Abb. 2: knorpelige Abschlußplatte mit gut ausgebildeter Säulen-Blasenknorpelschicht (BWS), M-Tr., x 440.....	28
Abb. 3: knorpelige Abschlußplatte (BWS) mit Unterbrechungen (*) in der peripheren Knochen- und Blasenknorpelschicht, M-Tr., x 125.....	29
Abb. 4: knorpelige Abschlußplatte, BWS, Übersicht, M-Tr., x 220.....	31
Abb. 5: Querschnitt durch die Zwischenwirbelscheibe, BWS, Anulus fibrosus, rechts Außen-, links Innenzone, M-Tr, x 110.....	32
Abb. 6: BWS, Randzone des Nucleus pulposus, (→): Knorpelzellen, Azan, x 220.....	33
Abb. 7: Zwischenwirbelscheibe, HWS, Übersicht; die Zwischenwirbelscheibe ist einseitig belastet (links im Bild), wodurch der Anulus fibrosus unilateral komprimiert wird. Masson-Trichrom, x 12.....	36
Abb. 8: Zwischenwirbelscheibe, HWS, knorpelige Abschlußplatte (Säulenknorpel) und Übergang zur knöchernen Endplatte, Masson-Trichrom, x 250.	37
Abb. 9: Proteoglykannachweis in der Zwischenwirbelscheibe, HWS. Unten: knorpelige Abschlußplatte und oben: Übergang zur Innenzone des Anulus fibrosus, Alzianblau (pH 2,5) und Kernechtrot, die territoriale Matrix hat den höchsten Gehalt an Proteoglykanen; x 250.	38
Abb. 10: BWS, Osteone in der knöchernen Endfläche, Flachschnitt, M-Tr., x 110.....	39
Abb. 11: Abschlußplatte am Rande des Wirbelkörpers (BWS); unten: knöcherne Endfläche, oben knorpelige Abschlußplatte. Die Zone mit Säulen- und Blasenknorpel ist vielfach unterbrochen, M-Tr., x 110.	40
Abb. 12: Übergang vom hyalinen Knorpel der Abschlußplatte (oben) zum Faserknorpel der Innenzone des Anulus fibrosus (unten), (BWS), M-Tr., x 440.....	41

- Abb. 13:** Faserknorpel in der Innenzone (links im Bild) des Anulus fibrosus. Rechts: Außenzone des Anulus fibrosus mit straffen Bindegewebslamellen, BWS, M-Tr., x 220. 42
- Abb. 14:** Säulenknorpel und nicht verkalkter hyaliner Knorpel in der knorpeligen Abschlußplatte eines Brustwirbelkörpers (oben). Aufgrund des Reichtums an Proteoglykanen färbt sich der Knorpel mit Alzianblau generell deutlich blau an. AB pH 2,5, x 440. 43
- Abb. 15:** Nachweis von Proteoglykanen im Faserknorpel des Anulus fibrosus einer Zwischenwirbelscheibe der Brustwirbelsäule (→: Knorpelzellen mit Hof), AB pH 2,5, x 220. 44
- Abb. 16:** Verteilung von Proteoglykanen und Glycosaminoglykanen im Nucleus pulposus im Bereich der Brustwirbelsäule, rechts oben: Innenzone des Anulus fibrosus, AB pH 2,5, x 110. 45
- Abb. 17:** Knorpelige Abschlußplatte (oben) eines Brustwirbelkörpers, Verteilung von LCA - Bindungsstellen. Unten: Nucleus pulposus, (→: Knorpelzellen im Nucleus pulposus), LCA, x 110. 46
- Abb. 18:** WGA – Bindungsstellen in der knorpeligen Abschlußplatte, BWS, WGA, x 110, 1) Nucleus pulposus, 2) dichte Randzone des Nucleus pulposus, 3) hyaliner Knorpel, 4) artefizieller Spalt, 5) Zone des Säulen-Blasenknorpels. 47
- Abb. 19:** WGA – Bindungsstellen im Faserknorpel (unten) und Nucleus pulposus (oben) einer Zwischenwirbelscheibe der Brustwirbelsäule, WGA, x 110. 48
- Abb. 20:** MPA – Bindungsstellen (Galactose - Nachweis) in der Abschlußplatte eines Brustwirbelkörpers. Oben: nicht verkalkter hyaliner Knorpel, unten: kräftig gefärbtes Band des verkalkten Säulen-Blasenknorpels (*), MPA, x 220. 49
- Abb. 21:** MPA – Bindungsstellen in der Innenzone des Anulus fibrosus einer Zwischenwirbelscheibe der Brustwirbelsäule, (→: Knorpelzellen), MPA, x 220. 50
- Abb. 22:** Ausschnitt aus dem Nucleus pulposus der LWS, (→: Knorpelzellen), Azan, x 220. 52

