

Aus dem Institut für Regenerative Therapien &
Klinik für Rheumatologie und Klinische Immunologie
und dem Institut für Arbeitsmedizin,
Charité – Universitätsmedizin Berlin
Campus Virchow Klinikum

Eingereicht über den
Fachbereich Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

**Modell zur Implantation von Implantaten
zur körpereigenen Regeneration
von Anulus fibrosus Defekten am Schaf**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Pia Katharina Sophia Ostach
Tierärztin aus Berlin

Berlin 2019
Journal-Nr.: 4099

**Aus dem Institut für Regenerative Therapien &
Klinik für Rheumatologie und Klinische Immunologie
und dem Institut für Arbeitsmedizin,
Charité – Universitätsmedizin Berlin
Campus Virchow Klinikum**

**Eingereicht über den
Fachbereich Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin**

**Modell zur Implantation von Implantaten zur körpereigenen Regeneration von Anulus
fibrosus Defekten am Schaf**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin**

**vorgelegt von
Pia Katharina Sophia Ostach
Tierärztin
aus Berlin**

Berlin 2019

Journal-Nr.: 4099

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Jürgen Zentek
Erster Gutachter: PD Dr. Christian Große-Siestrup
Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Michael Sittinger
Dritter Gutachter: Prof. Dr. Gundula Schulze-Tanzil

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

sheep, animal models, implantation, regeneration, healing, annulus fibrosus (MeSH),
intervertebral discs, cell cultures

Tag der Promotion: 22.01.2019

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <<https://dnb.de>> abrufbar.

ISBN: 978-3-86387-954-9

Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2019

Dissertation, Freie Universität Berlin

D188

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written authorization of the publisher.

Alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© Mensch und Buch Verlag 2019 Choriner Str. 85 - 10119 Berlin
verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

Meiner Oma und meinen Eltern

-

in Liebe und Dankbarkeit

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	I
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	VI
TABELLENVERZEICHNIS	VIII
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	IX
1. EINLEITUNG	1
2. ZIELSTELLUNG	4
3. GRUNDLAGEN	3
3.1. Das Schaf als Modell der experimentellen Wirbelsäulenchirurgie	3
3.2. Anatomie der Lendenwirbelsäule bei Mensch und Schaf	4
3.3. Aufbau der Bandscheibe bei Mensch und Schaf	6
3.4. Pathologie der Bandscheibe	10
3.4.1. Nicht-degenerative Bandscheibenveränderungen	11
3.4.2. Degenerative Bandscheibenveränderungen	12
3.4.2.1. Verlauf der degenerativen Bandscheibenveränderung	13
3.4.2.2. Phasen der degenerativen Bandscheibenveränderung	14
3.4.2.2.1. Dysfunktionale Phase	14
3.4.2.2.2. Phase der Instabilität und der erneuten Stabilisierung	15
3.5. Therapie der Bandscheibenerkrankungen	15
3.5.1. Therapieformen	15
3.5.2. Konservative Therapie	16
3.5.3. Operative Therapie	17
3.5.3.1. Nukleotomie	17
3.5.3.2. Fusionsoperationen	18
3.5.3.3. Dynamische Systeme	19

3.5.3.4.	Ersatz des Nucleus pulposus _____	19
3.5.3.5.	Reparatur des Anulus fibrosus _____	21
3.5.4.	Regenerative Therapieansätze _____	21
4.	MATERIAL UND METHODEN _____	24
4.1.	<i>in vitro</i> Versuche: Chemotaxisassay und 3D-Zellkulturen _____	24
4.2.	Isolation der Anulus fibrosus Zellen _____	25
4.3.	Passagieren der Zellen _____	26
4.4.	Chemotaxisassay _____	27
4.4.1.	Vorbereitung des Chemotaxisassays _____	27
4.4.2.	Ansatz des Chemotaxisassays _____	28
4.4.3.	Fixierung und Hemacolor-Färbung der adhärennten Zellen _____	28
4.5.	Ovine Anulus fibrosus 3D-Zellkulturen _____	30
4.5.1.	Vorbereitung der Zellen _____	30
4.5.2.	Anlegen der 3D-Zellkulturen _____	30
4.5.3.	PI-FDA-Färbung _____	32
4.5.4.	Histologische Untersuchung der 3D-Zellkulturen _____	34
4.5.4.1.	Aufarbeitung der Proben _____	34
4.5.5.	Histologische Färbung der 3D-Zellkulturen _____	35
4.5.6.	Alcianblau 8GS-Färbung _____	35
4.5.7.	Safranin-O-Färbung _____	36
4.6.	<i>in vivo</i> Versuch _____	38
4.6.1.	Versuchstiere _____	39
4.6.2.	Gruppeneinteilung _____	39
4.6.3.	Versuchstiergruppen _____	40
4.6.3.1.	Gruppe A: Leerdefekt _____	40
4.6.3.2.	Gruppe B: Implantat ohne Zusatz _____	40
4.6.3.3.	Gruppe C: Implantat mit partikulärem Freisetzungssystem für Arzneimittel _____	40
4.6.3.4.	Gruppe D: Implantat mit partikulärem Freisetzungssystem für Arzneimittel mit verkapseltem Faktor TECK _____	41
4.6.3.5.	Gruppe E: Implantat mit PRP- Zusatz _____	41
4.7.	Chirurgischer Eingriff _____	41
4.7.1.	Vorbereitung der Tiere und Narkoseeinleitung _____	41

4.7.2.	Narkose und Lagerung	42
4.7.3.	Vorbereitung des Operationsfeldes	43
4.8.	Operation	44
4.8.1.	Chirurgischer Zugang	44
4.8.2.	Manipulation der Bandscheibe und Entnahme des Bandscheibenmaterials (Leerdefekt)	46
4.8.3.	Defektdeckung: Einbringen und Befestigen des Implantats	46
4.8.4.	Chirurgischer Verschluss und postoperative Nachsorge	49
4.9.	Weiterer Verlauf	51
4.10.	Euthanasie der Tiere	51
4.11.	Herstellung der Präparate	52
4.11.1.	Entnahme der Wirbelsegmente	52
4.11.2.	Demineralisierung	53
4.12.	Herstellung der Bandscheibenpräparate	54
4.13.	Histologische Färbung der Bandscheibenpräparate	55
4.13.1.	Hämatoxylin/Eosin-Färbung	55
5.	ERGEBNISSE	57
5.1.	<i>in vitro</i> Versuchs	57
5.1.1.	Gewinnung der Zellen	57
5.1.2.	Chemotaxis von ovinen Anulus fibrosus Zellen	57
5.1.2.1.	Chemotaxisassay	58
5.1.2.2.	Zusammenfassung der chemokininduzierten Chemotaxis von ovinen Anulus fibrosus Zellen mit humanem Chemokin	60
5.1.3.	3D-Zellkulturen oviner Anulus fibrosus Zellen	61
5.1.3.1.	Darstellung der lebenden und toten Zellen mittels der PI/FDA Färbung	61
5.1.3.2.	Zusammenfassung der 3D-Zellkulturen oviner Anulus fibrosus Zellen	63
5.1.4.	Histologische Untersuchungen der 3D-Zellkulturen	64
5.1.4.1.	Alcianblau 8GS-Färbung und Safranin-O-Färbung	64
5.1.4.2.	Zusammenfassung der histologischen Untersuchung der 3D-Zellkulturen oviner Anulus fibrosus Zellen	66
5.2.	Ergebnisse des <i>in vivo</i> Versuchs	67

5.2.1.	Operationszeiten	67
5.2.1.1.	Dauer aller Operationen im zeitlichen Verlauf	67
5.2.1.2.	Dauer aller Operationen mit Defektdeckung im zeitlichen Verlauf	68
5.2.2.	Defektsetzung	69
5.2.3.	Defektdeckung: Einbringen und Befestigen des Implantats	69
5.2.4.	Postoperativer Verlauf	70
5.2.4.1.	Standzeiten und Gewicht der Tiere	70
5.2.5.	Explantation	71
5.2.6.	Präparation und makroskopische Beurteilung	72
5.2.7.	Histologische Auswertung der Bandscheibenpräparate	74
5.2.7.1.	Hämatoxylin/Eosin-Färbung	74
5.2.7.1.1.	Defektgröße	75
5.2.7.1.2.	Defektfüllung	76
5.2.7.1.3.	Auftreten von Herniationen	77
6.	DISKUSSION	80
6.1.	Diskussion der Methodik	80
6.1.1.	Tiermodell	80
6.1.2.	Versuchstiere	81
6.1.3.	Operation	82
6.1.3.1.	Operationszeiten	83
6.1.3.2.	Defektsetzung	83
6.1.3.3.	Defektdeckung	85
6.1.4.	Postoperativer Verlauf und Anfertigung der Präparate	86
6.2.	Diskussion der Ergebnisse	87
6.2.1.	<i>in vitro</i> Untersuchungen	87
6.2.1.1.	Chemotaxis oviner Anulus fibrosus Zellen	87
6.2.1.2.	3D-Zellkultur oviner Anulus fibrosus Zellen	88
6.2.2.	Tierversuch	89
6.2.2.1.	Makroskopische und histologische Auswertung	89
7.	ZUSAMMENFASSUNG	92
8.	SUMMARY	95
9.	LITERATURVERZEICHNIS	97

DANKSAGUNG _____ **115**

SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG _____ **116**

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der Bandscheibe	7
Abbildung 2: Fließschema über die Planung der <i>in vitro</i> Versuche	24
Abbildung 3: Permeable Polycarbonatmembran (Porendurchmesser 8 µm) des 96-Well Chemotaxisassay	29
Abbildung 4: Ablaufschema über die Planung des Tierversuchs	38
Abbildung 5: Operationssitus: Beginn des Hautschnitts	44
Abbildung 6: Operationssitus: Koagulation eines Gefäßes während der Präparation	45
Abbildung 7: Operationssitus: Assistenz hält mit Hilfe von zwei Homann-Haken den abdominalen Inhalt in Richtung Bauchraum weg	46
Abbildung 8: Operationssitus: Durchführung der Befestigung des zweiten Fadens	47
Abbildung 9: Operationssitus: "Auffädeln" des Implantats auf den dritten Faden außerhalb der Operationswunde	48
Abbildung 10: Operationssitus: Das Implantat außerhalb der Operationswunde aufgefädelt auf drei Fäden	48
Abbildung 11: Operationssitus: Implantat wird mittels einer langen anatomischen Pinzette entlang der Fäden in Richtung Bandscheibe auf den Defekt hinuntergeschoben	49
Abbildung 12: Operationswunde - Beginn der Unterhautnaht	50
Abbildung 13: Schaf in tierexperimenteller Haltung nach der Operation.	51
Abbildung 14: Bandscheibenexplantat mit Teilen des kranial und kaudal angrenzenden Wirbelkörpers.	53
Abbildung 15: Größe der Bandscheibenpräparate vor dem Einfrieren.	54
Abbildung 16 : Wirkung verschiedener Konzentrationen des Chemokins TECK auf die Migration oviner Anulus fibrosus Zellen	58
Abbildung 17: Wirkung verschiedener Konzentrationen des Chemokins TECK auf die Migration oviner Anulus fibrosus Zellen in Prozent	59
Abbildung 18: PI/FDA-Färbung der 3D-Zellkulturen	61

Abbildung 19: Alcianblau 8GS-Färbung und Safranin-O-Färbung der 3D-Zellkultur Transplantate _____	64
Abbildung 20: Darstellung der Dauer der Operationen im Verlauf der Studie _____	68
Abbildung 21: Darstellung der Dauer der Operationen mit Defektdeckung im zeitlichen Verlauf der Studie _____	69
Abbildung 22: en-bloc Entnahme der Lendenwirbelsäule der Gruppe A (Leerdefekt) nach Sektion und erster Präparation. Die Skalpellspitze zeigt auf die Defektstelle, gekennzeichnet durch das nicht resorbierbare Nahtgut. Schaf Nr. 47. _____	73
Abbildung 23: en-bloc Entnahme der Lendenwirbelsäule der Gruppe E (PRP) nach Sektion und erster Präparation. Die Skalpellspitze zeigt auf die Defektstelle, gekennzeichnet durch das nicht resorbierbare Nahtgut. Schaf Nr. 45. _____	73
Abbildung 24: Anulus fibrosus Defekt der Gruppe D (TECK). _____	74
Abbildung 25: Anulus fibrosus Defekt der Gruppe A (Leerdefekt) mit geringer Defekttiefe _	75
Abbildung 26: Anulus fibrosus Defekt der Gruppe A (Leerdefekt) mit größerer Defekttiefe _	76
Abbildung 27: Anulus fibrosus Defekt der Gruppe D (TECK). _____	77
Abbildung 28: Anulus fibrosus Defekt der Gruppe A (Leerdefekt). _____	78
Abbildung 29: Anulus fibrosus Defekt der Gruppe A (Leerdefekt) _____	79

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Anlegen verschiedener Ansätze der 3D-Zellkultur _____	31
Tabelle 2: Ablaufplan der Implantat-Kultivierung _____	32
Tabelle 3: Implantatentnahme am jeweiligen Untersuchungstag _____	32
Tabelle 4: Einteilung der Versuchstiergruppen (A-E) _____	40
Tabelle 5: erneute Darstellung der Versuchstiergruppen (A-E) _____	67
Tabelle 6: interne Versuchsnummer, Körpergewicht und Standzeit der Versuchstiere _____	71
Tabelle 7: Übersicht der Versuchstiergruppen und auswertbaren Präparaten mit	
Bemerkungen _____	72

Abkürzungsverzeichnis

° C	-	Grad Celcius
ca.	-	circa
CA-Kugeln	-	Chitosan-Aligant Kugeln
cm	-	Zentimeter
et. al.	-	und Mitarbeiter
g	-	Gramm
µg	-	Mikrogramm
<i>g</i>	-	Schleuderziffer
GmbH	-	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
h	-	Stunde
IHC	-	Immunhistochemie
Implantat	-	resorbierbares Biopolymer
i.m.	-	intramuskulär
i.v.	-	intravenös
kg	-	Kilogramm
L	-	Lendenwirbel
L4/L5	-	Lendenwirbel 4 und Lendenwirbel 5
mm	-	Millimeter
ml	-	Milliliter
nM	-	Nanomolar
PBS	-	Phosphate Buffered Saline
PRP	-	Plättchenreiches Plasma, thrombozytenreiches Plasma
Scaffold	-	resorbierbares Biopolymer
s.c.	-	subkutan
TECK	-	Chemokin CCL25 (CC-Akronym für Cystein-Cystein chemokine ligand 25), Thymus-Expressed Chemokine
WHO	-	World Health Organisation
°	-	Grad
%	-	Prozent
Vol%	-	Volumenprozent

1. Einleitung

Rückenschmerzen sind eines der bedeutendsten Gesundheitsprobleme der Bevölkerung (Andersson 1998). Studien geben eine übereinstimmend hohe Prävalenz von Rückenschmerzen in der Bevölkerung an (Andersson 1998; Schmidt CO 2007). Die Prävalenz der Teilnehmer, die am Tag der Befragung angaben an Rückenschmerzen zu leiden, lag weltweit bei verschiedenen Studien bei 12-33% (Walker 2000) und in Regionen Deutschlands bei bis zu 37,1% (Schmidt CO 2007). Diese Studien zeigten, dass bis zu 85% aller Befragten angaben, mindestens einmal in ihrem Leben an Rückenschmerzen gelitten zu haben (Andersson 1998; Walker 2000; Schmidt CO 2007; Raspe 2012).

Einen Anteil dieser Rückenschmerzen bildet der sogenannte "Low back pain" (LBP). Dieser beschreibt die Schmerzen, welche unterhalb des zwölften Rippenpaares bis zur Glutealfalte (Sulcus glutealis) auftreten, mit oder ohne Schmerzen in einer oder beiden unteren Extremitäten assoziiert sind und mindestens für einen Tag andauern (Koes et al. 2006; McIntosh und Hall 2011). Häufig lassen sich Rückenschmerzen und auch speziell der sogenannte LBP auf degenerative Veränderungen der Bandscheibe zurückführen (Luoma et al. 2000; Urban und Roberts 2003; Raspe 2012; Krämer et al. 2014). Durch die degenerative Veränderung der Bandscheibe kommt es bei Druckbelastung zur Lageveränderung von Nucleus pulposus Gewebe (Krämer et al. 2014). Sind die äußeren Schichten des Anulus fibrosus noch intakt, kommt es zur Vorwölbung (Protrusion) des Bandscheibengewebes. Reißen auch die äußeren Schichten des Anulus fibrosus, kommt es zum Prolaps, dem Austreten des Nucleus pulposus Materials (Krämer et al. 2014).

Als Folge der Herniation der Bandscheibe kann neben auftretenden Rückenschmerzen, das prolabierte Material in den Wirbelkanal eintreten und zu einer Kompression der benachbarten Nervenwurzeln führen (Guterl et al. 2013).

Die degenerative Veränderung der Bandscheibe steht dabei im engen Zusammenhang mit dem Verlust an Proteoglykanen und der dadurch verringerten Wasserbindungskapazität des Nucleus pulposus, der Dehydration und dem Verlust der Bandscheibenhöhe (Lyons et al. 1981; Urban und Roberts 2003). Dies führt zur Abnahme der Elastizität wodurch der Nucleus pulposus die entstehenden Drücke nicht mehr gleichmäßig an seine Umgebung abgeben kann und es zu einer vermehrten Belastung des Anulus fibrosus und der Facettengelenke kommt (Börm 2009). Kann der Anulus fibrosus dieser vermehrten Belastung nicht standhalten, kommt es zur Veränderung in der Organisation seiner Lamellenstruktur und zu Rissbildungen (Lyons et al. 1981; Guterl et al. 2013; Krämer et al. 2014).

Abhängig von der Dauer und der Ausprägung der Symptome wird der betroffene Patient konservativ oder operativ therapiert (Koller 2010). Ist die konservative Therapie eines

Einleitung

Bandscheibenvorfalls nicht erfolgreich, wird häufig eine der chirurgischen Therapiemethoden gewählt, um eine Besserung der Symptomatik zu erhalten (Rothoerl et al. 2002).

Die operative Versorgung von Bandscheibenvorfällen geht meist mit der Entfernung des prolabierte Gewebes und dem anschließenden Ersatz des Nucleus pulposus einher (Krämer et al. 2014). Mit über 300.000 Operationen pro Jahr in den USA, ist die lumbale Diskektomie eine der Standardmethoden zur Entfernung des prolabierte Gewebes (Atlas et al. 1996; Sharifi et al. 2015; Daly et al. 2017).

Häufig wird durch für den operativen Zugang ein weiterer Defekt in den schon geschädigten Anulus fibrosus gesetzt. Der Erfolg dieser operativen Therapiemethoden hängt maßgeblich von der funktionellen Wiederherstellung des Anulus fibrosus ab, da nur der intakte Anulus fibrosus den Druckverhältnissen innerhalb der Bandscheibe standhalten und damit eine erneute Herniation verhindert werden kann (Li und Kong 2015).

Reherniationsraten von bis zu 23% werden bei nicht ausreichend stattfindendem Verschluss des Anulus fibrosus beschrieben (Barth et al. 2008a; Barth et al. 2008b; Lebow et al. 2011).

Diese Zahl unterstreicht den Bedarf von erfolgreichen Verschlusstechniken, da die Therapie von Anulus fibrosus Defekten ein bis heute nicht gelöstes Problem darstellt. Verschiedene Naht- und Klebetechniken sind bekannt, brachten allerdings meist nur unzureichende Erfolge (Ahlgren et al. 2000; Suh et al. 2015).

Auch regenerative Ansätze rücken in den Vordergrund bei der Behandlung von Anulus fibrosus Defekten. Bekannt unter dem Begriff des Tissue Engineering nutzen diese Ansätze Zellen und Biomaterialien oder eine Kombination beider Komponenten (Stock und Vacanti 2001). Ziel ist es, die Regeneration des Gewebedefektes zu erreichen und damit die Funktion des Gewebes wiederherzustellen (Stock und Vacanti 2001). So auch das Anulus fibrosus Tissue Engineering, welches die Grundlage für die vorliegende Arbeit darstellt.

Für die vorliegende tierexperimentelle Arbeit werden *in vivo* am Schaf iatrogen gesetzte Anulus fibrosus Defekte an der Lendenwirbelsäule mit einem Implantat in Quaderform in Kombination mit verschiedenen Wirkstoffgruppen gedeckt. Einer dieser Wirkstoffe stellt ein human rekombinantes Chemokin dar. Dieses soll die Anulus fibrosus Zellen der Tiere zur Migration anregen, wodurch sie in das Implantat einwandern, Matrix ausbilden und damit den Defekt verschließen sollen. Um vorab zu untersuchen, ob ein human rekombinantes Chemokin die genannte Wirkung auf Anulus fibrosus Zellen der Gattung Schaf (*Ovis*) hat, wird vor Beginn des tierexperimentellen Teils eine *in vitro* Versuchsreihe durchgeführt.

Die vorliegende Arbeit soll dabei untersuchen, ob das beschriebene Modell geeignet ist, Implantate auf ihre Eignung zu prüfen und damit wissenschaftliche Aspekte zum Verständnis der Anulus fibrosus Defektheilung hinzuzufügen.

Einleitung

Hierzu soll die Wirkung des Chemokins auf das Migrationsverhalten der ovinen Anulus fibrosus Zellen *in vitro* im Chemotaxisassay untersucht werden. Im Anschluss soll der Einfluss des Chemokins und der Einfluss des plättchenreichen Plasmas (englisch: platelet rich plasma; PRP) auf die Proteoglykanbildung der ovinen Anulus fibrosus Zellen *in vitro* in 3D-Zellkulturen untersucht werden.

Durch die Untersuchung des *in vivo* Verhaltens der Implantate am Großtiermodell hinsichtlich des initialen Defektverschlusses, der Stabilität und Integration des Implantats, soll die Möglichkeit einer späteren klinischen Anwendung am Menschen überprüft werden.

Folgend wird eine kritische Beurteilung des Tiermodells durchgeführt.

2. Zielstellung

Die allgemeine Zielsetzung dieser Arbeit ist dem heutigen Wissensstand, Aspekte zum Verständnis der Anulus fibrosus Defektheilung hinzuzufügen. Ziel ist dabei die Bewertung des beschriebenen Modells zur Implantation von Scaffolds zur körpereigenen Regeneration von Anulus fibrosus Defekten am Schaf. Die zu verwendenden Prüfpräparate und Wirkstoffkombinationen stellen hierbei Varianten eines Beispiel-Implantats dar. Dabei soll anhand einer Leerdefekt Gruppe als Kontrollgruppe und weiteren Versuchstiergruppen gezeigt werden, dass das beschriebene Modell geeignet ist, Implantate auf ihre Eignung zu prüfen.

Es sind folgende Hypothesen zu überprüfen:

- Das Versuchstier Schaf ist ein geeignetes Tiermodell, um Implantate zur Anulus fibrosus Defektheilung auf ihre Eignung zu prüfen
- Die in diesem Modell genutzten Methoden (der chirurgische Zugang, die Defektsetzung, die Befestigung des Implantats, die Herstellung und die Auswertung der Präparate) eignen sich, um Implantate auf ihre Eignung zu prüfen
- Das humane Chemokin TECK wirkt auch auf ovine Anulus fibrosus Zellen rekrutierend und differenzierend und dies kann mit diesem Modell am Schaf geprüft werden
- Das humane Chemokin TECK als bekannter Faktor zur Rekrutierung stromaler Zellen bewirkt eine verbesserte Einheilung eines Beispiel-Implantats (Scaffolds) im ovinen Anulus fibrosus
- Der in diesem Modell gesetzte Anulus fibrosus Defekt ist geeignet, Unterschiede zwischen mit dem Implantat behandelten Versuchstiergruppen und den unbehandelten Gruppen (Leerdefekt) darzustellen

3. Grundlagen

3.1. Das Schaf als Modell der experimentellen

Wirbelsäulenchirurgie

Mit Hilfe von Tiermodellen werden nicht nur Krankheiten erforscht, sondern auch neue Therapieansätze und deren Folgen untersucht (Weiss et al. 2014).

Um eine klinische Anwendung zu ermöglichen, wird eine präklinische tierexperimentelle Versuchsreihe vorausgesetzt (Matz 2010; Andersen und Winter 2017). Die Erkenntnisse aus Tierversuchen dienen als Grundlage für die Entwicklung dieser Therapieansätze (Andersen und Winter 2017).

Die präklinische Etablierung des Therapieansatzes sollte an einem Tiermodell erfolgen, welches bestimmte Kriterien erfüllt, die dem Ziel der Forschung entsprechen und somit eine gute Übertragbarkeit der Erkenntnisse auf den Menschen mit sich bringt (Zutphen 1995; Andersen und Winter 2017). Häufig gibt es jedoch keine nachvollziehbaren Gründe für die Auswahl eines genutzten Tiermodells bei einer bestimmten Studie (Martini et al. 2001). Ist das Tiermodell ungeeignet, kommt es trotz optimaler Organisation und Ausrüstung zu irreführenden Ergebnissen (Martini et al. 2001). Die Auswahl eines geeigneten Tiermodells ist somit an bestimmte Kriterien gebunden (Martini et al. 2001).

Das Schaf wird auf Grund seines ruhigen Charakters und seines gutmütigen Verhaltens, gerne als Versuchstier genutzt (Borrie 1960). Neben den Charaktereigenschaften des Tieres ist auch, wie von Borrie (1960) beschrieben die einfache, kostengünstige und postoperative Haltung der Tiere auf der Wiese ein weiterer Vorteil.

Die vergleichbaren anatomischen, biomechanischen und auch statischen Eigenschaften der Wirbelsäule des Schafes und des Menschen begründen die häufige Nutzung des Schafes in der Wirbelsäulenforschung (Wilke et al. 1997a; Wilke et al. 1997b; Kandziora et al. 2002; Smit 2002; Mageed et al. 2013a). In der Problematik, ob die biomechanischen Gegebenheiten eines Vierfüßers auf den aufrecht gehenden Menschen übertragbar sind, zeigt sich, dass die Wirbelsäule des Vierbeiners, wie auch die humane Wirbelsäule, hauptsächlich entlang ihrer Achse belastet wird (Smit 2002). Die Untersuchungen zeigten allerdings auch, dass die Schafswirbelsäule einer höheren axialen Kompressionsspannung ausgesetzt ist, woraus eine höhere Knochendichte der Wirbelkörper resultiert (Smit 2002). Nach Smit (2002) wird die Übertragbarkeit der Ergebnisse von Versuchen an Schafswirbelkörpern auf den Menschen hierdurch begrenzt.

Die thorakale und lumbale Schafswirbelsäule zeigt in ihrer Anatomie und ihrer Biomechanik große Ähnlichkeiten mit der humanen Wirbelsäule (Wilke et al. 1997a).

Gerade die Wirbelendplattenregionen sowie der Spinalkanal der ovinen Lendenwirbelsäule zeigen viele Gemeinsamkeiten mit der des Menschen (Mageed et al. 2013b). So liegt es nahe, dass das ovine Versuchstier gerade für Untersuchungen von Bandscheibenerkrankungen ein geeignetes Modell darstellt (Mageed et al. 2013b).

Neben den genannten Gemeinsamkeiten sprechen auch die Eigenschaften der ovinen Bandscheibe für die Verwendung des Tieres in der Bandscheibenforschung. Wissenschaftliche Arbeiten zeigten, dass neben der Form, auch der Wassergehalt, der Kollagengehalt und der Orientierungswinkel der Kollagenfasern der Bandscheibe von Schaf und Mensch ähnlich sind (Costi et al. 2002; Reid et al. 2002; Schmidt und Reitmaier 2013).

Abschließend resultiert daraus, dass ovine Bandscheiben als Modell genutzt werden können (Costi et al. 2002; Reid et al. 2002; Schmidt und Reitmaier 2013). Aufgrund dieser Erkenntnisse wird das Schaf auch in der experimentellen Bandscheibenforschung häufig als Modell genutzt (Ahlgren et al. 2000; Reid et al. 2002; Schmidt und Reitmaier 2013; Hegewald et al. 2015). Das Schaf stellt somit ein geeignetes und durch die häufige Nutzung anerkanntes Tiermodell der Wirbelsäulen Chirurgie dar (Wilke et al. 1997b; Baramki et al. 2000; Costi et al. 2002; Assad et al. 2003; Colloca et al. 2009; Guder et al. 2009; Sartoretto et al. 2016; Schwan et al. 2017).

3.2. Anatomie der Lendenwirbelsäule bei Mensch und Schaf

Im anatomischen Aufbau ist die Wirbelsäule des Schafes mit der des Menschen vergleichbar (Salomon et al. 2008; Schünke 2014). Sie besteht aus knöchernen Wirbelkörpern, welche über die dazwischenliegenden Zwischenwirbelscheiben (Disci intervertebrales) miteinander verbunden sind (Schünke et al. 2005).

Bei beiden Spezies reicht die Wirbelsäule von der Kopfbasis bis hin zur Steißbeinspitze beziehungsweise Schwanzspitze und gliedert sich in verschiedene Abschnitte (Salomon et al. 2008; Schünke 2014).

Die Unterteilung der Wirbelsäule erfolgt in die Halswirbelsäule, Brustwirbelsäule, Lendenwirbelsäule, das Kreuzbein und das Steißbein (Schünke 2014).

Die Gesamtzahl der Wirbel und somit auch der einzelnen Bereiche, wie zum Beispiel der Lendenwirbelsäule, variiert jedoch zwischen den Spezies (Boszczyk et al. 2001). Die Wirbelsäule des Menschen besteht insgesamt aus 24 präsakralen Wirbelkörpern: Sieben Halswirbeln, zwölf Brustwirbeln und fünf Lendenwirbeln (Paulsen und Waschke 2011). Die Anzahl der Wirbel des Schafes variiert von Tier zu Tier (Wilke et al. 1997a; Frewein et al. 2003; Salomon et al. 2008). Die Halswirbelsäule des Schafes besteht aus sieben Wirbeln, der thorakale Abschnitt kann zwischen 12 bis 14 Wirbel aufweisen (Wilke et al. 1997a; Frewein et al. 2003; Salomon et al. 2008). Der lumbale Bereich kann ebenfalls variabel sechs bis sieben

Grundlagen

Wirbel aufweisen und ist leicht kyphotisch geformt (Wilke et al. 1997a). Im Vergleich weist die humane Lendenwirbelsäule nur fünf anstatt der ovinen sechs bis sieben Wirbel und eine lordotische Krümmung auf (Wilke et al. 1997a; Bogduk et al. 2000; Paulsen und Waschke 2011).

Jeder Wirbel besteht aus einem Wirbelkörper (*Corpus vertebrae*) und einem Wirbelbogen (*Arcus vertebrae*) (Paulsen und Waschke 2011). Dieser Wirbelbogen sitzt dorsal auf dem Wirbelkörper und besteht aus paarigen Füßchen (*Pedikeln*), die sich nach dorsal zu einer Bogenplatte (*Lamina arcus vertebrae*) vereinigen (Paulsen und Waschke 2011). So entsteht zwischen dem Wirbelkörper und dem Wirbelbogen das Wirbelloch, auch *Foramen vertebrale* genannt (Paulsen und Waschke 2011). Die Wirbellöcher der einzelnen aneinander liegenden Wirbel bilden gemeinsam den Wirbelkanal (*Canalis vertebralis*) (Paulsen und Waschke 2011). Der Wirbelbogen trägt Fortsätze; die zwei nach lateral gerichteten Querfortsätze (*Processus transversi*) und den medial sitzenden Dornfortsatz (*Processus spinosus*) (Paulsen und Waschke 2011). Vier weitere gelenkige Fortsätze (*Processus articulares craniales und caudales*), jeweils paarig kranial und kaudal am Wirbelbogen liegend, bilden mit den jeweiligen Fortsätzen der angrenzenden Wirbel Gelenke aus (Salomon et al. 2008). Ebene Gelenke, wie diese sogenannten Zwischenwirbelgelenke (*Articulationes zygapophysiales*), weisen neben einem Gelenkspalt mit Gelenkknorpel überzogene Gelenkflächen und eine Gelenkhöhle auf, die von einer Gelenkkapsel umgeben ist (Salomon et al. 2008). Die Gelenkkapsel setzt am Rande der Gelenkknorpel an und umschließt damit die Gelenkfortsätze beider Wirbel (Salomon et al. 2008). Sie setzt sich aus zwei Schichten zusammen, der äußeren Schicht (*Stratum fibrosum*) und der Synovia produzierenden inneren Schicht (*Stratum synoviale*) (Salomon et al. 2008).

Die Zwischenwirbelgelenke bilden gemeinsam mit der Bandscheibe, dem *Foramen vertebrale*, den ansetzenden Muskeln und den Bändern ein sogenanntes Bewegungssegment (Junghanns 1951). Die Bewegungssegmente sind für die Kraftübertragung zwischen den Wirbeln zuständig und sorgen für Stabilität (Krämer et al. 2014). Gleichzeitig ermöglichen die Bandscheiben, dass die Wirbelsäule in alle Richtungen beweglich ist (Krämer et al. 2014). Zwischen den angrenzenden Wirbeln sind mit Ausnahme der Gelenke des ersten Halswirbels (*Atlas*) und des zweiten Halswirbels (*Axis*) meist nur geringe Bewegungen möglich (Krämer et al. 2014). Die Gesamtbeweglichkeit der Wirbelsäule entsteht erst durch die Summe der Einzelbewegungen in den Segmenten und nimmt von kranial nach kaudal ab (Schünke 2014). Die beschriebenen anatomischen Strukturen der Wirbel zeigen in den einzelnen Bereichen der Wirbelsäule unterschiedliche Ausprägung (Wilke et al. 1997a). So weist auch der anatomische Aufbau der Lendenwirbel bei Mensch und Schaf Gemeinsamkeiten und Unterschiede auf (Wilke et al. 1997a).

Die Lendenwirbelkörper des Schafes sind länger, jedoch nicht so breit wie die des Menschen (Mageed et al. 2013b). Die Pedikel sind sowohl beim Schaf als auch beim Menschen höher als breit (Wilke et al. 1997a). Vergleichbare Werte zeigen sich vor allem in der Pedikelbreite des zervikalen und lumbalen Bereichs beider Spezies (Wilke et al. 1997a). Der Spinalkanal des Schafes ist, wie der humane Spinalkanal, breiter als tief und zeigt im lumbalen Bereich eine ovale Form (Wilke et al. 1997a; Mageed et al. 2013b).

Im Gegensatz zum zervikalen und thorakalen Bereich ist der Dornfortsatz (Processus spinosus) der Lendenwirbel bei beiden Spezies ungefähr gleichlang ausgeprägt (Wilke et al. 1997a). In den genannten, weiter kranial liegenden Bereichen der Wirbelsäule, ist der ovine Processus spinosus fast zwei bis drei Mal länger als der humane (Wilke et al. 1997a). Beim Schaf neigen sich die Dornfortsätze im Lendenwirbelbereich nicht wie die humanen nach kaudal, sondern nach kranial (Mageed et al. 2013b). Die Querfortsätze sind im Lendenwirbelbereich beim Schaf wie auch die Dornfortsätze nach kranial geneigt und länger als beim Menschen (Mageed et al. 2013b). Misst man den Abstand vom lateralen linken bis zum lateralen rechten Ende der beiden Querfortsätze, kann der Abstand beim Schaf bis doppelt so lang sein (Wilke et al. 1997a; Salomon et al. 2008). Die humanen Querfortsätze stehen nahezu horizontal und sind leicht nach kaudal geneigt (Bogduk et al. 2000; Schünke et al. 2005).

3.3. Aufbau der Bandscheibe bei Mensch und Schaf

Die Bandscheibe (Discus intervertebralis) stellt die Verbindung zwischen den aufeinanderfolgenden Wirbeln dar (Krämer et al. 2014). Diese flexible Verbindung gehört zur Gruppe der Synchronosen (Krämer et al. 2014). Die Bandscheibe besteht aus dem Anulus fibrosus, einem äußeren, festen Faserknorpelring und einem zentral gelegenen gallertigen Kern, dem Nucleus pulposus (siehe Abbildung 1) (Krämer et al. 2014).

Grundlagen

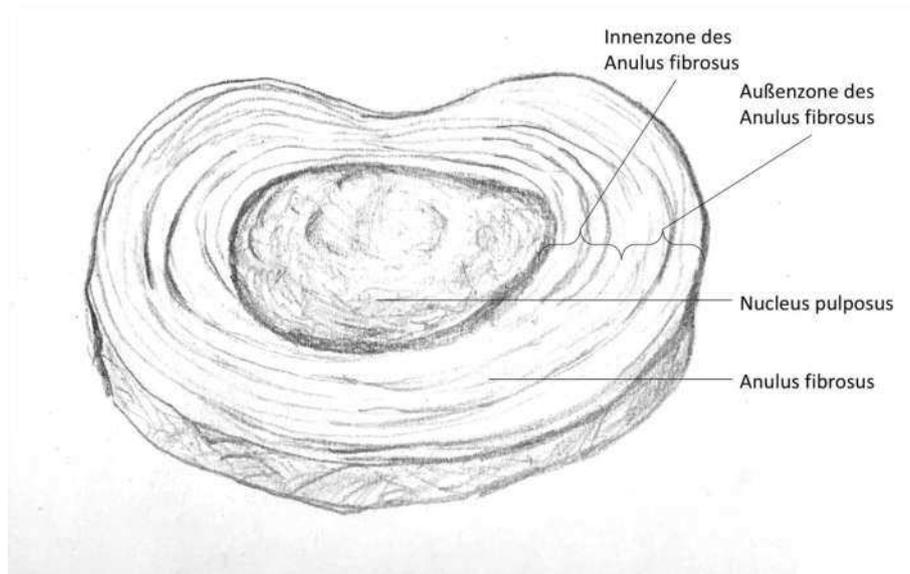


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Bandscheibe

Der Anulus fibrosus besteht hauptsächlich aus Typ-I-Kollagenfasern (Eyre und Muir 1977; Schünke 2014). Neben diesen wurden zusätzlich auch Kollagenfasern der Typen II, III, V, VI, IX, XII und XIV im Anulus fibrosus nachgewiesen (Eyre und Muir 1976; Eyre und Muir 1977; Eyre 1979; Roberts et al. 1991). Der Nucleus pulposus weist im Gegensatz zum Anulus fibrosus einen hohen Gehalt an Typ-II-Kollagenfasern auf (Eyre und Muir 1977). Er enthält auch Kollagenfasern der Typen I, VI und IX (Eyre und Muir 1976; Eyre und Muir 1977). Insgesamt werden circa 80% des gesamten Kollagengehalts der Bandscheibe durch Typ-I und Typ-II-Kollagenfasern gebildet (Eyre und Muir 1977).

Der Anulus fibrosus lässt sich in eine innere und in eine äußere Zone unterteilen (siehe Abbildung 1) (Schünke et al. 2005). Die äußere Zone besteht aus einer durch Typ-I-Kollagenfasern aufgebauten, zugfesten Hülle (Eyre und Muir 1977; Schünke et al. 2005). Diese Typ-I-Kollagenfasern sind in konzentrischen Schichten, sogenannten Lamellen, angeordnet (Schünke et al. 2005). Die Fasersysteme der Lamellen weisen dabei unterschiedliche, gegenläufige Steigungswinkel auf, überkreuzen sich und sind mit ihren Fasern (Sharpeysche Fasern) in der jeweiligen Randleiste (Epiphysis anularis) des Wirbelkörpers verankert (Schünke et al. 2005). Durch diese Verankerung verbinden sie die Randleisten zweier angrenzender Wirbel miteinander. Die Fasern innerhalb der einzelnen Lamellen sind parallel zueinander, Fasern aneinandergrenzender Lamellen entgegengesetzt angeordnet (Urban und Roberts 1995; Reid et al. 2002; Schünke et al. 2005). Der Orientierungswinkel zwischen den einzelnen Fasern benachbarter Lamellen nimmt von circa 70° zur Wirbelsäulenachse im äußeren Anulus fibrosus bis auf circa 50° im inneren Anulus fibrosus ab (Hickey und Hukins 1980a; Hickey und Hukins 1980b; Cassidy et al. 1989; Reid et al. 2002).

Die Innenzone des Anulus fibrosus wird durch faserknorpeliges Gewebe gebildet. Die Typ-II-Kollagenfasern dieser Innenzone strahlen in die zentralen Knorpeldeckplatten der

angrenzenden Wirbelkörper ein (Schünke et al. 2005). Diese Knorpeldeckplatten grenzen den Anulus fibrosus und den Nucleus pulposus gegen den anliegenden Wirbelkörper ab (Roberts et al. 1989). Unter diesen Knorpelplatten liegt die jeweilige Abschlussplatte (Facies intervertebralis) des Knochens, welche mit Poren durchsetzt ist. Die Poren stellen eine Verbindung zum Knochenmarksraum der Wirbelkörper her und damit zu den Gefäßen, welche auch zur Ernährung der Bandscheibe dienen (Schünke et al. 2005).

Die Bandscheibe zählt, wie beispielweise die Hornhaut (Cornea), zu den avaskulären Geweben des Körpers (Urban et al. 1977; Urban und Roberts 2003). Bis zum Säuglingsbeziehungsweise Kindesalter ist die Bandscheibe vaskularisiert (Hassler 1969; Taylor et al. 1992). Mit zunehmendem Alter bilden sich diese Gefäße zurück, wodurch in der erwachsenen, gesunden Bandscheibe keine Gefäße mehr zu finden sind (Brettschneider 1952; Rudert und Tillmann 1993). Die Ernährung erfolgt aufgrund der Abwesenheit der Gefäße durch Flüssigkeitsaustausch hauptsächlich in Form von Diffusion (Urban et al. 1977; Urban et al. 1978; Holm et al. 1981).

Dieser Austausch wird vor allem durch die Bewegung der Wirbelsäule und die somit erfolgende Belastung und Entlastung ermöglicht (Urban et al. 1977; Schünke et al. 2005). Dabei kann der Austausch über zwei Wege stattfinden: Einerseits über die Blutgefäße, welche in der Peripherie den Anulus fibrosus umgeben und andererseits über die Endplatten der angrenzenden Wirbelkörper (Urban et al. 1977; Urban et al. 1978; Holm et al. 1981). Der Weg über die Endplatte ist hierbei laut Ogata und Whiteside (1981) der Weg mit der größeren Bedeutung. Durch die Blockade dieses Weges über die Endplatte kommt es zu einer deutlich größeren Einschränkung des Austauschs von Nährstoffen und Stoffwechselprodukten (Ogata und Whiteside 1981). Die beiden unterschiedlichen Möglichkeiten der begrenzenden Gewebsschichten der Bandscheibe weisen Eigenschaften einer semipermeablen Membran auf, also Unterschiede in der Durchlässigkeit für gelöste Stoffe und Flüssigkeiten (Krämer et al. 2014). So diffundiert Glucose hauptsächlich über die Endplatten und negativ geladene Stoffe vorwiegend über die Peripherie des Anulus fibrosus in die Bandscheibe (Urban et al. 1977; Holm et al. 1981).

Ähnlich wie der Nucleus pulposus besteht auch der Anulus fibrosus größtenteils aus Wasser, Proteoglykanen und Kollagen (Eyre und Muir 1977; Eyre 1979). Der Wassergehalt im Anulus fibrosus beträgt 50 bis 82% und nimmt von außen nach innen zu; in der Außenzone des Anulus fibrosus liegt er zwischen 50 bis 74%, in der Innenzone um 80 bis 82% (Eyre und Muir 1977; Eyre 1979; Lyons et al. 1981; Kolditz et al. 1985; Weidenbaum et al. 1992; Meakin und Hukins 2000; Costi et al. 2002; Reid et al. 2002; Iatridis et al. 2007; Zhu et al. 2017).

Der Proteoglykangehalt des Anulus fibrosus liegt bei 10% der Trockenmasse, der Kollagengehalt liegt zwischen 50 bis 80% der Trockenmasse, wobei sich der Gehalt in der

Grundlagen

Außenzone im Bereich zwischen 70 bis 80% und in der Innenzone zwischen 50 bis 60% bewegt (Blumenkrantz et al. 1977; Eyre und Muir 1977; Eyre 1979; Reid et al. 2002).

Der Nucleus pulposus wird aufgrund seiner Eigenschaften auch oft als Wasserkissen zwischen zwei benachbarten Wirbelkörpern bezeichnet (Schünke et al. 2005). Er ist der Kern der Bandscheibe und seine Matrix besteht aus einer gallertartigen Masse, welche zu 70 bis 90% aus Wasser zusammengesetzt ist (Eyre und Muir 1977; Kolditz et al. 1985; Weidenbaum et al. 1992; Reid et al. 2002). Der Gehalt an Proteoglykanen im Nucleus pulposus beträgt 30 bis 50% der Trockenmasse und der an Typ-II-Kollagenen bis zu 20% der Trockenmasse (Eyre und Muir 1976; Eyre 1979; Lyons et al. 1981; Weidenbaum et al. 1992; Meakin und Hukins 2000; Costi et al. 2002).

Der Nucleus pulposus stellt somit den Bereich der Bandscheibe mit der höchsten Konzentration an Proteoglykanen und Wasser dar, während der Anulus fibrosus den höchsten Gehalt an Kollagen aufweist (Kolditz et al. 1985; Inkinen et al. 1998; Reid et al. 2002; Mwale et al. 2004). Der Proteoglykangehalt der Nuclei pulposi weist in den einzelnen Bereichen der Wirbelsäule Unterschiede auf. So ist der Proteoglykangehalt der Nuclei pulposi am höchsten im Bereich der Lendenwirbelsäule und am niedrigsten bei Bandscheibenkernen der Halswirbelsäule (Scott et al. 1994). Der Kollagengehalt verhält sich gegensätzlich, er ist in den Nuclei pulposi der Halswirbelsäule höher als in denen der Lendenwirbelsäule (Scott et al. 1994).

Der hohe Wassergehalt im Innern des Nucleus pulposus wird durch osmotische Eigenschaften der Teilchen ermöglicht (Melrose et al. 2001a). Sie sind für die Erzeugung und die Aufrechterhaltung des hydrostatischen Drucks im Inneren verantwortlich und tragen damit zu der Beschaffenheit des Nucleus pulposus bei (Melrose et al. 2001a).

Eins dieser osmotischen wirksamen Moleküle ist das Proteoglykan Aggrecan, welches reichlich im Nucleus pulposus vorhanden ist. Es liegt meist in multimolekularen Aggregaten vor, in denen die Aggrecan Moleküle untereinander durch Hyaluronsäuren verbunden sind (Kiani et al. 2002; Angele et al. 2016). Aggrecan besteht aus einer Kernprotein-Kette mit drei globulären Bereichen (Domänen) (Kiani et al. 2002). Zwischen der zweiten und dritten Domäne liegen die Bindungsstellen für die osmotisch wirksamen Glycosaminoglykane (Kiani et al. 2002). Die erste Domäne interagiert mit der Hyaluronsäure und sogenannten Link-Proteinen, wodurch stabile Komplexe entstehen (Kiani et al. 2002).

Durch seine Fähigkeit Hyaluronsäure zu binden, spielt Aggrecan eine wichtige Rolle in der Vermittlung von Knorpelzell-Knorpelzell-Wechselwirkungen und Knorpelzell-Matrix-Wechselwirkungen und damit zur Erhaltung der mechanischen Eigenschaften der Bandscheibe (Kiani et al. 2002; Roughley et al. 2006).