- Abb. 23:** Mittlerer Bereich des Anulus fibrosus mit Knorpelzellen einer Zwischenwirbelscheibe der LWS, die Schichten aus Kollagenfasern sind hier noch gut gegeneinander abgrenzbar, Azan, x 220. 53
- Abb. 24:** Proteoglykannachweis im Anulus fibrosus innen, mit vielen Knorpelzellen, BWS, AB pH 1,0, x 220..... 54
- Abb. 25:** Anulus fibrosus im Bereich der LWS, rechts: Außenzone, Mitte: Innenzone und links: Nucleus pulposus, Azan, x 22. 55
- Abb. 26:** Übergang Faserknorpel (links oben)/ hyaliner Knorpel der Abschlußplatte (unten, mit rötlich gefärbter „tide-mark“: ↑). Rechts oben Nucleus pulposus, BWS, Azan, x 110..... 56
- Abb. 27:** Übersichtsaufnahme knöcherner Endfläche (unten) und knorpelige Abschlußplatte (Mitte des Bildes), oben: Faserknorpel und Nucleus pulposus, BWS, Azan, x 44..... 57
- Abb. 28:** Decorin-Nachweis im Faserknorpel in der Brustwirbelsäule des Rhesusaffen, (→: Knorpelzellen mit Hof, N: Nucleus pulposus), x 440..... 63
- Abb. 29:** Decorin-Nachweis im Faserknorpel in der Brustwirbelsäule des Rhesusaffen, (→: Knorpelzellen mit Hof), x 440..... 64
- Abb. 30:** Chondroitin-6-Sulfat-Nachweis im Faserknorpel in der Brustwirbelsäule des Rhesusaffen, (→: Knorpelzellen mit Hof), x 440. 65
- Abb. 31:** Chondroitin-6-Sulfat-Nachweis im Faserknorpel in der Brustwirbelsäule des Rhesusaffen, (→: Knorpelzellen mit Hof), x 440. 66
- Abb. 32:** Dermatan-Sulfat-Nachweis im Faserknorpel in der Brustwirbelsäule des Rhesusaffen, (→: Knorpelzellen mit Hof), x 440. 67
- Abb. 33:** Zwischenwirbelscheibe, BWS, Faserknorpelzelle mit PCNA-positivem Kern (→), x 500. 68
- Abb. 34:** BWS, Nucleus pulposus, Proteoglykannachweis mit CMB, 0.3 M. Tangentialschnitt durch zwei Kollagenfibrillen (→), die außen von Proteoglykanen bedeckt sind. Weite Zwischenräume (*) sind mit CMB-Präcipitaten ausgefüllt. Vergrößerung: x 65550. 72