Auch das Proteoglykan Versican ist eines der großen Proteoglykane der Bandscheibe von Mensch und Schaf (Johnstone und Bayliss 1995; Melrose et al. 2001a). Arbeiten belegen,

dass die Konzentration von Versican vor allem in ovinen Bandscheiben von Föten hoch ist, jedoch mit zunehmendem Alter deutlich abnimmt (Melrose et al. 2001a).

Ebenso verhält sich das Proteoglykan Perlecan, welches vergleichbar zum Versican vor allem in den Bandscheiben oviner und humaner Föten detektiert wurde (Melrose et al. 2002; Melrose et al. 2003). Perlecan zählt neben Decorin, Lumican, Fibromodulin und Biglycan zu den kleinen Proteoglykanen der Zwischenwirbelscheibe (Gotz et al. 1997; Melrose et al. 2001a; Melrose et al. 2003; Brown et al. 2012). Neben den genannten Kollagenen und kleinen und großen Proteoglykanen wurden auch Glykoproteine in der Bandscheibe detektiert (Bywaters und Dorling 1970; Ladefoged 1985; Hayes et al. 2001; Melrose et al. 2001a).

Bei Belastungen wird die gallertige Masse im Nucleus pulposus durch Körpergewicht und Muskelkräfte einem großen Druck ausgesetzt (Schünke et al. 2005). Dieser Druck auf die Bandscheibe variiert je nach Haltung und Aktivität ständig. Da der Nucleus pulposus nicht komprimierbar ist, wird der Druck bei Belastung auf die umliegenden Strukturen, wie den Anulus fibrosus und die Knorpelplatten der angrenzenden Wirbelkörper, verteilt (Schünke et al. 2005). Gemeinsam mit dem Anulus fibrosus bildet der Nucleus pulposus somit eine Art "Stoßdämpfer", da der entstehende Druck gleichmäßig abgefangen und auf die Deck- und Bodenplatten der angrenzenden Wirbel umverteilt wird (Schünke et al. 2005).

Auch die Hydratation der Bandscheiben von Schaf und Mensch über eine bestimmte Zeit ist vergleichbar (Costi et al. 2002). Betrachtet man also die Form, die Hydratation, den Wassergehalt, den Kollagengehalt, sowie die Ausrichtung der Kollagenfasern der Bandscheibe beider Spezies, so sind diese vergleichbar und die ovine Bandscheibe kann somit als Modell der humanen dienen (Costi et al. 2002; Reid et al. 2002; Schmidt und Reitmaier 2013).

3.4. Pathologie der Bandscheibe

Im folgenden Absatz bezieht sich die Arbeit im Wesentlichen auf die Erkenntnisse von Krämer et al. (2014). Erkrankungen, unabhängig ob diese indirekt oder direkt, von den Zwischenwirbelscheiben des Menschen ausgehen, werden als bandscheibenbedingte (diskogene) Erkrankungen bezeichnet. Diese diskogenen Erkrankungen lassen sich in zwei Gruppen unterteilen: Einerseits in die nicht-degenerativen Bandscheibenerkrankungen, andererseits in die degenerativen Bandscheibenerkrankungen. Circa 62% aller bandscheibenbedingten Erkrankungen des Menschen betreffen dabei die Lendenwirbelsäule. Im Folgenden werden Bandscheibenveränderungen des Menschen näher beschrieben und auf mögliche Therapiemaßnahmen eingegangen.

3.4.1. Nicht-degenerative Bandscheibenveränderungen

Zu den nicht-degenerativen Erkrankungen zählen Veränderungen die auf Entwicklungsstörungen, kongenitale Fehlbildungen und Entzündungen zurückzuführen sind (Krämer et al. 2014). Ein Teil der Entwicklungsstörungen sind selten auftretende Rückbildungsstörungen der Chorda dorsalis, welche in der Entwicklung bei Wirbeltieren den Vorläufer der Wirbelsäule darstellt (Schmorl und Junghanns 1968). Die Chorda dorsalis wird frühzeitig in der Entwicklung der befruchteten Eizelle (Keimentwicklung) durch die Wirbelsäule ersetzt (Krämer et al. 2014). Schließen sich die Durchtrittsstellen der Chordakanales nicht, entstehen bogenförmige Eindellungen im dorsalen Drittel der Deck- und Bodenplatten der Wirbelkörper (Krämer et al. 2014). Im Bereich dieser Eindellungen weist der Wirbelkörper eine dünnere Kortikalis und eine dünnere Knorpelendplatte auf, wodurch an diesen Stellen Bandscheibenmaterial in den Wirbelkörper vortreten und sogenannte Schmorl-Knötchen (Schmorl-Knorpelknötchen) bilden kann (Schmorl und Junghanns 1968; Krämer et al. 2014). Weitere nicht-degenerative Erkrankungen stellen juvenile Aufbaustörungen wie Ossifikationsverzögerungen, Ossifikationslücken und Knorpelverknöcherungsstörungen dar (Rathke 1954; Schmorl und Junghanns 1968; Krämer et al. 2014). Sie haben Auswirkungen auf das Wachstum des Wirbelkörpers und der Bandscheibe (Rathke 1954; Schmorl und Junghanns 1968; Krämer et al. 2014). Das Vorhandensein von juvenilen Aufbaustörungen führt häufig zu vermehrtem Auftreten von bandscheibenbedingten Beschwerden (Idelberger 1984).

Auch kongenitale Fehlbildungen zählen zu den nicht-degenerativen Bandscheibenveränderungen (Winter et al. 1983). Fehlt der Bandscheibenraum zum Beispiel vollständig oder teilweise, nennt man die betroffenen, angrenzenden Wirbel Blockwirbel oder inkomplette Blockwirbel (Hefti 2002). Kongenitale Fehlbildungen der Wirbelsäule entstehen meist durch toxische Schädigungen während der Schwangerschaft (Winter et al. 1983; Connor et al. 1987; Krämer et al. 2014). Nur circa 1% der kongenitalen Fehlbildungen sind dabei hereditären, also erblichen Ursprungs (Winter et al. 1983; Connor et al. 1987).

Auch Entzündungen zählen zu den nicht-degenerativen Veränderungen und können die Wirbelsäule betreffen. Sie können als Spondylodiszitis, als Spondylitis oder als Diszitis vorliegen (Krämer et al. 2014). Die Spondylodiszitis beschreibt die Entzündung des gesamten Bewegungssegmentes, also zweier benachbarter Wirbelkörper und der eingerahmten Bandscheibe (Niethard et al. 2014). In diesem Fall geht die Entzündung von den Abschlussplatten zweier aneinander angrenzender Wirbel auf die Bandscheibe über (Niethard et al. 2014). Geht die Entzündung nicht auf die angrenzende Bandscheibe über und es bleibt bei einer isolierten Entzündung der Wirbelkörper, nennt man dies Spondylitis (Forsting et al. 2009; Niethard et al. 2014). Die Spondylitis und die Spondylodiszitis breiten sich meist

hämatogen aus (Niethard et al. 2014). In über 90% der Fälle liegt bei Diagnosestellung eine Spondylodiszitis vor (Forsting et al. 2009).

Die Diszitis ist die isolierte Entzündung der Bandscheibe (Krämer et al. 2014). Sie kann spontanem oder iatrogenem Ursprung sein und durch gram-positive, durch gram-negative Erreger, durch Pilzinfektionen oder durch Mykobakterien hervorgerufen werden (Holmes et al. 1988; Honan et al. 1996; Krämer et al. 2014). Iatrogen erfolgt eine Infektion mit Erregern meist durch direkte Keimeinbringung durch die Manipulation des Zwischenwirbelraumes, beispielsweise bei einer Punktion der Bandscheibe (Diskuspunktion) oder bei einer Entfernung von geschädigtem Bandscheibenmaterial (Diskotomie) (Guyer et al. 1988; Krämer et al. 2014). Bei entzündlichen, rheumatischen Erkrankungen konnten auch abakterielle Entzündungen der Zwischenwirbelscheiben detektiert werden (Langlois et al. 2005).

3.4.2. Degenerative Bandscheibenveränderungen

Fardon (2001) definierte die degenerative Bandscheibenerkrankung als ein klinisches Syndrom, welches für die Manifestation einer degenerativen Bandscheibenveränderung, sowie die damit einhergehenden klinischen Symptome, steht. Im Allgemeinen ist es jedoch schwierig den Alterungsprozess der Bandscheibe und die damit einhergehende physiologische Degeneration von der pathologischen Veränderung abzugrenzen, da die Übergänge meist fließend sind (Osterholt 2011; Krämer et al. 2014).

Nach Adams und Roughley (2006) ist die Degeneration ein komplexer Ablauf aus zellmodulierten Reaktionen auf die auftretenden, strukturellen Veränderungen. Einerseits muss die, durch die Aufnahme des aufrechten Ganges zunehmende axiale Belastung als Ursache angesehen werden. Andererseits sind auch genetische Faktoren, mechanische, zelluläre und biochemische Komponenten, Teil des Prozesses (Adams und Roughley 2006). Der Prozess geht mit Veränderungen der biomechanischen und histologischen Eigenschaften der Bandscheibe einher (Forsting et al. 2009). Histologisch lassen sich erste Veränderungen in den Endplatten, im Anulus fibrosus und im Nucleus pulposus schon im Alter von 10 bis 16 Jahren erkennen (Boos et al. 2002). 85 bis 95% aller 50-Jährigen haben bei Obduktionen Anzeichen einer degenerativen Bandscheibenveränderung (Boos et al. 2002; Börm 2009). Nach Miller et al. (1988) steigt die Prävalenz von Bandscheibendegenerationen von 16% bei Menschen im Alter von 20 Jahren auf bis zu 98% bei Menschen im Alter von 70 Jahren an. Genetische Faktoren spielen in der Bandscheibendegeneration ebenfalls eine Rolle. Die Erbllichkeit für degenerative Bandscheibenveränderungen im Bereich der Lendenwirbelsäule wird mit bis zu 74% angegeben (Sambrook et al. 1999; Battie et al. 2004).

3.4.2.1. Verlauf der degenerativen Bandscheibenveränderung

Die Anfänge der Veränderungen lassen sich, wie zuvor erwähnt, schon mit Erlernen des aufrechten Ganges und dem damit verbundenen Rückgang der Gefäßversorgung feststellen (Brettschneider 1952; Rudert und Tillmann 1993; Adams und Roughley 2006). Mit Aufnahme des aufrechten Ganges übertragen sich die entstehenden Drücke direkt auf die Knochen und das Bandscheibengewebe (Brettschneider 1952; Rudert und Tillmann 1993; Adams und Roughley 2006; Krämer et al. 2014). Die in der Bandscheibe liegenden Blutgefäße sind gegen die veränderten Druckverhältnisse nicht geschützt; sie kollabieren, atrophieren und verschwinden letztlich (Rudert und Tillmann 1993; Krämer et al. 2014).

Es kommt zu einer Mangelversorgung der Bandscheibenzellen, welche durch die Diffusion anstatt der vorher stattfindenden Blutversorgung nicht behoben werden kann (Urban et al. 1977; Urban et al. 1978; Holm et al. 1981). Durch die Hypoxie entstehen Zellschäden, die zu oxidativem Stress führen (Nerlich et al. 1997). Bestimmte Marker des oxidativen Stresses, wie zum Beispiel Carboxy-Methyllysin, konnten gehäuft in degenerierten Bandscheiben nachgewiesen werden (Nerlich et al. 1997). Mit der Gewichtszunahme, während des Wachstums, steigt die axiale Belastung auf die Wirbelsäule an. In Abschnitten der Wirbelsäule in denen die axiale Belastung deutlich höher ist, wie der Lendenwirbelsäule und der Halswirbelsäule, zeigt sich häufig eine frühzeitige Veränderung des Bandscheibengewebes (Krämer et al. 2014).

Bei physiologischer Versorgung der Bandscheibe gleichen sich der Aufbau und der Abbau der Matrixmoleküle stetig aus (Urban und Roberts 2003; Urban et al. 2004). Die Bandscheibenzellen besitzen jedoch eine schlechte Anpassungsfähigkeit, was zu einer verminderten Produktion von Molekülen führt (Urban und Roberts 2003; Krämer et al. 2014). Proteinasen, wie die Aggrecanasen und die Matrixmetalloproteinasen (MMPs), bauen jedoch stetig ihre Substrate weiter ab, wodurch es zu einer Absenkung des pH-Wertes und damit einer weiter sinkenden Syntheserate von Proteoglykanen und elastischen Fasern kommt (Sztrolovics et al. 1997; Roberts et al. 2000; Urban und Roberts 2003; Urban et al. 2004). Matrixmetalloproteinasen (MMPs) können natives Kollagen enzymatisch spalten, wodurch die Bandscheibenstruktur weiter zerstört wird (Sztrolovics et al. 1997; Roberts et al. 2000; Urban und Roberts 2003; Urban et al. 2004). Eine erhöhte Expression verschiedener MMPs wurde in degenerativ veränderten Bereichen der Bandscheibe nachgewiesen (Roberts et al. 2000; Börm 2009).

Durch den Verlust an osmotisch wirksamen Molekülen, wie den Proteoglykanen, kommt es zum Quelldruckverlust und zur Höhenabnahme der Bandscheibe (Roughley et al. 2002; Roughley 2004; Roughley et al. 2006). Es wird vermehrt minderwertiges Gewebe gebildet und die Bandscheibe verliert weiter an Elastizität (Lyons et al. 1981; Urban und Roberts 2003).

Neben der Ausbildung von minderwertigem Gewebe konnte in degenerierten Bandscheiben auch die Einsprossung von Gefäßen aus der Umgebung und von Nervenfasern detektiert werden (Coppes et al. 1997; Freemont 2009).

3.4.2.2. Phasen der degenerativen Bandscheibenveränderung

Kirkaldy-Willis und Farfan (1982) teilen die Manifestation der degenerativen Veränderung in drei Phasen, wobei die Dauer der einzelnen Phasen und ihre Symptome nicht klar voneinander abgrenzbar sind. Die Dysfunktionale Phase beschreibt die Degeneration des Nucleus pulposus, die Rissbildung im Anulus fibrosus und früh in Erscheinung tretende osteoarthritische Veränderungen. Die zweite Phase, die instabile Phase, fasst die Begebenheiten zusammen, die zur unphysiologischen und vergrößerten Beweglichkeit des Segmentes führen (Kirkaldy-Willis und Farfan 1982). Die dritte Phase bezeichnet die Phase der erneuten Stabilisierung des betroffenen Bewegungssegmentes, unter anderem durch vermehrte Bildung von Kollagen in der Bandscheibe und der Bildung von osteophytären Anbauten der Wirbelkörper (Kirkaldy-Willis und Farfan 1982; Osterholt 2011; Vogl et al. 2011).

3.4.2.2.1. Dysfunktionale Phase

In Folge des Degenerationsprozesses kommt es zur Reduktion der Dichte an Zellen im Nucleus pulposus und zur Abnahme des Gehaltes an Kollagen und an Proteoglykanen (Börm 2009). Als Folge des Verlustes an osmotisch wirksamen Molekülen kommt es zu einem verminderten Wasserbindungsvermögen und damit im Verlauf des Alterungsprozesses und der Bandscheibendegeneration (Diskose) zu einer Abnahme des Wassergehaltes der Bandscheibe (Forsting et al. 2009).

Durch den verringerten Quelldruck vermindert sich die stützende Funktion des Nucleus pulposus gegenüber dem Faserring (Raj 2008). Die Belastung auf den Faserring nimmt zu und es kommt zu Rissbildung im Gewebe des Anulus fibrosus (Guterl et al. 2013; Krämer et al. 2014). Konzentrische Risse verändern die Struktur des Anulus fibrosus und werden im Prozess des Alterns beschrieben, während radiäre Risse die Ausgangspunkte für die Lageveränderungen von Nucleus pulposus Material darstellen (Osterholt 2011; Krämer et al. 2014). Bei der Protrusion sind die äußeren Schichten des Anulus fibrosus noch intakt (Krämer et al. 2014). Werden die äußeren Schichten durchbrochen, kommt es zum sogenannten Prolaps (Krämer et al. 2014). Das Material des Nucleus pulposus wird hierbei in den Wirbelkanal gepresst und kann zu einer Kompression des Rückenmarks oder der Spinalnervenwurzel führen (Krämer et al. 2014).

3.4.2.2. Phase der Instabilität und der erneuten Stabilisierung

Ein Faktor, welcher die schlechte Versorgungslage weiter verstärkt, ist die durch unphysiologische Bewegungen entstehende und mit dem Alter zunehmende Kalzifizierung der Wirbelkörperendplatten (Bernick und Cailliet 1982; Roberts et al. 1996; Urban und Roberts 2003). Häufig kalzifizieren die Knorpelzellen der Endplatten zuerst, die nahe des Wirbelkörpers liegen und werden abgebaut (Forsting et al. 2009). Die knorpeligen Endplatten werden dünner und können die Bandscheibe nur noch unzureichend vom Wirbelkörper abgrenzen (Forsting et al. 2009). Durch Rissbildung der knorpeligen Endplatten, in welche Nucleus pulposus Material vortreten kann, kommt es zu sogenannten intervertebrale Hernien. Die Bandscheibe verliert weiter an Höhe, wenn dieses in den Wirbelkörper hervorgetretene Gewebe, abgebaut wird (Forsting et al. 2009). Der Verlust der Bandscheibenhöhe wirkt sich auch auf weitere anliegende Strukturen aus. Durch Abnahme der Elastizität und des intradiskalen Drucks der Zwischenwirbelscheibe, kommt es zu einer vermehrter Belastung des Anulus fibrosus und der Facettengelenke (Börm 2009).

Kirkaldy-Willis et al. (1978) fanden heraus, dass eine degenerative Veränderung der Bandscheibe meist in Kombination mit einer Veränderung der Facettengelenke einhergeht und diese Beziehung auch umgekehrt besteht. Dies führt zum Zustand der Segmentinstabilität; durch Abnahme der Bandscheibenhöhe und durch den Wasserverlust kommt zu einem verminderten Zusammenhang der Wirbelkörper untereinander und damit zur Bandscheibenlockerung (Kirkaldy-Willis et al. 1978; Kirkaldy-Willis und Farfan 1982).

Unphysiologische Bewegungen werden möglich, wodurch es zu Reaktionen der angrenzenden Wirbelkörper kommt. Als Folgen der Instabilität treten zum Beispiel Verschiebungen der Wirbel gegeneinander, Defekte an den Endplatten und Spondylose auf (Kirkaldy-Willis et al. 1978; Kirkaldy-Willis und Farfan 1982).

3.5. Therapie der Bandscheibenerkrankungen

3.5.1. Therapieformen

Ob konservativ oder operativ therapiert wird, ist abhängig von der Ausprägung und Dauer der klinischen Symptome (Koller 2010). Krämer et al. (2014) unterscheiden die lokalen Lumbalsyndrome, die lumbalen Wurzelsyndrome und die Kaudasyndrome voneinander. Unter dem Begriff Lumbalsyndrom werden alle Symptome, die durch degenerative Veränderungen oder Funktionsstörungen im lumbalen Abschnitt der Wirbelsäule entstehen, zusammengefasst (Krämer et al. 2014). Das lokale Lumbalsyndrom beschränkt sich in seiner Symptomatik auf die Lumbalregion (Krämer et al. 2014). Lumbale Wurzelsyndrome gehen zusätzlich mit Schmerzen die in ein Bein ausstrahlen einher und bei den Kaudasyndromen kommt es zu

tiefen Querschnittssymptomen (Krämer et al. 2014). 62% aller bandscheibenbedingten Erkrankungen betreffen die Lendenwirbelsäule (Krämer et al. 2014).

3.5.2. Konservative Therapie

Jedes Bewegungssegment ist ein dreigelenkiger Komplex der aus zwei Wirbelkörpern, der dazwischenliegenden Bandscheibe, den Facettengelenken und einer Vielzahl von Band- und Muskelstrukturen besteht (Junghanns 1951). Die neben der Wirbelsäule liegende Muskulatur und der umliegende Bandapparat ermöglichen die physiologische Bewegung und spielen eine bedeutende Rolle in der Stabilisierung der Wirbelsäule (Quint et al. 1998; Osterholt 2011).

Ziele der konservativen Therapie sind Schmerzreduktion, Prävention von Rezidiven und die Kuration und die Rehabilitation (Börm 2009; Gollnast 2012). Es sind verschiedene Therapieverfahren bekannt, die der konservativen Therapie zugeordnet werden können (Börm 2009). Die konservative Therapie basiert dabei auf einem Einsatz von zum Beispiel Krankengymnastik, medikamentöser Therapie und physikalischer Therapie in Form von thermischen, elektrischen, mechanischen, kinetischen und physikochemischen Anwendungen (Malanga und Nadler 1999; Börm 2009).

Mittlerweile wird die aktive Therapie in Form von Bewegung den passiven Maßnahmen vorgezogen, um eine schnellere Rehabilitation zu erreichen (Börm 2009). Die Physiotherapie nimmt eine bedeutende Rolle im Rahmen der konservativen Therapie ein. Übungen im Rahmen der Physiotherapie sollen zu einer Reduktion der Schmerzen führen, die Facettengelenke entlasten und die umliegende Muskulatur zur Stabilisierung des Segmentes stärken (Börm 2009; Osterholt 2011; Krämer et al. 2014).

Neben einer oral verabreichten medikamentösen Therapie zählt auch der Einsatz schmerztherapeutischer Injektionen mit Lokalanästhetika, Steroiden oder Kombinationen beider Mittel zur konservativen Therapieform (Shapiro und Risbud 2013). Die reine Physiotherapie wurde mittlerweile von den multimodalen Behandlungsprogrammen abgelöst, also der Kombination mehrerer verschiedener, konservativer Therapien (Börm 2009). Patienten die mit einem multimodalen Therapieansatz behandelt werden, zeigen eine reduzierte Chronifizierungstendenz und können schneller in ihr Arbeitsleben zurückkehren (Bromme et al. 2015).

Nicht nur somatische Faktoren führen zu Einschränkungen des Betroffenen, auch psychologische und psychosoziale Faktoren spielen eine Rolle (Gatchel et al. 1995). Deshalb wird häufig eine Verhaltenstherapie ergänzend zu den anderen Methoden eingesetzt, um so auch diese Komponente des Schmerzgeschehens zu reduzieren (Börm 2009).

3.5.3. Operative Therapie

Ist die konservative Therapie bei der Behandlung eines Bandscheibenvorfalles nicht erfolgreich und eine gravierende Besserung der Symptomatik tritt auch nach sechs bis acht Wochen nicht ein, wird eine Umstellung der Behandlungsmethode oder eine chirurgische Therapie empfohlen (Rothoerl et al. 2002).

Die chirurgischen Therapiemöglichkeiten lassen sich in minimalinvasive oder offen operative Methoden unterteilen (Krämer et al. 2014). Die jeweilige chirurgische Therapiemethode sollte in Abhängigkeit von der Indikationsstellung und der Kenntnisse des Chirurgen gewählt werden (Guder 2008). Die minimalinvasive Therapie, auch als invasive, nichtoperative Therapie bezeichnet, bildet einen weiteren Behandlungszweig zwischen der konservativen und der offenen operativen Therapie (Krämer et al. 2014).

Die chirurgischen Therapiemethoden können je nach dem jeweiligen Ziel in verschiedene Kategorien eingeteilt werden. Im Rahmen dieser Arbeit wird nur auf einige Vertreter der beiden Therapieformen eingegangen.

3.5.3.1. Nukleotomie

Bei der chirurgischen Therapiemethode Nukleotomie beziehungsweise Diskektomie wird das prolabierte Gewebe der Bandscheibe entfernt, mit dem Ziel die Dekompression der nervalen Strukturen zu erreichen (Krämer et al. 2014). Neben der Möglichkeit eines offenen operativen Zugangs, kann bei den minimalinvasiven perkutanen Verfahren die betroffene Bandscheibe auch über einen posterolateralen, perkutanen Zugang mittels, einer Sonde erreicht werden (Krämer et al. 2014). Dieser Zugang wurde aus der Diagnostik übernommen, wo er beispielsweise zur Punktion genutzt wird.

Die Mikrodiskektomie gehört zu den offenen chirurgischen Standardtherapieverfahren (Krugluger und Knahr 2001). Auch bei den offenen, chirurgischen Verfahren geht die Tendenz zu den mikrochirurgischen Eingriffen, um eine möglichst geringe Schädigung der umliegenden Strukturen zu erreichen (Krämer et al. 2014). Häufig führt die Durchführung einer Nukleotomie zu einer weiteren iatrogenen Schädigung der Bandscheibe, wodurch eine Degeneration des betroffenen Bewegungssegmentes gefördert wird (Hanley und Shapiro 1989; Ogon et al. 1997; Singh et al. 2009). Der operative Zugang führt zusätzlich zu einer funktionellen Beeinträchtigung der umliegenden Strukturen (Leu 1990).

Ein weiteres minimalinvasives Verfahren stellt die Chemonukleolyse dar. Bei diesem Verfahren werden chondrolytische Enzyme, wie Chymopapain, Chondroitinase ABC oder Kollagenasen, in die Bandscheibe injiziert und lösen dort das Gewebe des Nucleus pulposus auf (Krugluger und Knahr 2001). Auch ein Gemisch aus Sauerstoff und Ozon wird genutzt

(Magalhaes et al. 2012; Streitparth und Disch 2015). Bei der Chemonukleolyse konnten in der Literatur unterschiedliche Nebenwirkungen dokumentiert werden, wie zum Beispiel allergische Reaktionen, fortschreitender Stabilitätsverlust oder der postinjektionelle Kreuzschmerz (McCulloch 1980; Olmarker et al. 1990; Nordby et al. 1993).

Die Erfolgsrate der perkutanen lumbalen Diskektomie liegt nach Chatterjee et al. (1995) bei nur 29%. Im Vergleich dazu liegt die Erfolgsrate der Mikrodiskektomie bei 80% (Chatterjee et al. 1995).

Über ein Viertel der Patienten geben nach der Nukleotomie noch Schmerzen an (Hanley und Shapiro 1989; Loupasis et al. 1999; Vik et al. 2001). Neben anhaltenden oder erneut auftretenden Schmerz sind auch ein Instabilitätsgefühl und erneute neurologische Symptome möglich (Hanley und Shapiro 1989; Loupasis et al. 1999; Vik et al. 2001). Diese Symptome treten bei circa 37% der Patienten nach der Operation auf und werden dem sogenannten Postdiskotomiesyndrom oder auch Postdiskektomiesyndrom (englisch: Failed back surgery syndrome (FBSS)) zugeordnet (Rodrigues et al. 2006). In den zahlreichen Literaturangaben wird die Reoperationsrate nach der Durchführung einer Nukleotomie mit 7,3-18,4% angegeben (Dvorak et al. 1988; Hoffman et al. 1993; Loupasis et al. 1999; Vik et al. 2001). Diese Zahlen machen deutlich, weshalb mittlerweile die Indikation für eine Operation kritischer hinterfragt wird.

3.5.3.2. Fusionsoperationen

Bei der Entfernung von prolabiertem Bandscheibenmaterial wird zwar eine Dekompression der nervalen Strukturen erreicht, jedoch bleibt die Segmentinstabilität oder wird durch die durchgeführte Entfernung des Materials sogar noch erhöht (Krämer et al. 2014).

Fusionsoperationen, auch Spondylodesen genannt, werden häufig bei Patienten zur Behebung der Instabilität eines Postdiskotomiesyndroms angewendet (Leu 1990). Ziel der Fusionsoperation ist die Stabilisierung des instabilen Segmentes durch eine knöcherne Überbrückung (Krämer et al. 2011; Krämer et al. 2014). Es lassen sich die implantathaltigen von den implantatfreien Fusionsoperationen unterscheiden (Krämer et al. 2014).

Ein Nachteil der Spondylodesen ist, dass es durch die Versteifung zu einer vermehrten Belastung der angrenzenden Segmente kommt (Lee 1988; Aota et al. 1995). Folgend kommt es in den benachbarten Segmenten zur Degeneration oder zur Verstärkung eines schon bestehenden Degenerationsprozesses (Lehmann et al. 1987; Lee 1988; Ghiselli et al. 2004; Soh et al. 2013). Von diesen Veränderungen ist vermehrt das über dem fusionierten Segment liegende Segment betroffen (Aota et al. 1995; Chosa et al. 2004; Ghiselli et al. 2004; Soh et al. 2013).

Nach Guigui et al. (2004) beträgt die Häufigkeit des Auftretens von Komplikationen nach Spondylodesen 23%. Die Reoperationsrate wird mit bis zu 14,7% beschrieben (Guigui et al. 2004).

3.5.3.3. Dynamische Systeme

Die dynamischen Systeme haben zum Ziel, wie die Fusionsoperationen eine Stabilisierung des Segmentes zu erreichen, dies jedoch mit gleichzeitigem Erhalt einer Restbeweglichkeit im Segment zu kombinieren (Krämer et al. 2014). Durch den Erhalt der Restbeweglichkeit im Segment soll vor allem die Mehrbelastung der Nachbarsegmente verhindert werden (Schmoelz et al. 2006).

Es gibt zahlreiche Variationen dieser dynamischen Systeme (Krämer et al. 2014). Ziel des Systems kann sein, die Bandscheibe mittels einer Totalendoprothese vollständig zu ersetzen (Link 2002; Mayer et al. 2002). Teilprothesen (Nucleusersatz) sind Systeme, die darauf abzielen den Nucleus pulposus zu ersetzen, den Anulus fibrosus jedoch zu erhalten (Edeland 1981; Meakin et al. 2001; Korge et al. 2002).

Diese Systeme stellen Vorrichtungen dar, die durch reduzieren und kontrollieren der Segmentbewegung die Bandscheibe in Position halten (Freudiger et al. 1999; Stoll et al. 2002). Die postoperativen Ergebnisse der Totalendoprothesen sind mit denen der Fusionsoperationen vergleichbar (McAfee et al. 2005; Shedid et al. 2005; Berg et al. 2009; van den Eerenbeemt et al. 2010; Yajun et al. 2010). Im Gegensatz zu den Fusionsoperationen bleibt jedoch die Möglichkeit zur Bewegung im operierten Segment erhalten und die Höhe der Bandscheibe wird wieder hergestellt (Blumenthal et al. 2005; McAfee et al. 2005).

Die postoperativen Studien zeigen jedoch, dass durch die Mehrbelastung der Facettengelenke es auf lange Sicht zu einer Versteifung in den operierten Segmenten kommt (van Ooij et al. 2003; Putzier et al. 2006; Kim et al. 2010). Bei den Totalendoprothesen und auch bei den Teilprothesen kann es zu Komplikationen, wie Fusion der Wirbelkörper und Dislokation des Prothesenmaterials, kommen (Guder 2008).

3.5.3.4. Ersatz des Nucleus pulposus

Bei der operativen Versorgung eines Bandscheibenprolaps wird meist eine Entfernung des hervorgetretenen Nucleus pulposus Materials vorgenommen, wodurch es zu einer Reduzierung der physiologischen Bandscheibenhöhe kommt (Brinckmann und Grootenboer 1991). Im Anschluss an die Operation kommt es zu Einschränkungen in der biomechanischen Funktion des Nucleus pulposus, wodurch es zu weiteren Auswirkungen auf den Anulus fibrosus und auf die Endplatten kommt (Meakin und Hukins 2000).

Grundlagen

Die Implantate zum reinen Nucleus pulposus Ersatz sollen die Bandscheibenhöhe wiederherstellen, stabile Bewegung im Segment ermöglichen und die umliegenden Strukturen stabilisieren (Bao et al. 1996). Durch diese Anforderungen sollen die Implantate versuchen, die Anatomie und die Funktion der Bandscheibe wiederherzustellen und setzen gleichzeitig voraus, dass die Endplatten der Wirbel und der Anulus fibrosus unversehrt sind (Bao et al. 1996; Bao und Yuan 2002). Das erste Implantat für den Nucleusersatz stellte 1966 eine Stahlkugel nach Fernstrom dar (Fernstrom 1966; Krämer et al. 2014). Durch das Implantat nach Fernstrom kam es zu Komplikationen wie Lockerungen des Implantats und Einbrüchen in die Deck- und Bodenplatten der Wirbel (Bao und Yuan 2002; Di Martino et al. 2005).

Nachfolgend wurden Implantate entwickelt, die die Viskoelastizität des Nucleus pulposus nachahmen. Zum Beispiel werden sogenannte Hydrogele eingesetzt, also synthetische visköse Materialien, die den natürlichen Nucleus pulposus imitieren sollen (Thomas et al. 2003; Reitmaier et al. 2012). Sie bestehen aus dreidimensionalen Polymernetzwerken, die an- und abschwellen können und somit in der Lage sind, Wasser in Abhängigkeit von der jeweilig stattfindenden Belastung aufzunehmen und abgeben zu können (Thomas et al. 2003).

Eine dieser Nucleusprothesen stellt die Prothesis Disc Nucleus (PDN[®]) (Raymedica Inc. Bloomington) mit einer definierten Wasseraufnahmekapazität dar (Ray 2002). Das PDN[®]-Implantat besteht aus einem Hydrogel, umschlossen von einer Hülle aus Polyethylen (Ray 2002). Die Wasseraufnahmekapazität des Implantats ermöglicht es, die Bandscheibenhöhe zu erhalten - beziehungsweise wiederherzustellen - und die große Auflagefläche der Hülle verhindert Einbrüche in die Endplatten der angrenzenden Wirbel (Wilke et al. 2001; Ray 2002; Wilke et al. 2002). Weitere Implantate für den Ersatz des Nucleus pulposus bestehen aus flüssigen Polymeren wie beispielsweise Silikon oder Polyurethan, die nach Implantation in situ aushärten können (Bao und Yuan 2002; Di Martino et al. 2005; Boyd und Carter 2006). Vorteil dieser Implantate ist, dass sie durch ihren flüssigen Charakter ohne das Setzen eines großen Defekts in den Anulus fibrosus injiziert werden können (Bao und Yuan 2002; Di Martino et al. 2005; Boyd und Carter 2006).

Aktuell im Fokus der Forschung stehende Therapieansätze beschäftigen sich mit dem Regenerationspotential des Nucleus pulposus. Hierbei werden zum Beispiel Tissue Engineering-Implantate in Form von Gerüsten (Scaffolds) aus Kollagen verwendet (Wilke et al. 2006).

Da bei diesen Techniken der Defekt im Anulus fibrosus nicht verschlossen wird, kann es zu Reherniationsraten an den Defektstellen von bis zu 23% kommen (Barth et al. 2008a; Barth et al. 2008b; Lebow et al. 2011). Es können zwei verschiedene Typen der erneuten Herniation unterschieden werden (Ebeling et al. 1989; Laus et al. 1993); Die frühe Herniation, die innerhalb des ersten Jahres nach der Operation auftritt und hauptsächlich aus weiterem Bandscheibenmaterial besteht und die späte Herniation, die erst nach mehr als einem Jahr

nach der Operation auftritt und neben Bandscheibenmaterial auch Reparationsgewebe enthält (Laus et al. 1993).

3.5.3.5. Reparatur des Anulus fibrosus

Für den Erfolg der Methoden zum Ersatz des Nucleus pulposus spielt die funktionelle Wiederherstellung des Anulus fibrosus in Form von verschiedenen Verschlussmechanismen somit eine bedeutende Rolle (Bron et al. 2010; Li und Kong 2015; Sharifi et al. 2015). Nur ein intakter Anulus fibrosus kann den Druckverhältnissen innerhalb der Bandscheibe standhalten (Li und Kong 2015). Erste Techniken zum Verschluss des Anulus fibrosus wurden mit verschiedenen Naht- und Klebetechniken durchgeführt. Angewendete Nahttechniken zum Verschluss des Anulus fibrosus erreichten nicht genügend mechanische Stabilität (Ahlgren et al. 2000; Suh et al. 2015). Nahttechniken in Kombination mit Fibrin brachten zwar bessere Ergebnisse, erreichten jedoch keinen dauerhaften Verschluss des Anulus fibrosus (Heuer et al. 2008).

Weitere Verschlussmethoden wurden mit verschiedenen mechanischen Barrieren durchgeführt (Bron et al. 2010; Parker et al. 2016). Häufig wurden sie von Komplikationen in Form von Destruktion oder Deslokation des Implantats begleitet (Bron et al. 2010).

3.5.4. Regenerative Therapieansätze

Die regenerativen Methoden des Tissue Engineerings nutzen die Verwendung von Zellen oder Gerüsten (Scaffolds) oder eine Kombination (Stock und Vacanti 2001). Das Selbstheilungspotential des Anulus fibrosus ist gering (Melrose et al. 2007; Guterl et al. 2013). Jedoch konnten Henriksson et al. (2009) eine kontinuierliche aber geringe Zellproliferationsrate in der Bandscheibe feststellen.

Somit basieren auch die Methoden des Anulus fibrosus Tissue Engineering auf der Nutzung von verschiedenen Gerüsten und von Zellen zur Regeneration (Cho et al. 2013; Li und Kong 2015; Tavakoli 2017).

Um der ursprünglichen Matrix zu ähneln, bestehen diese Gerüste (Scaffolds) aus nativen oder synthetischen, biologisch abbaubaren Materialien (Le Visage et al. 2006; Li und Kong 2015). Die verschiedenen Scaffolds haben eine unterschiedliche Porosität und unterschiedliche Orientierung der Fasern und können zum Beispiel anhand ihrer Phasen in zwei Kategorien unterteilt werden (Li und Kong 2015). Sie können in Form einer einzelnen Einheit vorliegen oder aus zwei Phasen bestehen, die die äußere und innere Schicht des Anulus fibrosus simulieren (Li und Kong 2015).

Bowles et al. (2011) entwickelten eine vollständige Bandscheibe bestehend aus zwei Phasen: eine Phase aus Kollagen I, um den Anulus fibrosus, und eine zweite Phase aus Alginat, um den Nucleus pulposus zu simulieren. Am Kleintiermodell zeigt das Tissue Engineering zum kompletten Ersatz der Bandscheibe positive Ergebnisse (Bowles et al. 2011; Li und Kong 2015).

Mehrere Arbeiten untersuchten diese Scaffolds aus verschiedenen Biomaterialien auch in Kombination mit Zellen (Tsai et al. 2014; Colombini et al. 2015; Pirvu et al. 2015; Tavakoli 2017; Cruz et al. 2018; Ma et al. 2018). Die benötigten Anulus fibrosus Zellen können bei einer Operation chirurgisch gewonnen werden (Guterl et al. 2013). Häufig ist natives Gewebe des Anulus fibrosus jedoch nur als Quelle für Zellen verfügbar indem ein neuer Defekt gesetzt wird (Hondke et al. 2018).

Zellfreie regenerative Ansätze stellen somit ebenfalls einen interessanten Ansatz für die Forschung dar. In Form von beispielsweise dreidimensionalen Gerüsten sollen Biomaterialien den Defekt abdecken oder verschließen und so dem Gewebe Stabilität verleihen (Hondke et al. 2018). Gleichzeitig dienen die zellfreien Scaffolds den körpereigenen Zellen als Gerüst für die Geweberegeneration (Amaia et al. 2012; Hegewald et al. 2015; Sharifi et al. 2015; Hondke et al. 2018). Ziel ist, dass die Zellen aus der Umgebung in den Defekt einwandern, sich dort vermehren und extrazelluläre Matrix produzieren (Hondke et al. 2018).

Zellen lassen sich durch verschiedene Substanzen anlocken, die gewisse chemische Eigenschaften aufweisen (positive Chemotaxis). Die Wanderung der Zellen findet entlang eines Konzentrationsgradienten von diesen Lockstoffen, zum Beispiel sogenannten Chemokinen, statt (Baumgärtner und Gruber 2015). Chemokine sind eine Familie der chemotaktischen Zytokine (Hegewald et al. 2012).

Die Chemokin-vermittelte Migration von Zellen stellt einen weiteren regenerativen Ansatz zur Geweberegeneration an Defektgewebe dar (Ringe et al. 2007; Hegewald et al. 2012). Auch Anulus fibrosus Zellen lassen sich durch verschiedene Stoffe wie Chemokine stimulieren (Hegewald et al. 2012). Hegewald et al. (2012) detektierten Chemokinrezeptoren auf humanen Anulus fibrosus Zellen. Die Arbeitsgruppe zeigte, dass die Zellen sich durch Chemokine anlocken lassen und somit chemotaktische Mechanismen in der Regeneration von Defektgewebe eine Rolle spielen können (Hegewald et al. 2012).

Weitere Wachstumsfaktoren wie TGF- β (englisch: TGF-Transforming growth factor beta) und FGF-2 (englisch: fibroblast growth factor-2) konnten *in vitro* die Expression von Matrix Molekülen in humanen Anulus fibrosus Zellen stimulieren (Hegewald et al. 2013; Guillaume et al. 2014; Hondke et al. 2018).

Hondke et al. (2018) zeigten, dass unabhängig vom Degenerationsstatus des Gewebes, Anulus fibrosus Zellen ihr Potential zur Proliferation, zur Migration und für die Bildung extrazellulärer Matrix beibehalten.

Grundlagen

Diese Arbeit untersucht die Wirkung des Chemokins CCL25 und des plättchenreichen Plasma auf ovine Anulus fibrosus Zellen. Das Chemokin TECK, auch thymus expressed chemokine (TECK) genannt, ist Rezeptorligand für den Chemokinrezeptor CCR9 (Murphy et al. 2000).

Das in dieser Arbeit verwendete Chemokin CCL 25 zeigte im Versuch mit mesenchymalen Zellen, dass es in der Lage ist, diese dosisabhängig anzulocken (Stich et al. 2008; Binger et al. 2009; Ullah et al. 2013).

Das ebenfalls in dieser Arbeit verwendete plättchenreiche Plasma (englisch: platelet rich plasma; PRP), auch thrombozytenreiches Plasma genannt, ist eine autologe Thrombozytenkonzentration in einem kleinen Plasmavolumen, welches aus Vollblut gewonnen wird (Marx 2001).

In 3D-Zellkulturen konnte das plättchenreiche Plasma die Proliferation, die Migration und die Ausbildung von extrazellulärer Matrix von Anulus fibrosus Zellen induzieren (Akeda et al. 2006; Hondke et al. 2018).

Abschließend ist somit die Suche nach einem geeigneten Implantat, ob in Kombination mit Zellen oder zellfrei, zur Wiederherstellung der Integrität des Anulus fibrosus nicht abgeschlossen und bietet viele Möglichkeiten für weitere Forschungsansätze. Weitere Experimente, auch am Tiermodell, werden folgen.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich deshalb mit einem dieser weiteren Forschungsansätze - der Defektschließung mittels eines zellfreien Implantats in Kombination mit verschiedenen Wirkstoffgruppen - um exemplarisch die Auswirkungen eines Implantats auf die Anulus fibrosus Zellen des Schafs und das Schafsegment zu testen.

Da weitere Experimente am ovinen Tiermodell folgen werden, soll die vorliegende Arbeit zusätzlich untersuchen, ob die ovinen Anulus fibrosus Zellen sich durch verschiedene Stoffgruppen *in vitro* zur Migration induzieren lassen, aus der Umgebung in das Implantat einzuwandern, sich zu reproduzieren und extrazelluläre Matrix auszubilden.

4. Material und Methoden

4.1. *in vitro* Versuche: Chemotaxisassay und 3D-Zellkulturen

Für den *in vitro* Versuchsanteil wurden von fünf ovinen Spendertieren (unbekannter Herkunft) nach erfolgter Euthanasie aus Bandscheiben der Lendenwirbelregion Anulus fibrosus Zellen isoliert. Diese Anulus fibrosus Zellen wurden vermehrt und in Bezug auf ihr Migrationsverhalten bei Induzierung mit TECK sowie der Fähigkeit zur Bildung einer knorpelähnlichen extrazellulären Matrix in 3D-Zellkulturen untersucht (siehe Abbildung 2).

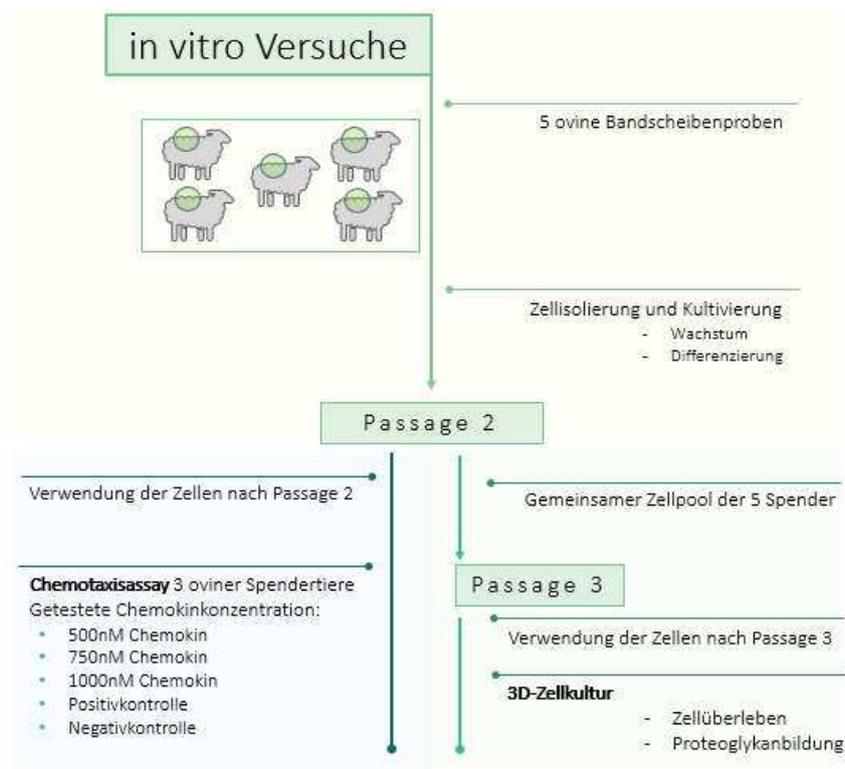


Abbildung 2: Fließschema über die Planung der *in vitro* Versuche

Die Arbeiten an den Proben wurden unter einer sterilen Werkbank durchgeführt. Die Inkubation der Zellkulturen fand im Brutschrank bei 37° C und 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit statt. Die Zentrifugation erfolgte stets bei 561 g (Schleuderziffer) für fünf Minuten. Abweichungen von diesen Angaben zur Zentrifugation werden im Text kenntlich gemacht. Als Medium wurde für die Kultivierung 500 ml Medium (DMEM, Dulbecco's Modified Eagle Medium mit stabilem Glutamin, 3,7 g/l NaHCO₃ und 1,0 g/l D-Glukose, FG0415, Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland) mit 10% ovinem Serum und mit 1% Penicillin/Streptomycin (Penicillin/Streptomycin, flüssig, 10.000 U/ml / 10.000 µg/ml, A2213, Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland) versetzt.

Alle Materialien wurden vor der Nutzung entweder im Autoklaven bei 120° C mit Wasserdampf sterilisiert oder waren sterile Einwegartikel.

4.2. Isolation der Anulus fibrosus Zellen

Die fünf Bandscheibenproben der Spendertiere wurden jeweils zu Beginn dreimalig mit PBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS)-Lösung ohne Ca²⁺, Mg²⁺, L1825, Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland) gewaschen. Die gewaschene Probe wurde im Anschluss in eine Petrischale überführt, mit PBS benetzt, Teile vom Anulus fibrosus abgeschnitten und mit einem Skalpell in circa 1 mm³ große Fragmente zerkleinert.