- Abb. 35:** BWS, Nucleus pulposus Außenzone, Proteoglykannachweis mit CMB, 0.3 M. Kollagenfibrillen (rote Pfeile) mit CMB-Präcipitaten dekoriert. Im Inneren der Fibrillen feine CMB-Präcipitate (blaue Pfeilköpfe). Vergrößerung: x 121716. 73
- Abb. 36:** BWS, Nucleus pulposus, Außenzone, Proteoglykannachweis mit CMB, 0.06 M. In den Kollagenfibrillen (*) sind deutlich regelmäßig angeordnete kleine CMB-Präcipitate zu erkennen (►). An der Oberfläche der Fibrillen und im Zwischenraum reich entwickelte Proteoglykane. Vergrößerung: x 65550. 74
- Abb. 37:** BWS, Nucleus pulposus, Außenzone, Proteoglykannachweis mit CMB, 0.3 M. Kollagenfibrille (Typ I) mit gut erkennbarer Periodik. Vergrößerung: x 121716. . 75
- Abb. 38:** BWS, Nucleus pulposus, Proteoglykan- und Glycosaminoglykannachweis mit CMB, 0.3 M. Region mit nur wenigen Kollagenfibrillen (rote Pfeile) und großen CMB-Präcipitaten (grüne Pfeile) in der amorphen Matrix. Vergrößerung: x 89700. 76
- Abb. 39:** BWS, Nucleus pulposus, Proteoglykan- bzw. Glycosaminoglykannachweis mit CMB, 0.6 M. Region mit nur wenigen Kollagenfibrillen (rote Pfeile) und sehr großen CMB-Präcipitaten (grüne Pfeile) in der amorphen Matrix. Vergrößerung: x 27167. 77
- Abb. 40:** BWS, Nucleus pulposus, Außenzone, Proteoglykannachweis mit CMB, 0.3 M. Eine elastische Faser (*), die außen dicht mit kleinen CMB-Präcipitaten bedeckt ist. (→: quergetroffene Kollagenfibrillen). Vergrößerung: x 66654. 78
- Abb. 41:** BWS, Nucleus pulposus, Außenzone, Proteoglykannachweis mit CMB 0.3 M. Knorpelzelle, die große Lipidtropfen (*) enthält und von einem klar begrenzten Hof umgeben ist. Vergrößerung: x 6785. 79
- Abb. 42:** BWS, Nucleus pulposus, Außenzone, Proteoglykannachweis mit CMB, 0.3 M. Knorpelzelle (N: Zellkern) mit Lipidtropfen (*) und großem Hof, der u. a. eigentümlich bandförmig organisiertes Material (→) enthält. Vergrößerung: x 6785. 80

- Abb. 43:** BWS, Nucleus pulposus, Außenzone, Proteoglykannachweis mit CMB 0.6 M. Knorpelzelle (N: Kern, C: Zytoplasma, L: Lipideinschluß), deren Oberfläche dicht mit CMB-Präcipitaten besetzt ist. Die Proteoglykane der Innenzone (i) des Hofes sind lockerer angeordnet als in der Außenzone (A). Im Kern reagieren hier die negativ geladenen Kernsäuren. Vergrößerung: x 36609..... 81
- Abb. 44:** BWS, Anulus fibrosus, Innenzone, Proteoglykannachweis mit CMB 0.6 M. Kollagenfibrillen, die außen dicht mit CMB-Präcipitaten umhüllt sind (→) und feine intrafibrilläre CMB-Präcipitate enthalten (▲).Vergrößerung: x 90293. 82
- Abb. 45:** BWS, Anulus fibrosus, Außenzone, Proteoglykannachweis mit CMB 0.3 M. Dichtgepackte Kollagenfibrillen, die außen mit CMB-Präcipitaten bedeckt sind. Vergrößerung: x 50000. 83
- Abb. 46:** BWS, Anulus fibrosus, Innenzone, Proteoglykannachweis mit CMB 0.3 M. Knorpelzelle (N: Zellkern) im Faserknorpel. Beachte die Sekretionsgranula mit CMB-Präzipitaten (→). Hof innen (i) lockerer als außen (A). Vergrößerung: x 27167..... 84
- Abb. 47:** BWS, Anulus fibrosus, Außenzone, Proteoglykannachweis mit CMB 0.3 M. Außenzone des Hofes einer Knorpelzelle; auffällig ist die Zusammenlagerung kleiner CMB-Präzipitate zu streifenförmigen Strukturen (→). Vergrößerung: x 36600..... 85
- Abb. 48:** BWS, knorpelige Abschlussplatte, Proteoglykannachweis mit CMB, 0.3 M; Knorpelzelle (K) mit Lipideinschlüssen (*). Schmalere Hof (H) mit zahlreichen Proteoglykanen. Beachte, dass in der interterritorialen Matrix, relativ viele Kollagenfibrillen auftreten (→), die den Kollagenfibrillen vom Typ I entsprechen. Vergrößerung: x 12006. 86