Die Enzyme Collagenase CLS II (Collagenase Typ II, CLS II, C 2-28, Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland), Collagenase P (Collagenase P, 11213865001, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) und Hyaluronidase (Hyaluronidase, H2126, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) wurden jeweils in Aliquot auf 3 ml Gesamtmenge gemischt. Diese 3 ml Enzym-Verdau-Lösung wurde mit 7 ml Medium in eine 10 ml Spritze aufgezogen und steril in eine Spinnerflasche (Spinnerflasche, 50 ml, WHEATON®, New Jersey, USA) gefiltert (Spritzenvorsatzfilter 0,22 µm, Whatman™ Maidstone, England). Dann wurden die Anulus fibrosus Fragmente mit Medium (20ml) aufgenommen und hinzugegeben (30 ml Gesamtvolumen).

Die bestückte Spinnerflasche wurde für den anschließenden Verdau auf einen Magnetrührer in den Brutschrank gestellt und zwölf Stunden inkubiert.

Nach Inkubation wurde die Zellsuspension mittels Zellsieb in ein Reaktionsgefäß überführt und zentrifugiert. Das nach dem Zentrifugieren vorliegende Zellpellet mit den korpuskularen Bestandteilen wurde in Medium resuspendiert und die Zellzahl mit Trypanblau-Methode in einer Neubauer Zählkammer bestimmt.

Bestimmung der Zellzahl in der Neubauer- Zählkammer

Mit der Trypanblau-Methode kann neben der Differenzierung von lebenden gegenüber toten Zellen, auch die Anzahl der Zellen bestimmt werden.

20 µl der Zellsuspension wurden mit 20 µl Trypanblau Lösung (Trypanblau, C.I. 23850, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) versetzt und gemischt. 10 µl dieser Zell-Trypanblau-Lösung wurden anschließend auf den Injektionsbereich der Zählkammer aufpipettiert. Die Suspension zog sich durch die Kapillarkraft in den Kammerbereich. Mit dem Mikroskop konnten die Zellen im Messbereich gezählt werden. Dieser Messbereich besteht aus vier Großquadraten mit je vier mal vier Kleinquadraten.

Um Zellen nicht doppelt zu zählen, wurden in jedem der Großquadrate nur Zellen gezählt, die mit vollem Umfang innerhalb der Begrenzung lagen oder auf einem senkrechten (linken) und einem waagerechten Rand lagen. Die Zellzahl der vier Quadrate wurde notiert und ein Mittelwert aus den vier Werten gebildet.

$$\text{Zellzahl} = A \cdot 2 \cdot V \cdot 10^4$$

A = Mittelwert der Zellen

V = Volumen der Zellsuspension

2 = Verdünnungsfaktor

10⁴ = Neubauer – Faktor

Zelldichte (Zellen/ml) \approx (Zellzahl/Zahl der Großquadrate) $\cdot 2 \cdot 10^4 \cdot \text{ml}^{-1}$

Tote Zellen konnten von lebenden Zellen durch die Färbung unterschieden werden, wobei tote Zellen den Farbstoff Trypanblau durch ihre permeable Membran aufnehmen und unter dem Mikroskop tiefblau gefärbt erscheinen. Die intakte Membran vitaler Zellen kann nicht durchdrungen werden, weshalb diese ungefärbt bleiben.

Die Zellen wurden im Anschluss in einer Zelldichte von 10.000 Zellen/cm² in Kulturflaschen ausgesät (Kulturflaschen, T75, Falcon™, Corning Incorporated, New York, USA), Medium hinzugegeben und inkubiert.

Wechsel des Nährmediums

Um eine Versorgung der Zellen über den gesamten Versuchsablauf zu gewährleisten, erfolgte alle zwei bis drei Tage ein Mediumwechsel.

4.3. Passagieren der Zellen

Die proliferierenden Zellen wurden bei einer Konfluenz von 80 bis 90% in neue Kulturgefäße passagiert. Zum Passagieren wurde aus den einzelnen Kulturgefäßen zuerst das Medium abgenommen, dann der entstandene Zellrasen einmalig mit PBS gewaschen und dieses wieder abgenommen. Um die Zellen abzulösen, wurde eine Trypsin-EDTA-Lösung (Trypsin-Ethylendiamintetraessigsäure, L 2143, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) hinzugegeben und anschließend bei 37° C für ca. fünf Minuten im Brutschrank inkubiert.

Die Kontrolle der hierdurch stattfindenden Ablösung der Zellen fand im Anschluss unter dem Mikroskop statt. Durch leichtes Klopfen mit der flachen Hand auf den Rand des Zellkulturgefäßes konnten noch adhärent vorliegende Zellen ebenfalls losgelöst werden. Die

Enzymreaktion wurde im Anschluss mit dem doppelten Volumen an Medium gestoppt und die entstandene Zellsuspension zur vollständigen Entfernung der Trypsin-EDTA Lösung zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend abgenommen und das vorliegende Zellpellet in neuem Medium resuspendiert.

Nach Zellzählung mittels Trypanblau wurden die Zellen mit einer Zelldichte von 5.000 Zellen/cm² in neue Kulturgefäße ausgesät. Die gewünschte Zelldichte wurde durch Zugabe von Medium eingestellt. Die Zellen wurden bis zur Passage zwei im Monolayer kultiviert.

4.4. Chemotaxisassay

4.4.1. Vorbereitung des Chemotaxisassays

Um eine Wirkung des humanen Chemokins CCL25 auf die ovinen Anulus fibrosus Zellen nachzuweisen, wurde ein Chemotaxisassay durchgeführt. Das Chemokin CCL25 (CC-Akronym für Cystein-Cystein chemokine ligand 25), auch TECK oder Thymus-Expressed Chemokine genannt, wurde in drei verschiedenen Konzentrationen mit den Anulus fibrosus Zellen dreier Spendertiere untersucht.

Chemotaxisplatten bestehen aus drei Teilen, einem unteren Kompartiment, einer aufliegenden permeablen Membran und einem darauf liegenden oberen Kompartiment.

Die gewünschten Konzentrationen des Chemokins TECK, die Positivkontrolle und die Negativkontrolle wurden in das untere Kompartiment aufgetragen. Nach Auflegen der Membran wurde die Zellsuspension im oberen Kompartiment aufgetragen. Hierdurch entstand über die Membran ein Konzentrationsgradient. Die auf die Membran gegebenen Zellen sollen entlang des Konzentrationsgefälles durch die Membran migrieren und im Anschluss dort nachgewiesen werden können.

Vorbereitung der verwendeten Medien

Neben den drei verschiedenen Konzentrationen des Chemokins mussten vorab auch zwei Diätmedien vorbereitet werden. Für das erste Diätmedium, im Weiteren Diätmedium 1 genannt, wurde DMEM Medium mit 0,5% BSA (Bovine Serum Albumin, Albumin aus Rinderserum, A4919, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) und 1% Penicillin/Streptomycin versetzt. Das zweite Diätmedium enthielt anstatt 0,5%, einen Anteil von 2,5% BSA. Um eine mögliche Wirkung chemotaktischer Bestandteile von ovinen Serum auszuschließen, wurde der Chemotaxisassay mit einem serumfreien Medium (Diätmedium) durchgeführt (Ringe et al. 2007).

Vorbereitung der Chemokinkonzentrationen

Hierzu wurde das Chemokin TECK zuerst in *Aqua destillata* (Aqua dest.) gelöst, dann mit PBS auf 1250nM verdünnt. Für die Einstellung der drei Konzentrationen 500nM, 750nM und 1000nM, wurde TECK mit Diätmedium 2 auf 1000nM und dann weiter mit Diätmedium 1 verdünnt.

Vorbereitung der Zellen

Für den Chemotaxisassay wurden die Zellen der einzelnen Spender am Ende der Passage zwei verwendet. Die Zellen wurden hierzu weiter passagiert (Durchführung siehe Abschnitt Passagieren der Zellen 7.3.).

Anschließend fand eine Bestimmung der Zellzahl mit Hilfe der Trypanblau-Methode statt und die gewünschte Zelldichte von 30.000 Zellen pro 40 µl wurde durch Zugabe von Medium eingestellt.

4.4.2. Ansatz des Chemotaxisassays

Für die isolierten Zellen jedes der drei ovinen Spendertiere (Donor 1 bis 3) erfolgte die Auftragung der Chemokine im Triplikat auf einer 96-Well Chemotaxisplatte (ChemoTx[®] Disposable Chemotaxis System, ChemoTx[®]106-8 Porengröße 8µm, Neuro Probe, Inc., Gaithersburg, USA). Diese 96-Well Chemotaxisplatte besteht aus einem unteren, einem oberen Kompartiment und einer zwischen den beiden Kompartimenten liegenden Membran. Für den jeweiligen Ansatz für die drei ovinen Spendertiere, wurden die drei Konzentrationen des verdünnten Chemokins TECK, serumhaltiges Kulturmedium (Positivkontrolle) und Diätmedium 1 (Negativkontrolle) je mit einem Volumen von 37,5µl, untereinander in die einzelnen Spalten des unteren Kompartiments der 96-Well Chemotaxisplatte aufgetragen. Anschließend wurde die Membran aufgelegt. Die Zellsuspension wurde im Anschluss im oberen Kompartiment in die jeweiligen Vertiefungen auf der Membran in einem Volumen von 40 µl aufgetragen, der Deckel aufgelegt und das System für 20 Stunden im Brutschrank inkubiert.

4.4.3. Fixierung und Hemacolor-Färbung der adhärennten Zellen

Zum Nachweise der migrierten Zellen wurde nach 20 Stunden eine Färbung mittels Hemacolor[®] (Hemacolor[®] Schnellfärbung von Blutaussstrichen, Färbeset für die Mikroskopie, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) durchgeführt.

Hierzu wurde das obere Kompartiment abgenommen, die Membran entnommen und die verbliebenen Reste der Zellsuspension abgenommen (siehe Abbildung 3).

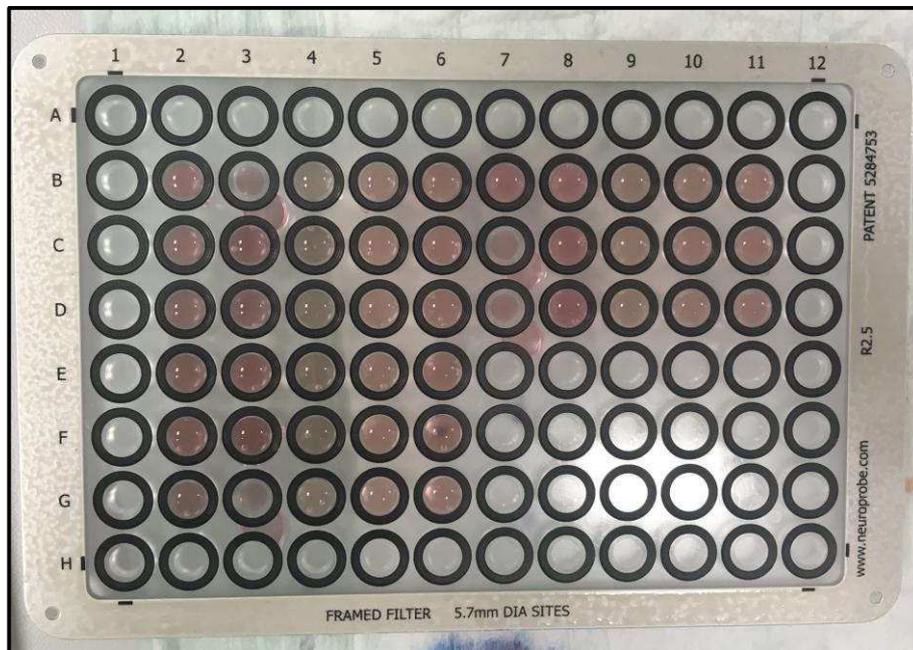


Abbildung 3: Permeable Polycarbonatmembran (Porendurchmesser 8 µm) des 96-Well Chemotaxisassay

Die Membran wurde zuerst für drei Minuten in Aceton (Acetone J.T.Baker®, Artikelnummer 8002, Avantor Performance Materials B.V., Deventer, Niederlande) fixiert.

Die Färbung der Membran fand für 1,5 Minuten im roten Hemacolor-Farbreagenz® und folgend für eine Minute im blauen Hemacolor-Farbreagenz® statt. In dieser Färbung stellte sich das Cytoplasma blau und die Zellkerne rotviolett dar. Vor der folgenden Fotodokumentation fand ein dreimaliger Waschvorgang mittels Pufferlösung (Puffer pH 7,2, 1.09468, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) statt. Unter dem Fluoreszenzmikroskop (Olympus CK41, Olympus Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland) wurden mittels Hellfeldfotografie zwei repräsentative Felder pro Well bei 40facher Vergrößerung fotografiert. Zur Auswertung wurden im Anschluss die rotviolett gefärbten Zellkerne der Zellen mit dem Programm "Image J" (Rasband, W.S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA) ausgezählt und die Zahl gewanderter Zellen (n_2 Bilder) auf die Gesamtfläche des Wells (Feldfläche) hochgerechnet.

Die gesamte Fläche des Wells (A_{Well}) beträgt 25,0 mm², die Fläche von 2 Bildern (A_2 Bilder) 4,7mm². Gleichung zur Berechnung der gewanderten Zellen pro Well:

$$n_{Well} = \frac{n_2 \text{ Bilder}}{A_2 \text{ Bilder}} \times A_{Well}$$

n_{Well} : gewanderte Zellen pro Well

$n_{2 \text{ Bilder}}$: gewanderte Zellen pro 2 Bildern

A_{Well} : Fläche des Wells (25mm²)

$A_{2 \text{ Bilder}}$: Fläche von 2 Bildern (4,7mm²)

4.5. Ovine Anulus fibrosus 3D-Zellkulturen

4.5.1. Vorbereitung der Zellen

Für die 3D-Zellkulturen wurden die ovinen Anulus fibrosus Zellen jedes Spenders nach Passage 2 im gemeinsamen Zellpool mit einer Zelldichte von 5.000 Zellen/cm² in frische Kulturgefäße ausgesät und weiter kultiviert. Die Implantate (resorbierbares Biopolymer, BioTissue AG, Zürich, Schweiz) wurden vorab auf eine Größe von jeweils 1,0 cm x 1,0 cm x 0,1 cm zugeschnitten.

Die Zellen des Zellpools wurden am Ende der Passage 3 verwendet. Die Zellzahl wurde mit der Trypanblau Methode bestimmt. Der Ansatz für die 3D-Zellkulturen wurde mit 20 Mio. Zellen für 10 Implantate durchgeführt. Pro Implantat wurden $1,86 \times 10^6$ Zellen genutzt ($18,88 \times 10^6$ Zellen für 10 Implantate) und in ein entsprechendes Volumen Medium aufgenommen und zentrifugiert. Das Pellet in DMEM-Medium und Fibrinogen (1 ml Kleberprotein-Lösung aus TISSEEL 2 ml, Lösung für Fibrinkleber, Baxter Deutschland GmbH, Unterschleißheim, Deutschland) resuspendiert.

4.5.2. Anlegen der 3D-Zellkulturen

Jedes der 10 Implantate wurde mit 110 µl Zell-Medium-Fibrin-Suspension beimpft ($1,88 \times 10^6$ Zellen). Es wurden vier verschiedene Ansätze erstellt (siehe Tabelle 1). Für Gruppe 1 (reines Biopolymer) wurde die Zellsuspension auf ein Implantat gegeben. Für die Gruppe 2 wurde ebenfalls die Zellsuspension auf ein Implantat gegeben, bei den während der anschließenden Kultivierung durchgeführten Medienwechseln wurde jedoch ein mit PRP (Pool aus 8-12 Spendern, Institut für Transfusionsmedizin, Deutsches Rotes Kreuz Blutspendedienst Nord-Ost gemeinnützige GmbH, Berlin, Deutschland) versetztes Medium verwendet. Die Implantate der Gruppen 3 und 4 wurden mit den Zellen beimpft, im Anschluss das partikuläre Freisetzungssystem für Arzneimittel in Form von Chitosan-Aligant Kugeln (CA-Kugeln) auf das Implantat gegeben und durch leichte Berührungen mit der Pipettenspitze gleichmäßig auf dem gesamten Implantat verteilt. Das partikuläre Freisetzungssystem für Arzneimittel wurde von

der Dr. Lerche KG, Berlin, Deutschland bereitgestellt. Das partikuläre Freisetzungssystem für Arzneimittel der Gruppe 3 (0 ng TECK) wurde hierbei nicht mit dem Chemokin TECK beladen. Das partikuläre Freisetzungssystem für Arzneimittel der Gruppe 4 (400ng TECK) wurde bei der Produktion vorab mit 400ng des Chemokins TECK beladen.

Gruppe	Ansatz
1	oAF-Zellen + Implantat (reines Biopolymer)
2	oAF-Zellen + Implantat + PRP im Kultivierungsmedium
3	oAF-Zellen + Implantat + partikuläres Freisetzungssystem für Arzneimittel (0ng TECK)
4	oAF-Zellen + Implantat + partikulären Freisetzungssystem für Arzneimittel mit verkapseltem Faktor (400ng TECK)

Tabelle 1: Anlegen verschiedener Ansätze der 3D-Zellkultur

Auf die Oberfläche der Implantate wurde jeweils ein im Verhältnis 1 zu 10 mit PBS verdünnter Thrombin-Tropfen aufgebracht. Ein zweiter Tropfen Thrombin wurde neben die Implantate gegeben und diese im Anschluss hineingelegt, sodass die Implantate vollständig mit Thrombin bedeckt waren. Die Implantate wurden im Anschluss für 30 Minuten im Brutschrank inkubiert. In die Vertiefungen zweier 6-Well-Platten (Falcon™ Platten für Gewebekulturen, Zellkulturplatte, 6 Vertiefungen, Falcon REF 353046, Corning Incorporated, New York, USA) wurde je ein Implantat gelegt und diese mit 4 ml Medium vollständig bedeckt.

Bis auf die Implantate der Gruppe 2 wurde Medium 1 verwendet, welches mit 10% ovinem Serum und mit 1% Penicillin/Streptomycin versetzt war. Für die Implantate der Gruppe 2 wurde Medium wie oben angefertigt, anstatt des ovinem Serums jedoch mit 5% PRP versetzt und für jeden Mediumwechsel frisch angesetzt. Ein Medienwechsel erfolgte alle zwei bis drei Tage. Die Implantate wurden bei jedem Medienwechsel einmal auf die andere Seite gedreht.

Nach Ansatz der Implantate wurden am Tag 7, 14 und 19 Untersuchungen der einzelnen Ansätze durchgeführt (siehe Tabelle 2).

Tag der Kultivierung	Untersuchungsmethode
d0	Anlegen der 3D-Kultur mit 10 Implantaten
d7	½ Implantat pro Gruppe für PCR-Analyse, 1 Teil des Implantates von der PCR-Probe für eine PI/FDA-Färbung
d14	½ Implantat pro Gruppe für PCR-Analyse, 1 Stück Implantat davon für PI/FDA-Färbung (Gruppe 3 & 4 für PI/FDA-Färbung ein ½ Implantat)
d19	½ Implantat pro Gruppe für PCR-Analyse, ¼ Implantat pro Gruppe für histologische Untersuchungen, ¼ Implantat pro Gruppe für PI/FDA-Färbung (Gruppe 3 & 4 für PI/FDA-Färbung und die histologischen Untersuchungen je ein ½ Implantat)

Tabelle 2: Ablaufplan der Implantat-Kultivierung

Am Tag 7 und Tag 14 der Kultivierung wurde je ein ½ Implantat pro Gruppe für eine PCR-Analyse entnommen. Ein Teil des ½ Implantates von der PCR-Probe wurde hierbei für eine PI/FDA-Färbung verwendet. Für Gruppe 3 und 4 wurde am Tag 14 für die PI/FDA-Färbung kein Teil von der PCR-Probe verwendet, sondern ein zusätzliches ½ Implantat entnommen. Am 19. Untersuchungstag wurde je ½ Implantat pro Gruppe für die PCR-Analyse, ein weiteres ¼ Implantat pro Gruppe für die histologischen Untersuchungen und ein weiteres ¼ Implantat pro Gruppe für PI/FDA-Färbung entnommen. Hier wurde für die Gruppe 3 und die Gruppe 4 für die PI/FDA-Färbung und die histologischen Untersuchungen je ein ½ Implantat genutzt. Die Proben für eine PCR-Analyse wurden zwar im Rahmen dieser Arbeit gewonnen, die Durchführung und Auswertung war jedoch Teil einer anderen Studie unserer Arbeitsgruppe. Die an den einzelnen Untersuchungstagen entnommene Menge Implantat pro Gruppe kann der Tabelle 3 entnommen werden.

Untersuchungstag	Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3	Gruppe 4
Tag 7	½	½	½	½
Tag 14	½	½	1	1
Tag 19	1	1	1 ½	1 ½

Tabelle 3: Implantatentnahme am jeweiligen Untersuchungstag

4.5.3. PI-FDA-Färbung

Die PI-FDA-Färbung dient der Bestimmung der Zellviabilität und somit der Unterscheidung zwischen lebenden und toten Zellen. Sie wird auch Tod/ Lebend-Fluoreszenz–Doppelfärbung

genannt und unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. Die Darstellung der Viabilität wird mit Propidiumjodid (PI) und Fluoresceindiacetat (FDA) durchgeführt.

Hierbei durchdringt FDA (Flourescindiacetat, Fluorescein diacetate, MERCK, F7378, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) die intakte Zellmembran der Anulus fibrosus Zellen und reichert sich aktiv in der vitalen Zelle an, wird dann von den in den Zellen vorhandenen Esterasen hydrolytisch gespalten und zu einem grünen Farbstoff verstoffwechselt. Der Fluoreszenzfarbstoff PI (Propidium iodide, MERCK, P4170, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) durchdringt hingegen passiv nur avitale Membranen und reagiert hier mit den vorhandenen Nukleinsäuren und zeigt dadurch ein rot fluoreszierendes Erscheinungsbild. Für die PI-FDA-Färbung fand an Tag 7, 14 und 19 eine Implantatentnahme pro Gruppe statt (siehe Tabelle 2,3). Die weiteren Arbeiten fanden soweit möglich im Dunkeln statt.

Arbeitslösungen

Zuerst mussten die zwei Färbelösungen hergestellt werden. Hierzu wurde für die Stammlösung PI mit einer Konzentration von 1 mg/ml in *Aqua destillata* (Aqua dest.) gelöst. Diese Stammlösung wurde bis zur Verwendung in der Färbung bei 4° C gekühlt und lichtgeschützt aufbewahrt. Für die Färbung wurde die Stammlösung PI in einer verdünnten Konzentration von 0,1 mg/ml Arbeitslösung PI verwendet, hierfür wurden 1ml Stammlösung PI in 9 ml PBS verdünnt.

Die Arbeitslösung mit einer Konzentration von 0,1 mg/ml PI wurde für die Färbung verwendet. Für die Herstellung der Stammlösung FDA wurde diese vorerst mit einer Konzentration von 1 mg/ml in Aceton gelöst und bei 4° C gekühlt und lichtgeschützt bis zur Verwendung gelagert. Für die Arbeitslösung mit einer verdünnten Endkonzentration von 3 µg/ml wurden 30 µl der Stammlösung FDA in 10 ml PBS diluiert (verdünnt).

Im ersten Schritt wurden die Proben dreimalig bei Raumtemperatur mit PBS gewaschen, um verbliebene Rückstände des Mediums zu entfernen.

Die Proben wurden anschließend mit 1,5 ml Arbeitslösung FDA bedeckt. Es folgte eine Inkubation im Dunkeln bei 37° C für 15 Minuten. Nach der Inkubation wurden die Proben erneut dreimalig mit PBS gewaschen.