6 Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Verwendete Lektine und ihre Zuckerspezifität (nach BROOKS et al. 2002).....	19
Tab. 2:	Färbeergebnisse der Zwischenwirbelscheibe	58
Tab. 3:	Lichtmikroskopische Messung der Dicke der gesamten knorpeligen Abschlußplatte in der Halswirbelsäule.....	60
Tab. 4:	Lichtmikroskopische Messung der Dicke der Zone des Säulen-Blasenknorpels in der Halswirbelsäule.....	60
Tab. 5:	Lichtmikroskopische Messung der Dicke der gesamten knorpeligen Abschlußplatte in der Brustwirbelsäule.	61
Tab. 6:	Lichtmikroskopische Messung der Dicke der Zone des Säulen-Blasenknorpels in der Brustwirbelsäule.....	61
Tab. 7:	Lichtmikroskopische Messung der Dicke der gesamten knorpeligen Abschlußplatte in der Lendenwirbelsäule.....	61
Tab. 8:	Lichtmikroskopische Messung der Dicke der Zone des Säulen-Blasenknorpels in der Lendenwirbelsäule.	62

7 Abkürzungsverzeichnis

AB	Alzian Blau Färbung
LCA	Lens Culinaris Agglutinin
M-Tr	Masson – Trichromfärbung
HWS	Halswirbelsäule
BWS	Brustwirbelsäule
LWS	Lendenwirbelsäule
WGA	Wheat Germ Agglutinin
MPA	Maclura Pomifera Agglutinin
PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen
CMB	Cupromeronic blue

8 Literaturverzeichnis

ALBERTS, B., JOHNSON, A., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K., WALTER, P., (2002):

Molecular Biology of The Cell.
Fourth Edition, Garland Science, New York

BAUER, K., SCHREIBER, A. (1996):

Primate Phylogeny from a Human Perspective.
Gustav Fischer, Stuttgart

BOOS, N., NERLICH, A. G., WIEST, J., von der MARK, K., AEBI, M. (1997):

Immunolocalization of type X collagen in human lumbar intervertebral discs during ageing and degeneration.

Histochem Cell Biol, 108 (6): 471- 480

BOSZCZYK, B. M., BOSZCZYK, A. A., PUTZ, R., BÜTTNER, A., BENJAMIN, M., MILZ, S. (2001):

An Immunohistochemical study of the Dorsal Capsule of the Lumbar and Thoracic Facet Joints.

SPINE Volume 26, Number 15, pp E 338- E 343, Lippincott Williams and Wilkins, Inc.

BRACK, E. (1929):

Über die Wirbelbandscheiben.
Virchows Arch. Path. Anat. 272, S. 61- 75

BRAZIER HOWELL, A., STRAUS, W. L. (1933):

The muscular system.
In: HARTMANN, C. G., STRAUS, W. L.: The anatomy of the Rhesus Monkey, Bailliere, Tindall und Cox, London

BRETTSCHNEIDER, H. (1952):

Ein Beitrag zur normalen Anatomie der Zwischenwirbelscheibe.
Z. mikr.- anat. Forsch. 58, S. 381- 403

BRONEK, M., BOSZCZYK, A. A., BOSZCZYK, B. M., PUTZ, R. (2001):

Comparative and Functional Anatomy of the Mammalian Lumbar Spine.
The Anatomical Record, 264: 157- 168

BROOKS, S. A., DWEK, M. V., SCHUMACHER, U. (2002):

Functional and Molecular Glycobiology.

BIOS, Oxford

COVENTRY, M. B., GHORMLEY, R. K., KERNOHAN, J. W. (1945a):

The intervertebral disc: Ist microscopic anatomy and pathology. Part I. Anatomy, developement and physiology.

J. Bone Jt. Surg. 27B, S. 105- 112

DAVIDSON, E. A., WOODHALL, B. (1959):

Biochemical alterations in herniated intervertebral discs.

J. biol. Chem. 234, S. 2951- 2954

DECKER, B., BOSCH, U., GÄSSLER, N., TUGTEKIN, I., KASPERCZYK, W., REALE, E. (1994):

Histochemical Aspects of the Proteoglycans of Patellar Tendon Autografts Used to Replace the Posterior Cruciate ligament.

Matrix Biol Vol. 14, pp. 101- 111

DENCKHAHN, D., HUNZIKER, E. (2002):

Knorpelgewebe.

In: Benninghoff, Drenckhahn. Anatomie Band I, 16. Auflage. Urban- und Fischer-Verlag

DICKSON, I. R., HAPPEY, F., PEARSON, C. H., NAYLOR, A., TURNER, R. L. (1967):

Variation in the protein components of human intervertebral disk with age.

Nature (Lond.) 215, S. 52- 53

ENGSTROM, J. W., BRADFORD, D. S. (2003):

Back and Neck Pain.

In: Harrison's Principles of Internal Medicine. Editors: Fauci, A. S. et al., 15th Edition.

Mc Graw-Hill, New York

ERLINGER, R., (1995):

Glycosaminoglycans in porcine lung: an ultrastructural study using Cupromeronic Blue.

Cell Tissue Res 281: 473-483

ERLINGER, R., WELSCH, U., SCOTT, J. E. (1993):

Ultrastructural and biochemical observations on proteoglycans and Collagen in the mutable connective tissue of the father star *Antedon bifida* (Echinoderma, Crioidea).

J. Anat. 183, pp. 1-11

ERLINGER, R., WILLERSHAUSEN-ZÖNNCHEN, B., WELSCH, U. (1995):
Ultrastructural lokalisation of glycosaminoglycans in human gingival connective tissue using Cupromeronic blue.
J. Periodont Res, 30: 108- 115

FICK, R. (1904):
Anatomie und Mechanik der Gelenke.
In: BARDELEBENS Handbuch der Anatomie des Menschen.
Jena: Gustav Fischer, Bd. I/ 1904, Bd. II/ 1911

FRANCESCHINI, M. (1948):
Sull'architettura collagene dei dischi intervertebrali.
Atti Acad. Sci. med. Ferr. 26, S. 1- 5

FRANCESCHINI, M. (1957):
L'architettura collagene delle fibrocartilagini (dischi) intervertebrali nelle stazioniretta ed orrizzontale. Ricerche nell'Uomo e nel cane.
Quad. Anat. Prat. 12, S. 336- 349

GALANTE, J. O. (1967):
Tensile properties of the human lumbar annulus fibrosus.
Acta orthop. scand. Suppl. 100, S. 1- 91

GÖTZ, W., KASPER, M., MIOSGE, N., HUGHES, R. C. (1997):
Detection and distribution of the carbohydrate binding protein galectin-3 in human notochord, intervertebral disc and chordoma.
Differentiation, 62: 149- 157

HALLEN, A. (1958):
Hexosamine and estersulphate content of the human nucleus pulposus at different ages.
Acta chem. Scand. 12, S. 1869- 1872

HALLEN, A. (1962):
The collagen and ground substance of human intervertebral disc at different ages.
Acta chem. Scand. 16, S. 705- 710

HEVELKE, G., HELVEKE H. (1960):
Die chemischen Altersveränderungen der menschlichen Zwischenwirbelscheiben.
Z. Alternsforsch. 14. S. 271- 282

JUNGHANNS, H. (1951):
Die funktionelle Pathologie der Zwischenwirbelscheibe als Grundlage für klinische Betrachtungen.
Langenbecks Arch. Klin. Chir. 267, 393- 417

KEYES, D. C., COMPERE, E. L. (1932):

The normal and pathological physiology of the nucleus pulposus of the intervertebral disc.
J. Bone Jt. Surg. 14, S. 879- 935

KIELTY, C. M., HOPKINSON, I., GRANT, M. E. (1993):

Collagen. The collagen family: structure, assembly, and organization in the extracellular matrix.

In: Royce PM, Steinmann BU (eds) Connective tissue and its heritable disorders: molecular, genetic and medical aspects. Wiley-Liss, New York, pp 103- 147

KNEESE, K.- H. (1979):

Stützgewebe und Skelettsystem.