Die Proben wurden dann mit 1,5 ml der Arbeitslösung PI bedeckt und bei Raumtemperatur für zwei Minuten inkubiert. Es folgte die Wiederholung des dreimaligen Waschvorganges mit PBS. Die gefärbten Proben wurden im Anschluss direkt unter dem Fluoreszenzmikroskop (Olympus CK41, Olympus Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland) mikroskopiert und fotografiert. PI stellt sich mit einem Absorptionsmaximum von 488 nm und einem Emissionsmaximum von 590 nm dar. Die PI Darstellung erfolgte deshalb mit dem Blaufilter (460-490 nm). FDA stellt

sich mit einem Absorptionsmaximum von 485 nm, einem Emissionsmaximum von 514 nm dar und wurde deshalb mit dem Grünfilter (480-550 nm) mikroskopiert.

4.5.4. Histologische Untersuchung der 3D-Zellkulturen

4.5.4.1. Aufarbeitung der Proben

Einbetten der Proben

Die Proben der 3D-Zellkulturen wurden für die histologische und immunhistologische Färbung an Tag 19 in Einbettmedium (Tissue-Tek® O.C.T.™ Compound, Sakura Finetek Europe B.V., 2408 AV Alphen aan den Rijn, Niederlande) als kleine Blöcke eingebettet und bis zur weiteren Verwendung in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bei -80° C gelagert. Das genutzte Einbettmedium besteht aus wasserlöslichen Harzen und Glykolen und dient als Einbettmedium beim Gefrierschneiden bei Temperaturen von -10° C oder tiefer. Beim Färbeprozess werden bei diesem Medium keine Rückstände auf den Objektträgern sichtbar, wodurch eine unerwünschte Hintergrundfärbung ausgeschlossen ist.

Schneiden der Proben

Zwei Stunden bevor die jeweilige Probe geschnitten wurde, wurde sie aus der -80° C Lagerung in -20° C Gefrierschrank umgelagert. Dadurch war gewährleistet, dass die Probe zum Zeitpunkt des Schneidens auf -20°C erwärmt ist.

Die Proben wurden mit Hilfe eines Kryostaten (Leica CM1900 Cryostat, Leica Microsystems Nussloch GmbH, Nussloch, Deutschland) zugeschnitten. Ein Kryostat ist ein Kühlgerät, in dem die schnelle, zuverlässige und sichere Erstellung exakter Gefrierschnitte möglich ist. Die Temperatur im Kryostat kann individuell gesteuert werden und wurde auf ca. -22° C eingestellt. Die Schnitte wurden in einer Dicke von 10 µm angefertigt und mit Hilfe einer Folie (Cryofilm type 2C, Dr. Tadafumi Kawamoto, Kanagawa, Japan) auf Objektträger (Objektträger, Kanten geschliffen, Langenbrinck GmbH, Emmendingen, Deutschland) gezogen. Von jeder der vier Proben der vier Gruppen wurden je 9 Schnitte erzeugt.

Lagerung

Nachdem die Schnitte getrocknet waren, wurden sie bis zur weiteren Verwendung (histologische Färbung) bei -20° C aufbewahrt.

4.5.5. Histologische Färbung der 3D-Zellkulturen

Es wurden zwei Färbungen zur Darstellung einzelner Strukturen in den Schnitten verwendet. Für die Färbungen wurden die Schnitte der 3D-Zellkulturen circa 30 Minuten vor Beginn aus dem Gefrierschrank entnommen und auf Raumtemperatur aufgewärmt. Jede dieser Färbungen wurde unter einem Abzug durchgeführt. Die verwendeten Färbelösungen wurden vor und nach der jeweiligen Nutzung filtriert.

4.5.6. Alcianblau 8GS-Färbung

Die Alcianblau 8GS-Färbung erlaubt den histochemischen Nachweis von knorpeltypischen, sauren, sulfatierten Proteoglykanen der Knorpelgrundsubstanz bei einem pH-Wert von 2,5. Alcianblau bindet sich hierbei elektrostatisch an die Säuregruppen der Glykosaminoglykane. Durch die Kernechtrot-Gegenfärbung erfolgte die Darstellung der Zellkerne rot (Mulisch und Welsch 1990; Oertel 1990).

Färbelösungen

200 ml Methanol (Methanol, 82762, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) wurden im Verhältnis 1 zu 1 mit 200 ml Aceton (Acetone J.T.Baker®, Artikelnummer 8002, Avantor Performance Materials B.V., Deventer, Niederlande) gemischt und bei -20° C bis zur Verwendung (Fixierung) aufbewahrt. Um eine 3%ige Essigsäure herzustellen, wurden zuerst 30 ml 99-100%ige Essigsäure mit 970 ml Aqua dest. gemischt. Für die Alcianblau 8GS Stammlösung wurden anschließend 5 g Alcianblau 8GS (Alcianblau 8GS, Katalognummer 3082.2, Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe, Deutschland) unter Rühren in 500 ml dieser 3%ige Essigsäure gelöst und dann filtriert. Für die benötigte Arbeitslösung wurde diese Stammlösung im Verhältnis 1:20 mit Essigsäure (3%ige) verdünnt.

Für die Kernechtrot Färbelösung wurden 5 g Aluminiumsulfat in 100 ml Aqua dest. gelöst und erhitzt, anschließend 0,1 g Kernechtrot (Nuclear Fast Red, N-8002, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) zugegeben und gerührt bis sich der Farbstoff gelöst hat. Die Lösung wurde im Anschluss abgekühlt und filtriert.

Fixierung

Die Schnitte der 3D-Zellkulturen wurden zuerst in 4% Formaldehyd-Lösung, die Bandscheibenschnitte (tierexperimenteller Versuchsteil) in Methanol/Aceton- Fixierungsmittel (im Verhältnis 1:1) für fünf Minuten fixiert.

Durchführung

Die benötigten Reagenzien wurden in verschiedene Färbeküvetten eingefüllt und die Färbung durchgeführt. Als erstes wurden die Schnitte auf den Objektträgern für drei Minuten in 3% Essigsäure gestellt und anschließend für 30 Minuten mit der Alcianblau Färbelösung gefärbt. Danach wurden die Objektträger in 3% Essigsäure für fünf Minuten gewaschen und zur Entfernung des überschüssigen Farbstoffes in Aqua dest. gespült.

Zur Rotfärbung der Zellkerne (Gegenfärbung) wurden die Objektträger in Kernechtrot für vier Minuten weiter gefärbt. Im Anschluss wurde der Objektträger mit Aqua dest. erneut gespült, über fünf Minuten in 96% Ethanol entwässert, über weitere fünf Minuten in absolutem Ethanol (100%). Letztlich wurde das Ethanol in Roti[®]-Histol (Roti[®]-Histol für die Histologie, Artikelnummer: 6640, Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe, Deutschland) für zwei Minuten entfernt.

Eindecken

Da die hergestellten Schnitte beim Schneiden am Kryostaten mit Hilfe einer Folie auf die Objektträger gezogen wurden, mussten diese Folien vor dem Eindecken mit einem Skalpell vom Objektträger geschnitten werden. Die Schnitte auf den jeweiligen Folien wurden im Anschluss mit Hilfe von zwei Tropfen klarem Eindeckmedium (Vitro-Clud[®], R. Langenbrinck GmbH, Emmendingen, Deutschland) auf einen neuen Objektträger gegeben. Die Folie zeigte dabei mit dem Schnitt nach oben, also vom Objektträger weg. Es wurden zwei weitere Tropfen Eindeckmedium aufgetragen und ein luftblasenfreies Eindecken mit einem Deckgläschen.

4.5.7. Safranin-O-Färbung

Die Safranin-O-Lichtgrün-Färbung ist eine zur Knorpeldarstellung verwendete Färbung. Die Farbstoffe Safranin-O und Lichtgrün erstellen in Kombination ein gut differenziertes Bild des Knorpelmechanismus. Hierbei zeigt die Färbung den Proteoglykangehalt rot an. Ist der Proteoglykangehalt leicht reduziert, erscheint die Färbung hell-orange. Bei einem stark reduzierten Gehalt ist sie weiß und bei fehlenden Proteoglykanen blau/blaugrün (Mulisch und Welsch 1990).

Färbelösungen

Für die 0,7% Safranin O-Färbelösung (Safranin O, S8884, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) wurde zuerst 1 g Safranin O unter dem Abzug abgewogen, anschließend in 100 ml 100% Ethanol und 50 ml Aqua dest. gelöst.

Für die Fastgreen-Färbelösung wurden 0,4 g Fastgreen (Fast Green FCF, F7258, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) unter dem Abzug abgewogen, in 200 ml Aqua dest. und 600 µl reiner Essigsäure (100%ige Essigsäure, 71251, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) gelöst.

Fixierung

Bei der Safranin-O-Färbelösung fand vorab keine Fixierung statt.

Durchführung

Nachdem die Schnitte 30 Minuten bei Raumtemperatur aufgetaut wurden, fand eine erste Spülung mittels 92% Ethanol für fünf Minuten statt. Anschließend wurde die Färbung der Proteoglykane mit der 0,7% Safranin O-Färbelösung durchgeführt. Hierzu wurden die Schnitte für 30 Minuten in der Lösung gefärbt und anschließend vier bis fünf Mal mit Leitungswasser, um Farbreste zu entfernen, gespült. Zur grünen Färbung der weiteren Zellsubstanzen wurden die Objektträger für eine Minute in 0,2% Fastgreen gestellt und dann wieder vier bis fünf Mal mit Leitungswasser gespült. Auf das Entwässern über fünf Minuten in 96% Isopropanol und über weitere fünf Minuten in absolutem Isopropanol (100%) folgte letztlich ein Entfernen des Ethanols mit Orangenterpene. Das Eindecken erfolgt analog dem der Alcianblau 8GS - Färbung (siehe 7.5.6. Abschnitt Durchführung der Alcianblau 8GS- Färbung).

Eindecken

(siehe 4.5.6 Abschnitt Durchführung der Alcianblau 8GS- Färbung).

4.6. *in vivo* Versuch

Nach dem Abschluss des Vorversuchs fand der *in vivo* Anteil des Versuchs in der tierexperimentellen Einrichtung der Charité am Campus Virchow-Klinikum statt.

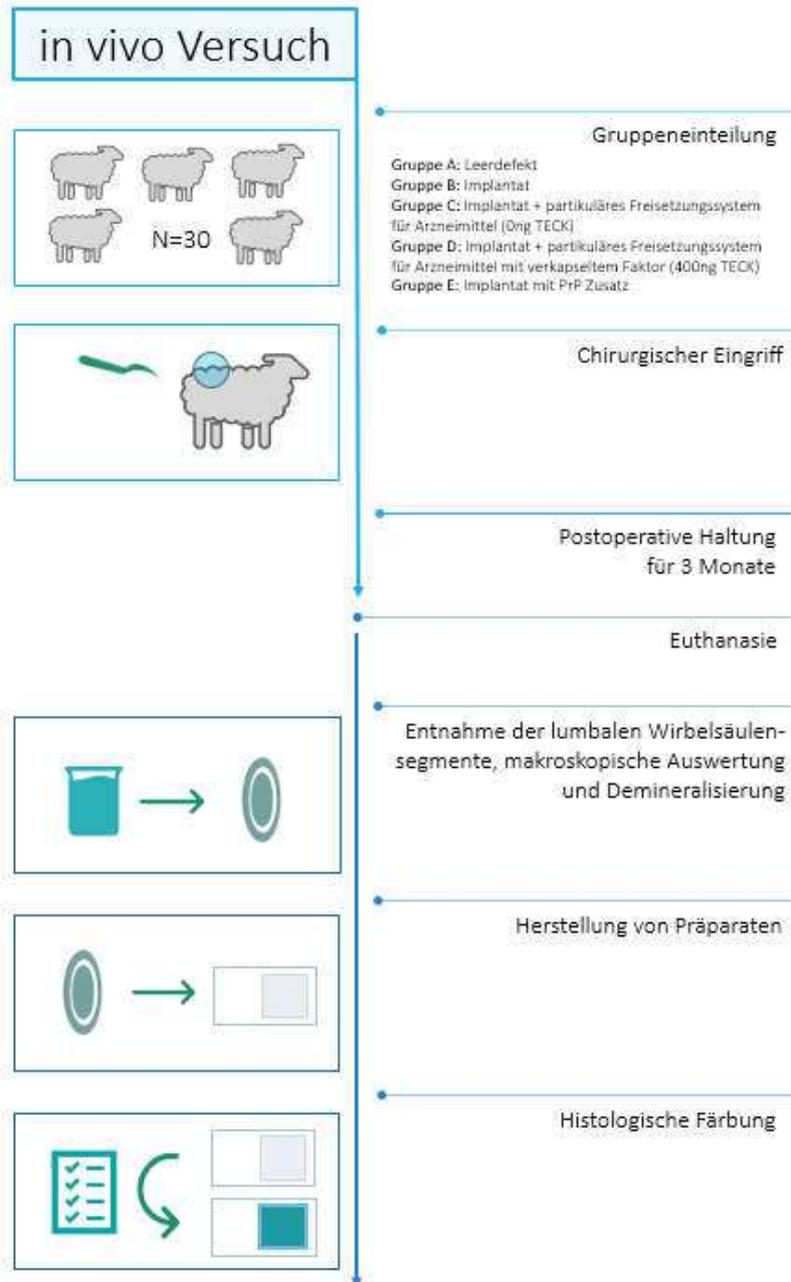


Abbildung 4: Ablaufschema über die Planung des Tierversuchs

4.6.1. Versuchstiere

Es wurden dreißig reinrassige, mindestens 5-jährige, weibliche Merinofleischschafe aus dem gleichen Herkunftsbetrieb aus einer Freilandhaltung verwendet, um Unruhen und Rangordnungskämpfe innerhalb der Versuchsgruppen zu vermeiden.

Im Herkunftsbetrieb fand eine Untersuchung der Tiere auf ihren Gesundheitsstatus und eine Ausschlussuntersuchung auf eine eventuelle Trächtigkeit statt, um sicher zu stellen, dass nur gesunde und nicht trüchtige Tiere den Transport antraten. Die Tiere wurden zum Ausschluss einer Trächtigkeit neben dieser Untersuchung die letzten drei Monate ohne männliche Tiere gehalten.

Die Tiere hatten ein durchschnittliches Körpergewicht von 71,43 kg (63,00 kg bis 83,00 kg) und wurden mindestens eine Woche vor dem jeweiligen Operationstermin zur tierexperimentellen Einrichtung der Charité am Campus Virchow-Klinikum transportiert und dort eingestallt. Der Transport fand in Gruppen von je sechs Tieren statt.

Die Versuchstiere wurden vor der Operation weiter in ihren Kleingruppen von sechs Tieren auf Einstreu aus Stroh und Spänen gehalten. Die Einstreu wurde zweimal pro Woche während des Aufenthalts in der tierexperimentellen Einrichtung gewechselt. Die Tiere erhielten ad libitum Zugang zu Heu und Wasser und zusätzlich Saftfutter wie Äpfel und Mohrrüben und geringe Mengen pelletiertes Kraftfutter.

Während des Aufenthalts in der tierexperimentellen Abteilung der Charité fand eine tägliche Kontrolle und Dokumentation des Kot- und Harnabsatzes statt. Die Körpertemperatur wurde wöchentlich gemessen und das Körpergewicht erfasst, um frühzeitig einen Hinweis auf eine Allgemeinerkrankung zu bekommen.

Zwei Wochen nach der Operation kamen die Tiere für drei Monate in eine Freilandhaltung. Hier erhielten die Tiere auf der Weide zusätzlich ad libitum Zugang zu Heu und hatten jederzeit freien Zugang zu Frischwasser.

Das Versuchsvorhaben wurde beim Landesamt für Gesundheit und Soziales unter der Nummer G 0093/16 genehmigt und registriert. Das Vorhaben wurde mit Mitteln des Bundesministerium für Bildung und Forschung unter dem Förderkennzeichen 13N13437 gefördert.

4.6.2. Gruppeneinteilung

Die Versuchstiere wurden in fünf Gruppen à sechs Tiere unterteilt. Die Auswahl in welche dieser fünf Gruppen ein Tier eingeteilt wurde, fand randomisiert statt. Die Gruppen wurden mit den Großbuchstaben A-E bezeichnet.

Bei der jeweiligen Versuchstiergruppe wurde unterschieden, ob nur ein Defekt in den Anulus fibrosus der Bandscheibe zwischen Lendenwirbel 4 und Lendenwirbel 5 (L4/L5) gesetzt wurde (Leerdefekt) oder ein Verschluss mittels eines Implantats (resorbierbares Biopolymer, BioTissue AG, Zürich, Schweiz) und eines weiteren Zusatzes stattfand.

Gruppenname	Angewandte Methode	Anzahl der Tiere
A	Leerdefekt (Kontrollgruppe), ohne Substitution	6
B	Implantat ohne Zusatz	6
C	Implantat + partikuläres Freisetzungssystem für Arzneimittel	6
D	Implantat + partikuläres Freisetzungssystem für Arzneimittel mit verkapseltem Faktor TECK (CCL25)	6
E	Implantat + plättchenreichem Plasma (PRP) - Zusatz	6

Tabelle 4: Einteilung der Versuchstiergruppen (A-E)

4.6.3. Versuchstiergruppen

4.6.3.1. Gruppe A: Leerdefekt

Bei der **Gruppe A** wurde operativ ein Defekt in den Anulus fibrosus gesetzt. Dieser wurde nicht mit einem Implantat verschlossen. Diese Gruppe wird im Folgenden als "Leerdefekt" bezeichnet.

Die Leerdefektgruppe diente der Überprüfung der körpereigenen Reaktions- und Regenerationsmechanismen auf die Manipulation an der Bandscheibe.

4.6.3.2. Gruppe B: Implantat ohne Zusatz

Bei der **Gruppe B** wurde der Defekt in den Anulus fibrosus gesetzt und im Anschluss mit dem reinen Implantat gedeckt, um eine Wirkung des Implantats ohne Zusätze bestimmen zu können.

4.6.3.3. Gruppe C: Implantat mit partikulärem Freisetzungssystem für Arzneimittel

Bei **Gruppe C** wurde ein Defekt in den Anulus fibrosus gesetzt, der mit einem Implantat mit einem partikulären Freisetzungssystem für Arzneimittel gedeckt wurde. Hierdurch sollte ein Einfluss des partikulären Freisetzungssystems für Arzneimittel auf die Regeneration des Anulus fibrosus ausgeschlossen werden. Die Seite des Implantates, die nicht das partikuläre

Freisetzungssystem für Arzneimittel trug, wurde mit einem schwarzen Permanentmarker (edding® Permanentmarker 3000, Farbe schwarz, edding Vertrieb GmbH, Wunstorf, Deutschland) in einer der Ecken markiert. Durch diese Markierung war es für den Chirurgen bei der Operation ersichtlich wie die Befestigung vorgenommen werden muss. Hierdurch wurde gewährleistet, dass bei der Befestigung des Implantats die beladene Oberfläche des Implantats in Richtung des Defekts befestigt wurde und so das partikuläre Freisetzungssystem für Arzneimittel auf der Defektoberfläche auflag.

4.6.3.4. Gruppe D: Implantat mit partikulärem Freisetzungssystem für Arzneimittel mit verkapseltem Faktor TECK

In **Gruppe D** wurde ein Defekt in den Anulus fibrosus gesetzt und anschließend mit dem Implantat mit dem partikulären Freisetzungssystem gedeckt. Vorab wurde dieses partikuläre Freisetzungssystem für Arzneimittel mit dem Faktor TECK (CCL25) beladen. Die Seite des Implantates die nicht das partikuläre Freisetzungssystem für Arzneimittel trug, wurde vorab ebenfalls markiert (siehe 4.6.3.3 Gruppe C: Implantat mit partikulärem Freisetzungssystem für Arzneimittel).

4.6.3.5. Gruppe E: Implantat mit PRP- Zusatz

In der **Gruppe E** wurde den Tieren ein Defekt in den Anulus fibrosus gesetzt und mit dem Implantat mit einem Plasmakonzentrat gedeckt. Dieses Plasmakonzentrat, auch plättchenreiches Plasma genannt, ist eine körpereigene Quelle für Wachstums- und Differenzierungsfaktoren.

4.7. Chirurgischer Eingriff

4.7.1. Vorbereitung der Tiere und Narkoseeinleitung

In Vorbereitung auf die Operation fand zwölf Stunden prä operationem keine Fütterung mehr statt. Dies diente hauptsächlich dem Zweck, dass während der Operation ein Übertritt von Mageninhalt in den Rachen und damit die Gefahr einer Aspirationspneumonie verringert wurde. Frischwasser stand den Tieren bis zum Beginn der Operation weiterhin über eine Selbsttränke zur Verfügung.

Die Tiere wurden vor der Operation in der "Sitzstellung" fixiert.

Eine circa 4 cm x 3 cm große Stelle an der Oberseite eines Ohres wurde geschoren und desinfiziert. Nach Stauung am Grund des Ohres mittels umschließenden Handgriff wurde ein

venöser Zugang in eine sichtbar hervortretende Ohrvene gelegt. Hierfür wurde eine Venenverweilkanüle (Vasofix® Safety Braunüle®, 1.1 x 33mm, G20, rosa, B. Braun Petzold, Melsungen, Deutschland) verwendet, die bei korrekter Lage mittels Klebeband am Ohr fixiert und gesichert wurde. Der korrekte Sitz der Venenverweilkanüle wurde mittels 5 ml NaCl-Lösung (Isotonische Kochsalzlösung 0,9%, B. Braun Melsungen AG, Deutschland) getestet. Die Narkose wurde mit 10-15 mg/kg Thiopental (THIOPENTAL®, 500 mg Pulver zur Herstellung einer Injektionslösung, Wirkstoff: Thiopental-Natrium und Natriumkarbonat, Rotexmedica GmbH, Trittau, Deutschland) intravenös über den Zugang eingeleitet. Anschließend wurden die Reflexe des Tieres überprüft und bei ausreichender Narkosetiefe eine Intubation mit einem neun Millimeter \varnothing Tubus (Hi-Contour Oral/Nasal Tracheal Tube Cuffed Murphy Eye, 9.0 mm I.D., 12.1 mm O.D. 33.0 mm, Mallinckrodt™, Covidien™ IIc, Mansfield, USA) vorgenommen. Die Intubation erfolgt mit Hilfe eines Führungsstabs und eines Laryngoskops. Der Tubus wurde im Anschluss auf seine korrekte Lage überprüft, mit Hilfe einer mit Luft gefüllten Spritze geblockt und dann am Maul des Tieres befestigt. Den Tieren wurde außerdem eine Magen-Schlund-Sonde geschoben, um ein Aufgasen des Vormagensystems zu verhindern. Die Magen-Schlund-Sonde wurde ebenfalls auf ihren korrekten Sitz überprüft und das Ende zum Ablauf in einen leeren Eimer gelegt. Die Tiere wurden dann mit Hilfe einer Transportliege in den Operationssaal gebracht.

4.7.2. Narkose und Lagerung

Nach Ankunft im Operationssaal erfolgte auf der Transportliege der Anschluss an das Inhalationsnarkosegerät (Dräger Cato, Type M32040, Variante 230/7A/50Hz, Dräger Medizintechnik GmbH, Lübeck, Deutschland) über den Trachealtubus. Über das Narkosegerät wurde ein Inhalationsnarkotikum (Forene®, 100%(V/V) Flüssigkeit zur Herstellung eines Dampfes zur Inhalation, Wirkstoff: Isofluran, 250 ml, Inhaber der Zulassung: AbbVie Deutschland GmbH & Co. KG, Ludwigshafen, Deutschland, Hersteller: Aesica Queenborough Limited, Queenborough, England) unter Zugabe von Sauerstoff zugeführt. Die Konzentration des Inhalationsnarkotikums wurde während der Anflutung auf 5 Vol.% eingestellt und in der Erhaltung während der OP mit 1,5 Vol.% fortgeführt. Als Analgetikum wurde den Tieren 2 mg/kg Rimadyl (RIMADYL®, Carprofen, Rind 50 mg/ml, Injektionslösung für Rinder, Zoetis Deutschland GmbH, Berlin, Deutschland) s.c. injiziert. Während der Operation erhielten die Tiere außerdem alle 30 Minuten Fentanyl 0,02 mg/kg (FENTANYL 0.5MG ROTEXMEDICA, 0,5 mg/10ml, Fentanylcitrat, Rotexmedica GmbH Arzneimittelwerk, Trittau, Deutschland) langsam i.v. injiziert.