In: Möllendorf, vom W., W. Bargmann (Hrsg.): Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen. II. 5. Springer- Verlag, Berlin, 117- 224

KRÄMER, J. (1993):

Orthopädie. Degenerative Wirbelsäulenerkrankungen.

Springer-Verlag, dritte Auflage, Berlin, S. 233- 235

KUMAI, T., TAKAKURA, Y., RUFAL, A., MILZ, S., BENJAMIN, M. (2002):

The functional anatomy of the human anterior talofibular ligament in relation to ankle sprains.
J. Anat. 200, pp 457- 465

MEACHIM, G., CORNAH, M. S. (1970):

Fine structure of juvenile human nucleus pulposus.

J. Anat. (Lond.) 107. S. 337- 350

MILZ, S., VALASSIS, G., BÜTTNER, A., MAIER, M., PUTZ, R., JAMES, R., BENJAMIN, R. (2001):

Fibrocartilage in the transverse ligament of the human acetabulum.

J. Anat. 198, pp 223- 228

MILZ, S., REGNER, F., PUTZ, R., BENJAMIN, M. (2002):

Expression of a Wide Range of Extracellular Matrix Molecules in the Tendon and Trochlea of the Human Superior Oblique Muscle.

Investigative Ophthalmology and Visual Science, Vol. 43, No. 5

MITCHEL, P. E., HENDRY, N. G., BILLEWICZ, W. Z. (1961):

The chemical background of intervertebral disc prolapse.

J. Bone Jt. Surg. 43 B, S. 141- 151

NAYLOR, A. (1962):

The biophysical and biochemical aspects of intervertebral disc herniation and degeneration.

Ann. R. Coll. Surg. 31, S. 91- 114

NOWAK, R. M. (1991):

Walker's Mammals of the World.

5. Auflage, Band I, The Johns Hopkins University Press, Baltimore and London

PEACOCK, A. (1952):

Observations on the postnatal structure of the intervertebral disc in man.

J. Anat. (Lond.) 86, S. 162- 179

PÜSCHEL, J. (1930):

Der Wassergehalt normaler und degenerierter Zwischenwirbelscheiben.

Beitr. Path. Anat. 84, S. 123- 130

PREUSCHOFT, H., HAYAMAS, S., GUENTHER, M. M. (1988):

Curvature of the lumbar spine as a consequence of mechanical necessities in Japanese macaques trained for bipedalism.

Primatol 50: 42- 58

PSCHYREMBEL, W. (1990):

Klinisches Wörterbuch.

de Gruyter-Verlag, Berlin, New York, S. 1087- 1088

PUTZ, R., MÜLLER-GERBL, M. (2002):

Wirbelsäule.

In: Anatomie, Band I, herausgegeben von Benninghoff und Drenckhahn D., 16. Auflage, Urban und Fischer-Verlag, München, Jena

ROMEIS, B. (1989):

Mikroskopische Technik.

16 edn. Urban und Schwarzenberg, Munich, Vienna

RÖSSLER, H., RÜTHER, W. (2000):

Orthopädie. Degenerative Veränderungen der Wirbelsäule.

Urban und Fischer, München-Jena, S. 354- 356

RUGGERI, A., BERMAZO, F., REALE, E. (1979):

Collagen fibrils with straight and helicoidal microfibrils: a freeze fracture and hemisection study.

J. Ultrastruct. Res. 68, 101-108.

SCHAFFER, J. (1930):

Die Stützgewebe.

In: Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen.

(hrsg. Von W. von Möllendorff) Bd. 2, Teil 2, S. 1- 390. Berlin: Julius Springer

SCHÜMMELFELDER, W., SCHÜMMELFELDER, N. (1949):

Wasserhaushalt der Zwischenwirbelscheiben.

Chir. 20, S. 395- 397

SCOTT, J. E. (1990):

Proteoglycan: collagen interactions and subfibrillar structure in collagen fibrils. Implications in the development and ageing connective tissues.

Journal of Anatomy 169, 23- 35

SCOTT, J. E. (1992):

Morphometry of Cupromeronic blue- stained proteoglycan molecules in animal corneas, versus that of purified proteoglycans stained in vitro, implies that tertiary structures contribute to corneal ultrastructure.