Ein Monitoring-System (Dräger Sulla 8000V, Dräger Medizintechnik GmbH, Lübeck, Deutschland) zeigte während des Operationsverlaufes die Vitalparameter des Tieres und die Konzentration des Isofluranes in der Ausatemluft an. Die Körpertemperatur wurde halbstündlich mit einem Digitalthermometer (Digitalthermometer PRT1000, Braun GmbH, Kronberg, Deutschland) rektal gemessen und in einem OP-Protokoll dokumentiert.

Die Anästhesiegase wurden ebenfalls über ein Monitoringssystem überwacht (NGM1000®, Optimales Monitoring von Anästhesiegasen, Fritz Stephan GmbH, Medizintechnik, Gackenbach, Deutschland).

Die Tiere erhielten während der Operation über den intravenösen Zugang eine Elektrolytinfusionslösung (Sterofundin® ISO Infusionslösung, 500 ml, B. Braun Petzold, Melsungen, Deutschland).

Die Tiere erhielten ein Antibiotikum (5 g Unacid®, Penicillin-Derivat/ Betalaktamase-Inhibitor; 3 g Pulver zur Herstellung einer Infusionslösung, Pfizer Pharma, Berlin, Deutschland) und 2,5 mg/kg eines weiteren Antibiotikums (Baytril®, Enrofloxacin, 100mg/ml, Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Deutschland).

4.7.3. Vorbereitung des Operationsfeldes

Die Tiere wurden auf der Transportliege in linker Seitenlage für die Operation vorbereitet. In einem Bereich kaudal vom Beckenkamm bis nach kranial zur kaudalen Rippengrenze und dorsal von den Processus spinosi bis nach ventral auf einer nach kranial verlängerten Linie auf Höhe des Knies wurde das Fell geschoren. Im Anschluss wurde von der Wirbelsäule bauchwärts in einer Größe von ca. 40 cm x 25 cm mit einem alkoholischen Hautdesinfektionsmittel (Braunoderm®–Hautdesinfektion mit einer Kombination aus Alkohol und PVP-Iod, B. Braun Petzold, Melsungen, Deutschland) desinfiziert.

An den Vorderbeinen wurde, distal der Vorderfußwurzelgelenke, beidseits an den Mittelfußknochen geschoren, um eine Kontaktfläche für die analgetischen Pflaster zu erhalten (palmar, dorsal und beidseits lateral).

Das Tier wurde dann auf den Operationstisch verlagert, in linker Seitenlage fixiert und die Gliedmaßen unterpolstert.

Das vorbereitete Operationsfeld wurde mit einer doppelten Schicht aus sterilen Tüchern abgedeckt und vor der zweiten Schicht steriler, selbstaftender Tücher, nochmals mit Hilfe von sterilen Tupfern und alkoholischem Hautdesinfektionsmittel desinfiziert.

4.8. Operation

4.8.1. Chirurgischer Zugang

Als chirurgischer Zugang wurde ein Hautschnitt 2 cm rechts, lateral und parallel zu den Processus transversi (Querfortsätze) der Wirbelkörper, beginnend von kranial des rechten Beckenkamms, 10 cm nach kranial in Richtung kaudaler Rippengrenze gewählt. Die Durchtrennung der Hautschichten erfolgte mit Hilfe eines Skalpell (Surgical Blade, Feather®, Chirurgische Klinge, stainless steel, Figur 21, FEATHER® Safety Razor Co. Ltd., Köln, Deutschland) (siehe Abbildung 5).



Abbildung 5: Operationssitus: Beginn des Hautschnitts

Die weitere Präparation des subkutanen Gewebes erfolgte mit Hilfe eines monopolaren Elektrokauters. Hierdurch wurde neben der Schnittführung auch die direkte Koagulation der beim Schneiden durchtrennten Blutgefäße ermöglicht (siehe Abbildung 6).

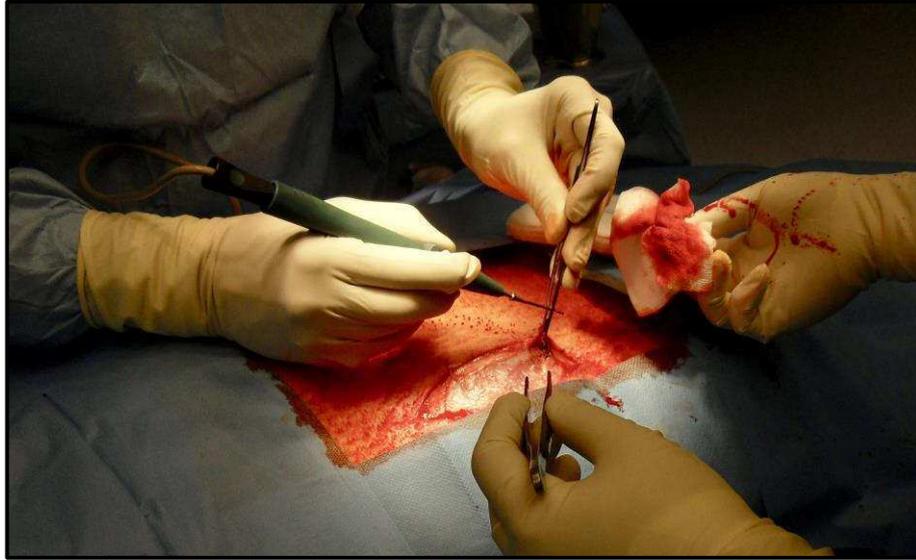


Abbildung 6: Operationssitus: Koagulation eines Gefäßes während der Präparation

Die Operationswunde wurde mit Hilfe eines Wundspreizers (Wundspreizer nach Weitlaner, Länge: 20 cm mit 2 x 4 Zähnen, 20 mm, stumpf) für die weitere Präparation fixiert.

Es folgte eine stumpfe Präparation der lateralen Anteile der abdominalen Wandmuskulatur, die in diesem Bereich eine eher fettige Fascialschicht darstellt, mittels Tupfer und behandschuhter Hand.

Durch die weitere longitudinale Teilung der thoracolumbalen Faszie von ihrer Aufhängung an den transversalen Processus, erhielt man Zugang zum retroperitonealen Raum. Durch diese longitudinale Teilung der Faszie ist es möglich gewesen, nur eine minimale Zerreißung des Peritoneums zu verursachen. Diese Präparation wurde fortgeführt bis der M. quadratus lumborum und der M. iliopsoas sichtbar wurden. Der M. iliopsoas setzt sich aus dem Lendenteil, M. psoas major und dem Darmbeinteil, M. iliacus zusammen (Salomon et al. 2008). Durch Ablösen des Peritoneums von der abdominalen Wandmuskulatur erhielt man eine ventrolaterale Ansicht auf die Wirbelkörper L4/L5 und die dazwischenliegende Bandscheibe. Mit Hilfe von einem oder zwei Hohmann-Haken (Hohmann Knochenheber, Länge: 29 cm, Arbeitsende: 33mm) konnte die Operationsassistentz den abdominalen Inhalt in Richtung ventraler Bauchwand weghalten und dadurch Arbeitsraum und Sicht für die folgende Manipulation an der Bandscheibe schaffen (siehe Abbildung 7).

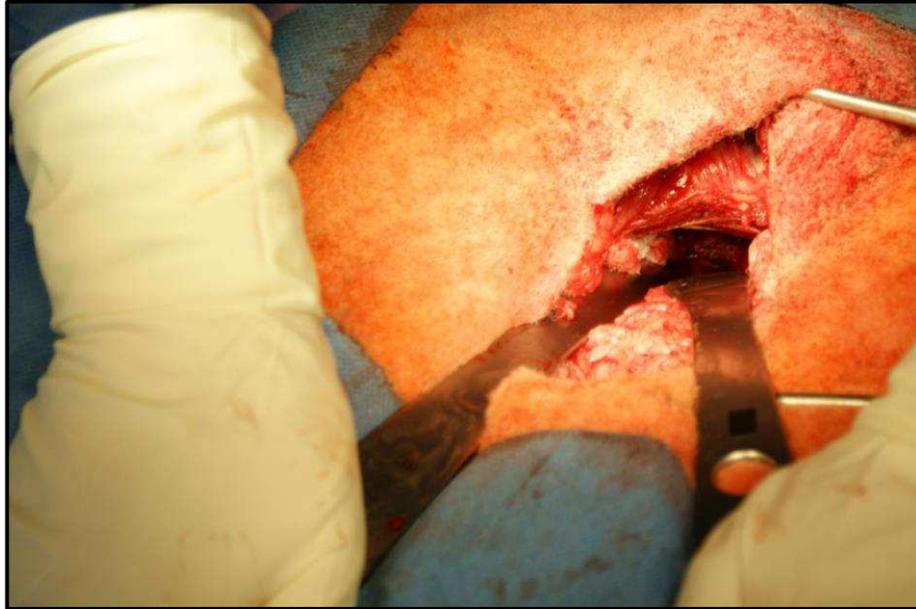


Abbildung 7: Operationssitus: Assistenz hält mit Hilfe von zwei Homann-Haken den abdominalen Inhalt in Richtung Bauchraum weg

4.8.2. Manipulation der Bandscheibe und Entnahme des Bandscheibenmaterials (Leerdefekt)

Die Manipulation an der Bandscheibe wurden mit einem Skalpell (Surgical Blade, Feather[®], Chirurgische Klinge, stainless steel, Figur 15, FEATHER[®] Safety Razor Co. Ltd., Köln, Deutschland) vorgenommen.

Da Bandscheiben eine konvexe Wölbung aufweisen, konnten sie vom Chirurgen gut palpatorisch und optisch gegenüber den kranial und kaudal angrenzenden, konkaven Wirbelkörpern abgegrenzt werden.

Der Defekt wurde in einer Größe von circa 3,5 mm x 3,5 mm mit Skalpell und Pinzette in den Anulus fibrosus gesetzt. Je nach Versuchstiergruppe wurde nur ein Defekt (Gruppe A, Leerdefekt) gesetzt oder anschließend der Defekt mittels eines Implantats verschlossen.

4.8.3. Defektdeckung: Einbringen und Befestigen des Implantats

Die Befestigung fand mittels vier Fäden an jeder Ecke des viereckigen 8,0 mm x 8,0 mm x 1,0 mm des Implantats statt.

Hierbei wurde ein resorbierbares Nahtgut (Vicryl TM Plus Ethicon[®], 3-0 SH plus, 26mm 1/2c, 70cm, Johnson & Johnson Medical GmbH, Norderstedt, Deutschland) verwendet.

Ab dem dritten operierten Tier wurde in der dorsokraniellen Ecke des Implantats das resorbierbare Nahtgut durch ein nicht resorbierbares Nahtgut (Ethilon *II TM Ethicon®, 3-0, 24mm 3/8c, 75cm, Johnson & Johnson Medical GmbH, Norderstedt, Deutschland) ersetzt, um eine Markierung für den postoperativen Verlauf zu setzen. In der Gruppe A (Leerdeckel) wurde in der dorsokraniellen Ecke des gesetzten Defektes das nicht resorbierbare Nahtgut befestigt, um auch bei den Tieren ohne Implantat die Defektstelle wiederzufinden.

Vor dem Einbringen des Implantats wurden die Fäden an den vier gewünschten Fixationspunkten um den gesetzten Bandscheibendefekt herum eingebracht und bis zur Hälfte der Fadenlänge durchgezogen (Abbildung 8).

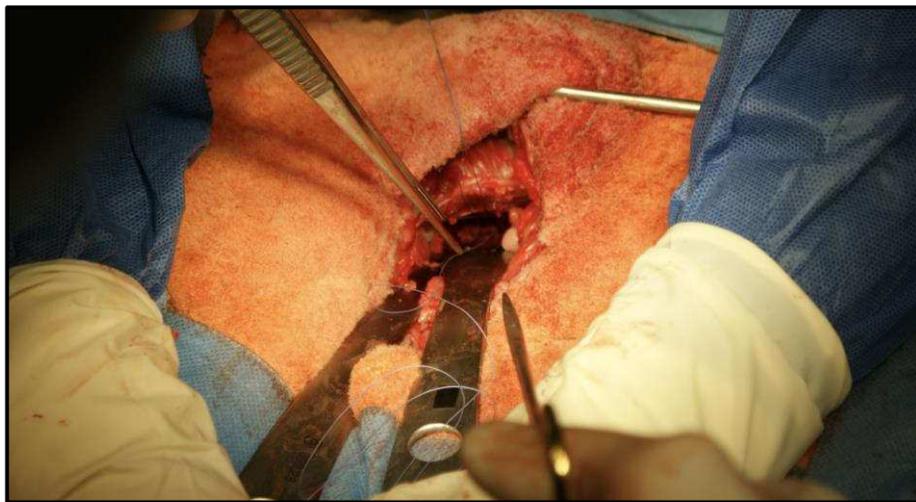


Abbildung 8: Operationssitus: Durchführung der Befestigung des zweiten Fadens

Die beiden Fadenenden wurden dann mithilfe von Präparierklemmen fixiert. Dies diente einerseits der jeweiligen Zuordnung von Fadenende zu Nadelende und zusätzlich zur Verhinderung eines Durchrutschens der Fäden bei weiterer Befestigung der anderen drei Fäden. Anschließend wurde mit der Befestigung am Implantat mit dem kraniodorsalen Faden begonnen. Das Nadelende des Fadens wurde an einer der vier Ecken durch das Implantat gestochen und wieder mit dem anderen Ende des zugehörigen Fadens mit Hilfe einer Präparierklemme fixiert.

Dies wurde ebenfalls mit den drei weiteren Fäden an den anderen Ecken des Implantats fortgeführt, sodass das Implantat nun an den Ecken auf den Fäden "aufgefädelt" außerhalb der Operationswunde vorlag (siehe Abbildung 9 und Abbildung 10).

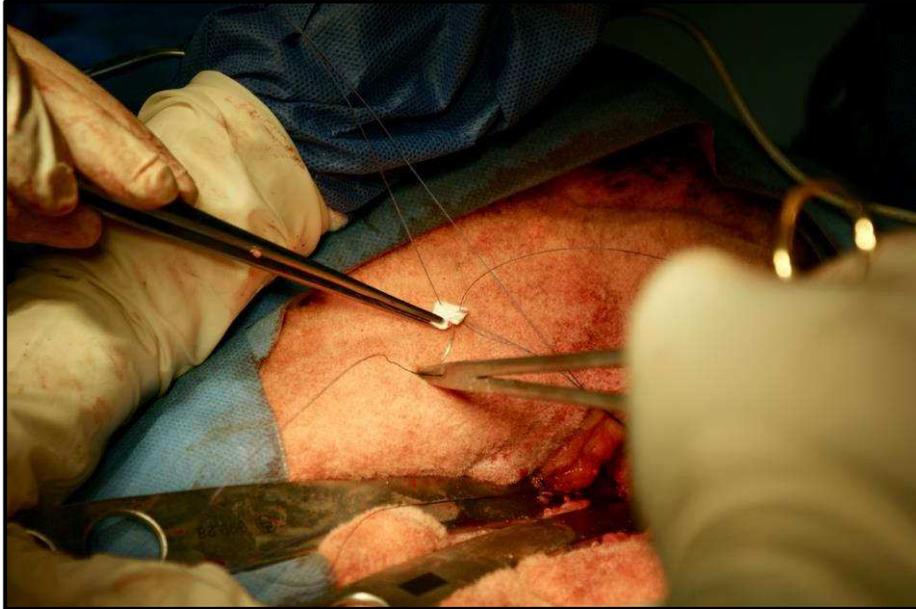


Abbildung 9: Operationssitus: "Auffädeln" des Implantats auf den dritten Faden außerhalb der Operationswunde

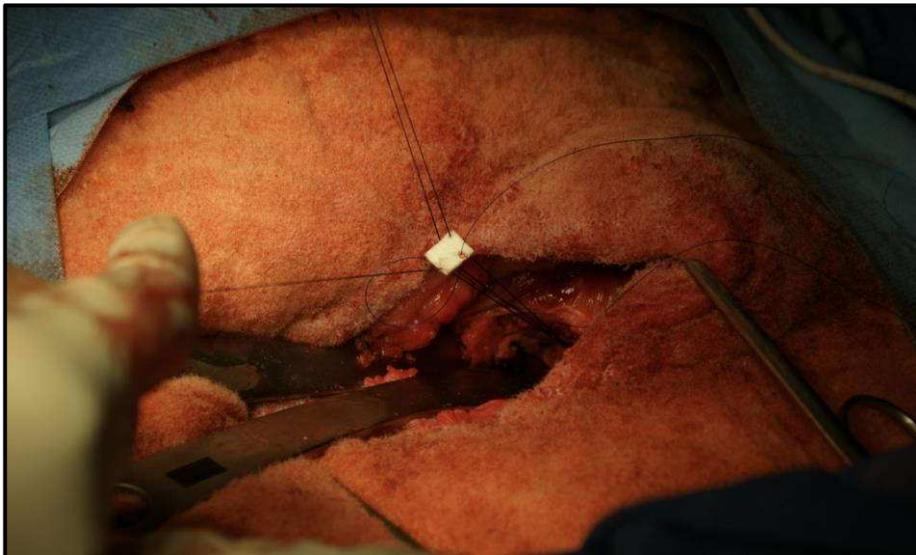


Abbildung 10: Operationssitus: Das Implantat außerhalb der Operationswunde aufgefüdelt auf drei Fäden
Anschließend konnte das Implantat mittels einer langen anatomischen Pinzette entlang der Fäden in Richtung Bandscheibe auf den Defekt hinuntergeschoben werden (siehe Abbildung 11).

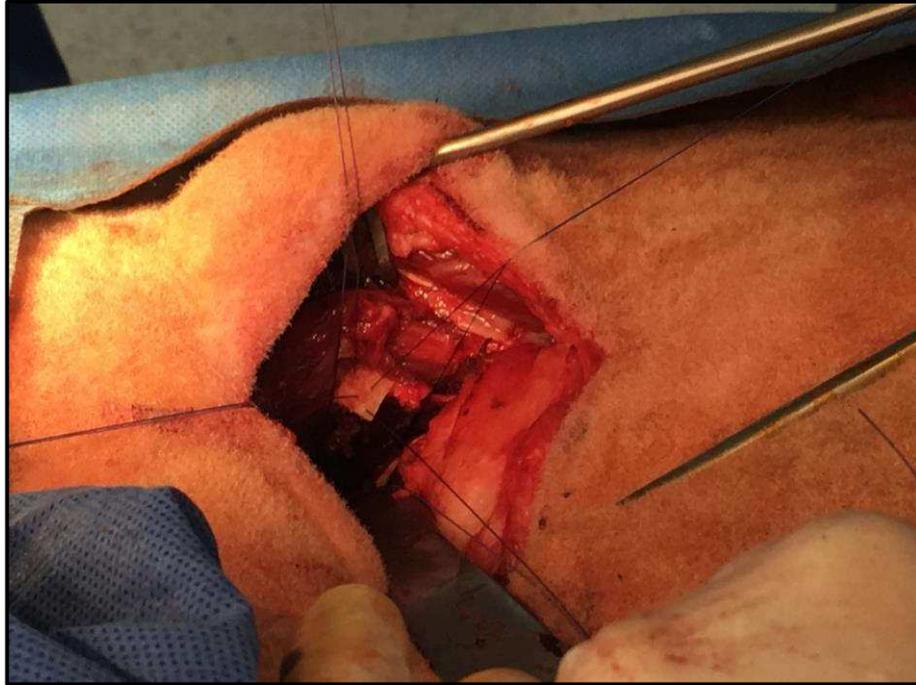


Abbildung 11: Operationssitus: Implantat wird mittels einer langen anatomischen Pinzette entlang der Fäden in Richtung Bandscheibe auf den Defekt hinuntergeschoben

Die Nadeln wurden nun von den Fadenanfängen abgeschnitten. Die einzelnen zueinander gehörenden Fadenenden wurden dann nacheinander von den Klemmen gelöst und chirurgische Knoten geknüpft, auf das Implantat hinuntergeschoben und festgezogen. Zuletzt wurden die Fadenenden mit Hilfe einer Schere abgeschnitten

4.8.4. Chirurgischer Verschluss und postoperative Nachsorge

Nach Kontrolle auf eventuelle Blutungen wurde die laterale Bauchwand mittels PDS II (PDS TM Ethicon®, 1 CT, 40mm 1/2c, 150cm, Johnson & Johnson Medical GmbH, Norderstedt, Deutschland) verschlossen.

Mit Vicryl 2-0 Nahtgut (Vicryl TM Ethicon®, 2-0 SH plus, 26mm 1/2c, 70cm, Johnson & Johnson Medical GmbH, Norderstedt, Deutschland) wurde die Haut intrakutan vernäht (siehe Abbildung 12).

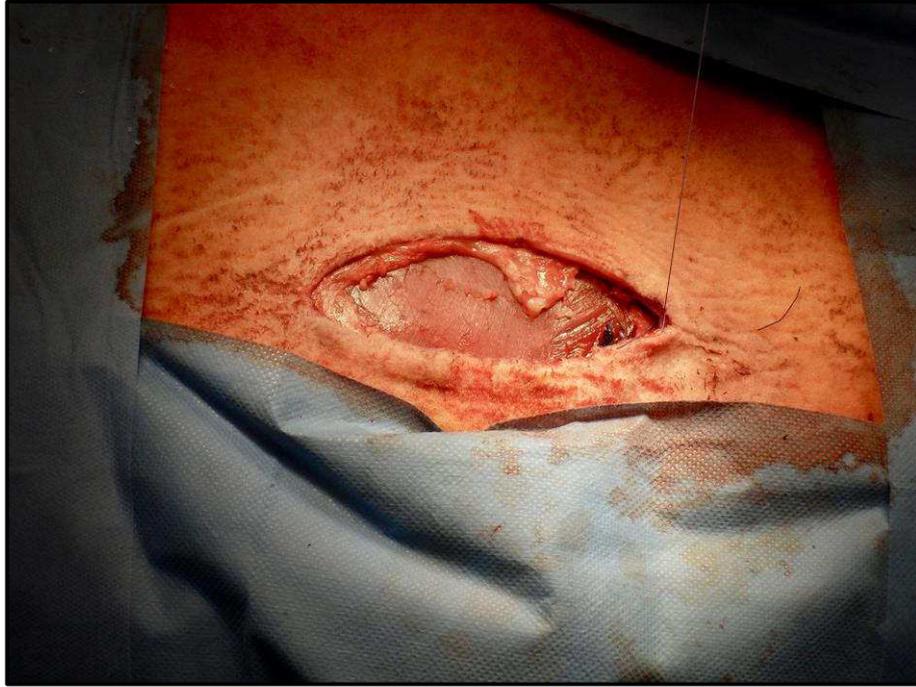


Abbildung 12: Operationswunde - Beginn der Unterhautnaht

An den Vorderbeinen erhielten die Tiere vor Ende der Operation zwei transdermale, analgetisch wirksame Pflaster (Fentanyl 12,6 mg/Pflaster, 75 µg/h, Durogesic®SMAT, Janssen-Cilag Pharma GmbH, Deutschland), bevor sie zurück in den Stall gebracht und extubiert wurden (Emmerich et al. 2016).

Die Tiere wurden vom Zeitpunkt der Extubation bis zur sicheren Belastung aller vier Extremitäten (Stand) und der geregelten Futteraufnahme ununterbrochen tierärztlich überwacht.