J. Anat. 180: 155- 164

SCOTT, J. E. (1996):

Proteodermatan and proteokeratan sulfate (decorin, lumican/ fibromodulin) proteins are horseshoe shaped. Implications for their interactions with collagen.

Biochemistry. 35 (27): 8795-9

SCOTT, J. E. (1996):

Alcian blue. Now you see it, now you don't.

Eur- J- Oral- Sci. 104 (1): 2- 9

SCOTT, J. E. (2002):

The first and second 'laws' of chemical morphology, exemplified in mammalian extracellular matrices.

Eur. J. Histochem. 46: 111- 124.

SCOTT, J. E., HAIGH (1988):

Identification of specific binding sites of keratan sulfate and chondroitin/ dermatan sulphate proteoglycans on collagen fibrils in cornea, using Cupromeronic blue in critical electrolyte concentration technics.

Biochem. J. 253, 607- 610

SOLHEIM, K. (1965):

The glycosaminoglycans (Mucopolysaccharides) of herniated human intervertebral disks.

Acta Univ. Lund. II, no. 1, S. 3- 6

STRASSER, H. (1913):

Lehrbuch der Muskel- und Gelenkmechanik.

Berlin 1908, Bd. II 1913

SULLIVAN, W. E. (1933):

Skeleton and Joints.

In: The anatomy of the rhesus monkey.

Herausgegeben von Hartman C. G. und Straus W. L..Bailliere, Tindall und Cox, London

TAYLOR, J. R., SCOTT, J. E., CRIBB, A. M., BOSWORTH, T. R. (1992):

Human intervertebral disc acid glycosaminoglycans.

J. Anat. 137- 141

TÖNDURY, G., TILLMANN, B. (2003):

Rumpf.

In Rauber/Kopsch, Anatomie des Menschen, Band I, Bewegungsapparat, herausgegeben von B. Tillmann und G. Töndury, Georg Thieme-Verlag. Stuttgart, New York

UEBERMUTH, H. (1929):

Über die Altersveränderungen der menschlichen Zwischenwirbelscheibe und ihre Beziehung zu den chronischen Gelenkleiden der Wirbelsäule.

Ber. D. math.- nat. Kl. sächs. Akad. Wiss. Leipzig 81, Sitzg. Vom 22. VII.

UEBERMUTH, H. (1930):

Die Bedeutung der Altersveränderungen der menschlichen Bandscheiben in der Wirbelsäule.
Langenbecks Arch. klin. Chir. 156, S. 567- 577

9 Lebenslauf

Am 04.11.1971 wurde ich als jüngstes Kind von Edith Marianne Brückner (geborene Kujawa, Rechtsanwalts- und Notariatsassistentin) und Dipl.-Ing. Roland-Joseph Brückner (verstorben am 31.10.1984) in Göttingen geboren.

Von 1978 bis 1982 besuchte ich die Grundschule in Gleichen-Diemarden, anschließend bis 1984 die Orientierungsstufe der Bert-Brecht-Schule in Göttingen. In den Jahren zwischen 1984 und 1991 besuchte ich das Felix-Klein-Gymnasium in Göttingen, welches ich mit der Allgemeinen Hochschulreife verließ.

Von 1991 bis 1992 ließ ich mich in Hannover zur Erzieherin ausbilden.

Ab dem 01.04.1992 begann ich mit dem Studium der Zahnheilkunde an der Georg-August-Universität zu Göttingen, welches ich am 30.06.1998 mit Erhalt der zahnärztlichen Approbation abschloß.

Meine zahnärztliche Assistenzzeit legte ich an der Mund-Kiefer-Gesichtschirurgischen Abteilung der Ernst Moritz Arndt Universität zu Greifswald in Ausbildung zum Fachzahnarzt für Oralchirurgie, an der Zahnklinik der Behindertenstiftung Liebenau in Liebenau (Bodensee), sowie in freier zahnärztlicher Praxis ab.

Anschließend arbeitete ich als angestellte Zahnärztin in freier zahnärztlicher Praxis in Friedrichshafen (Bodensee), und bin seit 01.02.2003 in Ravensburg in eigener zahnärztlicher Praxis niedergelassen.