Für die weiteren fünf Tage wurden die Tiere medikamentös, neben den beiden analgetischen Pflastern (die mindestens für die drei folgenden Tage am Tier verblieben), mit 2,5 mg/kg Baytril (Baytril®, Enrofloxacin, 100mg/ml, Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Deutschland) und 2 mg/kg Rimadyl (RIMADYL®, Carprofen, Rind 50 mg/ml, Injektionslösung für Rinder, Zoetis Deutschland GmbH, Berlin, Deutschland) antibiotisch und analgetisch versorgt (Emmerich et al. 2016).

Die Tiere wurden für zwei Wochen post operationem weiter in der tierexperimentellen Einrichtung gehalten, täglich beobachtet und durch Tierärzte untersucht. Hierzu gehörte die Messung und Dokumentation der Körpertemperatur, eine Wundkontrolle und die Untersuchung des Gangbildes der Tiere.



Abbildung 13: Schaf in tierexperimenteller Haltung nach der Operation.

4.9. Weiterer Verlauf

Nach Ablauf von zwei Wochen post operationem, wurden die Tiere in Gruppen von sechs Tieren zu einer Weide transportiert. Hier verbrachten die Tiere weitere drei Monate in der Herde. Nach Ablauf der genannten Dauer erfolgte ein Rücktransport in die tierexperimentelle Einrichtung.

4.10. Euthanasie der Tiere

Die Euthanasie fand am anästhesierten Tier statt. Die Tiere wurden, wie auch schon zur Operationsvorbereitung, in der "Sitzstellung" fixiert. Eine ca. 4 cm x 3 cm große Stelle an der Oberseite eines Ohres wurde geschoren und desinfiziert. Dann wurde mittels eines umschließenden Handgriffs des Assistenten der venöse Abfluss des Ohres gestaut und ein venöser Zugang in eine sichtbar hervortretende Ohrvene gelegt (Braunüle Vasofix® Safety Braunüle® 1.1 x 33mm, G20, rosa, B. Braun Petzold, Melsungen, Deutschland). Der korrekte Sitz der Venenverweilkanüle wurde mittels 5 ml NaCl- Lösung getestet und mittels Klebeband am Ohr gesichert und fixiert.

Die Tiere wurden zuerst mit 10-15 mg/kg Thiopental (THIOPENTAL®, 500 mg Pulver zur Herstellung einer Injektionslösung, Wirkstoff: Thiopental-Natrium und Natriumkarbonat, Rotexmedica GmbH, Trittau, Deutschland) in eine tiefe Kurzzeit- Injektionsnarkose abgelegt

(Emmerich et al. 2016). Anschließend wurde erneut mit 5ml NaCl- Lösung die Venenverweilkanüle gespült. Zur Muskelrelaxierung wurden den Versuchstieren nach der Injektionsnarkose 8 mg, also 4 ml Pancuronium inresa (Pancuronium Injektionslösung zur i.v. Injektion, Pancuroniumbromid 4 mg/2 ml, Inresa Arzneimittel GmbH, Freiburg, Deutschland), gespritzt.

Dann erfolgte eine weitere Gabe von 5 ml NaCl- Lösung, um die Venenverweilkanüle nach der Gabe des Muskelrelaxanses zu spülen.

Letztendlich erhielten die Tiere über den venösen Zugang 5 Ampullen à 20 ml Kaliumchlorid 7,45% Braun (Kaliumchlorid 7,45% Braun, Konzentrat zur Herstellung einer Infusionslösung, B. Braun Melsungen AG, Deutschland) um die Erzeugung des Herzstillstandes durch Hyperkaliämie hervorzurufen (Emmerich et al. 2016). Da Kaliumchlorid keine Bewusstseinsstrübung bewirkt, ist eine Euthanasie mit dem gewählten Mittel nur am anästhesierten Tier anwendbar (Emmerich et al. 2016).

4.11. Herstellung der Präparate

4.11.1. Entnahme der Wirbelsegmente

Für die weiteren Versuchsschritte wurden nach der Euthanasie die Lendenwirbelsegmente herauspräpariert. Hierzu wurde die Lendenwirbelsäule en Bloc im Übergang zum thorakalen und zum lumbalen Wirbelkörperbereich durchtrennt.

Die weitere Bearbeitung der Wirbelsäule fand in Laboratorien der Charité Berlin statt. Bis auf die ersten beiden Tiere, war anhand des in der Operation angebrachten, nicht resorbierbaren Fadens, der kraniodorsal zur Befestigung des Implantats an der Bandscheibe verwendet wurde, eine Wiedererkennung der manipulierten Bandscheibe möglich. Die an die Wirbelsäule angrenzenden Gewebe wurden entfernt. Die Zerteilung der Segmente fand mit Hilfe einer oszillierenden Säge statt, sodass anschließend die manipulierte Bandscheibe mit Teilen des jeweils kranial und kaudal angrenzenden Wirbelkörpers in einer Größe bzw. Breite von circa 2,5 cm vorlag (siehe Abbildung 14).



Abbildung 14: Bandscheibenexplantat mit Teilen des kranial und kaudal angrenzenden Wirbelkörpers.

4.11.2. Demineralisierung

Für die im weiteren Verlauf geplante lichtmikroskopische Auswertung war es notwendig, dass eine Entkalkung des Bandscheiben-Knochen-Segmentes erfolgte.

Hierzu wurde das Bandscheiben-Knochen-Segment nach der Entnahme in einen 50 ml Behälter (Falcon®, 50 ml Polypropylene Conical Tube, 30 x 115 mm Style, Industrial Falcon, Corning Science Mexico S.A., Reynosa, Mexico) gelegt und für 7 Tage in 4%igem Formaldehyd (Formaldehydlösung 4%, gepuffert, pH 6,9, Merck Chemicals GmbH, Darmstadt, Deutschland) im Brutschrank bei 37° C konserviert.

Nach Ablauf der 7 Tage wurde die Formaldehyd Lösung verworfen und stattdessen OSTEOSOFT®-Lösung (OSTEOSOFT®, Merck Chemicals GmbH, Darmstadt, Deutschland) bis zur vollständigen Bedeckung der Probe eingefüllt.

OSTEOSOFT® ist ein Entkalker, der auf der Basis von EDTA in der Routine-Histologie für die Entkalkung von sensitivem, kalziumhaltigen Material verwendet wird (Merck KGaA 2017). Dieser Entkalker ist laut der Nutzungsbroschüre des Herstellers Merck zu verwenden, wenn

Antigen-Strukturen des Gewebes erhalten werden sollen, um im Anschluss eine immunhistochemische Analyse (IHC-Analyse) durchzuführen (Merck KGaA 2017).

Die Bandscheiben verblieben für jeweils acht Wochen bei 37° C im Brutschrank im OSTEOSOFT®.

4.12. Herstellung der Bandscheibenpräparate

Vorbereitung

Die zugeschnittenen Bandscheibensegmente wurden innerhalb der acht Wochen im Abstand von zwei Wochen aus der Lösung entnommen, schneidbare Anteile des Knochens wurden entfernt und die OSTEOSOFT®-Lösung gewechselt.

Einbetten

Nach acht Wochen wurden die Proben zugeschnitten (siehe Abbildung 15) und analog zu den Proben der 3D-Zellkulturen in Einbettmedium als Blöcke (Tissue-Tek® O.C.T.™ Compound, Sakura Finetek Europe B.V., Alphen aan den Rijn, Niederlande) eingebettet, in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bei -80° C gelagert.

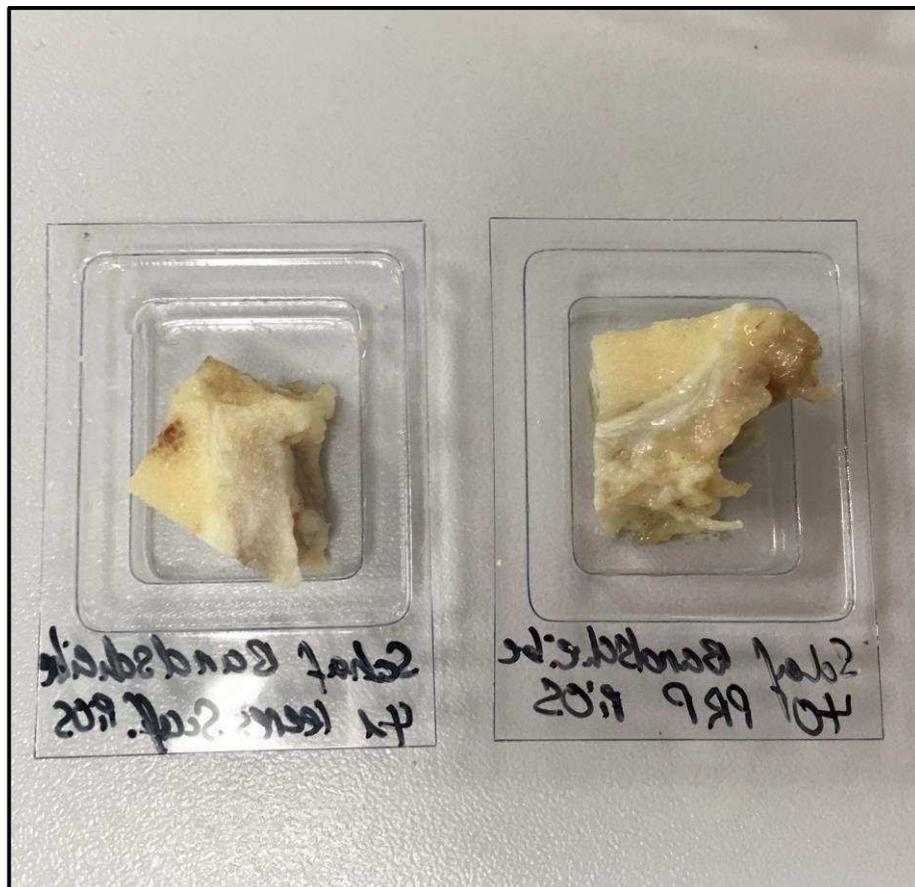


Abbildung 15: Größe der Bandscheibenpräparate vor dem Einfrieren.

Schneiden

Dadurch, dass die Gewebeblöcke der Bandscheiben dicker als die 3D-Zellkulturproben waren, wurden diese 24 Stunden bevor die jeweilige Probe geschnitten wurde aus der -80° C Lagerung in -20° C Gefrierschrank umgelagert. Dadurch war gewährleistet, dass die Bandscheibenprobe zum Zeitpunkt des Schneidens auf -20° C erwärmt ist.

Das Zuschneiden der Bandscheibenproben fand analog zu dem der 3D-Zellkulturen statt. Als Orientierung diente das nicht resorbierbare Nahtgut und noch vorhandene Knochenanteile der anliegenden Wirbelkörper. Bis zum Nahtgut wurde das Gewebe geschnitten und verworfen. Schräg unterhalb des Fadens befand sich bei allen Präparaten eine dunkel rote Verfärbung. Aus diesem Bereich wurden die ersten 12 Schnitte angefertigt. Im Anschluss wurden 30 Schnitte verworfen und danach 12 weitere Schnitte genommen.

Insgesamt wurde dieses Prozedere circa 4 Mal wiederholt. Die Schnittdicke betrug während des gesamten Prozesses 6 µm. Die Schnitte wurden im Anschluss mit Hilfe einer Folie (Cryofilm type 2C, Dr. Tadafumi Kawamoto, Kanagawa, Japan) auf die Objektträger gezogen.

Lagerung

Nachdem die angefertigten Schnitte getrocknet waren, wurden sie bis zur weiteren Verwendung (Hämatoxylin/Eosin-Färbung) bei -20° C aufbewahrt.

4.13. Histologische Färbung der Bandscheibenpräparate

4.13.1. Hämatoxylin/Eosin-Färbung

Die Hämatoxylin/Eosin-Färbung, abgekürzt auch HE-Färbung genannt, dient als Übersichtsfärbung. Durch den sauren Farbstoff Eosin werden acidophile bzw. basische (eosinophile) Strukturen, wie zum Beispiel Zellplasmaproteine, rötlich angefärbt. Durch den Farbstoff Hämatoxylin färben sich saure bzw. basophile Strukturen, wie Zellkerne mit Desoxyribonukleinsäure (DNA), blau (Mulisch und Welsch 1990).

Färbelösungen

200 ml Methanol wurden im Verhältnis 1 zu 1 mit 200 ml Aceton gemischt und bei -20° C bis zur Verwendung aufbewahrt. Für die Eosin-Färbelösung wurden wurde 3g Eosin (Eosin, E4382, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) in 300 ml Ethanol (70%) gelöst. Das Hämatoxylin wurde in Form einer Hämatoxylin-Fertiglösung (Automation Hematoxylin, Fertiglösung, S2020, Agilent Technologies Company Dako Denmark A/S, Glostrup, Dänemark) genutzt.

Fixierung

Siehe Fixierung Alcianblau-Färbung (siehe 4.5.6. Abschnitt Eindecken der Alcianblau 8GS-Färbung).

Durchführung

Die Objektträger wurden zuerst in Aqua dest. für 5 Minuten befeuchtet und im Anschluss für eine Minute in der Hämatoxylin-Färbelösung gefärbt. Bei anschließendem Spülen unter fließendem Leitungswasser für 30 Minuten erfolgte ein Farbumschlag nach blau. Vor der anschließenden Färbung für vier Minuten mit der Eosin-Färbelösung erfolgte für fünf Minuten ein Entfernen der Fremdionen des Leitungswassers mittels Aqua dest. Im Anschluss wurde ein Entwässern über fünf Minuten in 96% Ethanol und über weitere fünf Minuten in absolutem Ethanol (100%) durchgeführt. Das Ethanol wurde in Orangerterpene für zwei Minuten entfernt und die Schnitte mit klarem Eindeckmedium eingedeckt (siehe 4.5.6. Abschnitt Durchführung der Alcianblau 8GS-Färbung).

Nachdem das Substrat mit Aqua dest. ausgewaschen wurde, wurden die Zellkerne mit einer Hämatoxylin-Fertiglösung für drei Minuten bei Raumtemperatur gegengefärbt. Die Objektträger wurden folgend mit Aqua dest. gewaschen. Durch zusätzliches Spülen unter fließendem Leitungswasser erfolgte der Farbumschlag nach blau.

Nach dem abschließenden Trockenwischen folgte ein Eindecken unter einem Deckglas mit wässrigem Eindeckmedium (Aquatex®, wässriges Eindeckmittel für die Mikroskopie, 108562, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland).

Die Durchführung der Hämatoxylin/Eosin-Färbung, sowie das Schneiden der Bandscheibenproben, wurde zum überwiegenden Teil von einer speziell dafür geschulten technischen Assistentin durchgeführt

5. Ergebnisse

5.1. *in vitro* Versuchs

5.1.1. Gewinnung der Zellen

Die Zerkleinerung des Anulus fibrosus Gewebes der Spendertiere und die Gewinnung der Zellen ließen sich reproduzierbar durchführen. Mit Hilfe der Trypanblau-Methode konnten vitale Zellen aus dem ovinen Anulus fibrosus isoliert werden. Bei der Kultivierung im Monolayer erfolgte eine homogene Verteilung der Zellen in der Zellkultur. Hierbei konnte kein Wachstum in mehreren Schichten beobachtet werden. Nach der zweiten Passage im Monolayer konnten die Zellen für das Chemotaxisassay verwendet werden. Das Bestücken der Chemotaxisplatte sowie die im Anschluss durchgeführten 3D-Zellkulturen ließen sich ebenfalls sicher reproduzierbar durchführen.

Für die 3D-Zellkulturen wurden die ovinen Anulus fibrosus Zellen jedes Spenders nach Passage 2 im gemeinsamen Zellpool ausgesät, weiter kultiviert und am Ende der Passage 3 verwendet.

5.1.2. Chemotaxis von ovinen Anulus fibrosus Zellen

Der Therapieansatz, körpereigene Zellen *in situ* zur Regeneration von Anulus fibrosus Gewebedefekten zu nutzen, stellt eine vielversprechende Alternative zur Verwendung dieser als Bestandteil von Zelltransplantaten dar. Das Ziel hierbei ist es, dass körpereigene Zellen durch Chemokine zu einem Gewebedefekt gelockt und vor Ort zur Differenzierung in das entsprechende Gewebe angeregt werden. Chemokine agieren als Lockstoffe und sind in der Lage Zellen zur Migration anzuregen (Stich 2012).

Vor dieser Arbeit gab es keine Versuche, die die Wirkung des humanen Chemokins TECK auf ovine Anulus fibrosus Zellen untersuchten. Bisher wurde nicht untersucht, ob ein human rekombinantes Chemokin TECK auch bei ovinen Anulus fibrosus Zellen eine Migrationssteigerung bewirken kann. Die prinzipielle Anwendbarkeit eines human rekombinanten Chemokins und seine Wirkung am Schaf wurden somit bisher nicht belegt (Proof of Principle).

Um zu untersuchen ob die ovinen Anulus fibrosus Zellen ebenfalls auf humane Chemokine reagieren, sollte somit zuerst ein *in vitro* Chemotaxisassay zur Überprüfung des chemotaktischen Effekts durchgeführt werden.

5.1.2.1. Chemotaxisassay

Um eine Wirkung des humanen Chemokins TECK auf die ovinen Anulus fibrosus Zellen nachzuweisen, wurde ein Chemotaxisassay durchgeführt.

Die Abbildung 16 zeigt die Ergebnisse des Chemotaxisassays mit den ovinen Anulus fibrosus Zellen von jeweils drei Spendertieren. Für das untersuchte Chemokin TECK wurde nach Zugabe ein dosisabhängiger, migratorischer Effekt festgestellt (Abbildung 16). Ab einer Konzentration von 500 nM zeigte sich, dass bei zunehmender Chemokinkonzentration, die Anzahl gewanderter Zellen zunahm.

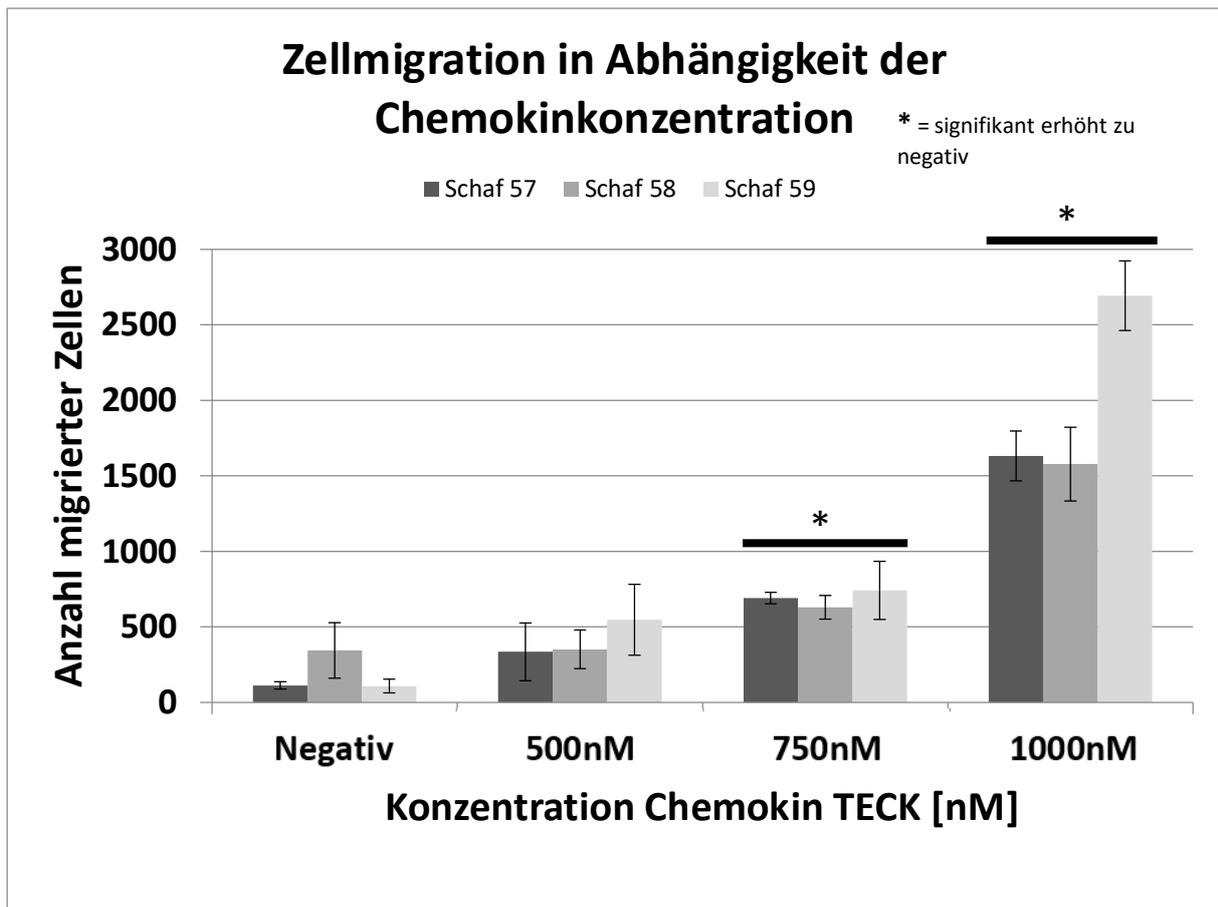


Abbildung 16 : Wirkung verschiedener Konzentrationen des Chemokins TECK auf die Migration oviner Anulus fibrosus Zellen

Im Mittel wanderten bei einer Stoffmenge von 500 nM 1,37%, bei 750 nM 2,29% bis hin zu einem Maximum bei 1.000 nM von 6,56% der eingesetzten Zellen (Abbildung 17).

Für das Chemokin zeigte sich bei allen drei Spendern die optimale getestete Konzentration, die in einer maximalen Zahl gewanderter Zellen resultierte, bei 1000 nM (Abbildung 17). Die maximale Wanderung wurde mit 8,98% der eingesetzten Zellen des Donor 3 (Schaf 59) bei 1000 nM gemessen (siehe Abbildung 17, Schaf 59). Bei einer Stoffmenge von 750 nM lag der Maximalwert der gewanderten Zellen bei 2,47% des Donor 3 (siehe Abbildung 17, Schaf 59).

Ergebnisse

Die maximale Wanderung bei 500 nM wurde von den Zellen des Donor 3 (siehe Abbildung 17, Schaf 59) mit 1,82% gezeigt.

Ohne Einsatz des Chemokins (Negativkontrolle) zeigten die Zellen des Donor 2 (Schaf 58) die maximale Wanderung mit 1,15%. In der Negativkontrolle des Donor 1 (Schaf 57) wanderten 0,37% der eingesetzten Zellen und bei Donor 3 (Schaf 59) 0,36% (siehe Abbildung 17).

Die Anzahl der gewanderten Zellen in der Positivkontrolle, dem Kultivierungsmedium mit Zusatz von 10 % ovinem Serum, ist nicht in der Abbildung dargestellt. Die Werte lagen bei 12,34% bei Donor 1, 18,08% bei Donor 2 und 40,00% bei Donor 3 der eingesetzten Zellen. Die schwarzen Linien in der Abbildung 16 und Abbildung 17 stellen die Standardabweichungen dar.

Zur Bestimmung der Signifikanz, wurde für jede Chemokinkonzentration die Zahl migrierter Zellen mit der Zahl der in der Negativkontrolle gewanderte Zellen verglichen ($p^* < 0,05$). Hierfür ergab sich bei einem gepaarten zwei Stichproben t- Test (Signifikanzniveau $\alpha = 0.05$) ein signifikanter Unterschied zur Negativkontrolle bei der Konzentration 750 nM ($p=0,044$) und der Konzentration 1000 nM ($p=0,049$). In einer Konzentration von 750 nM und 1000 nM regte das Chemokin TECK die ovinen Anulus fibrosus somit signifikant zur Migration an.

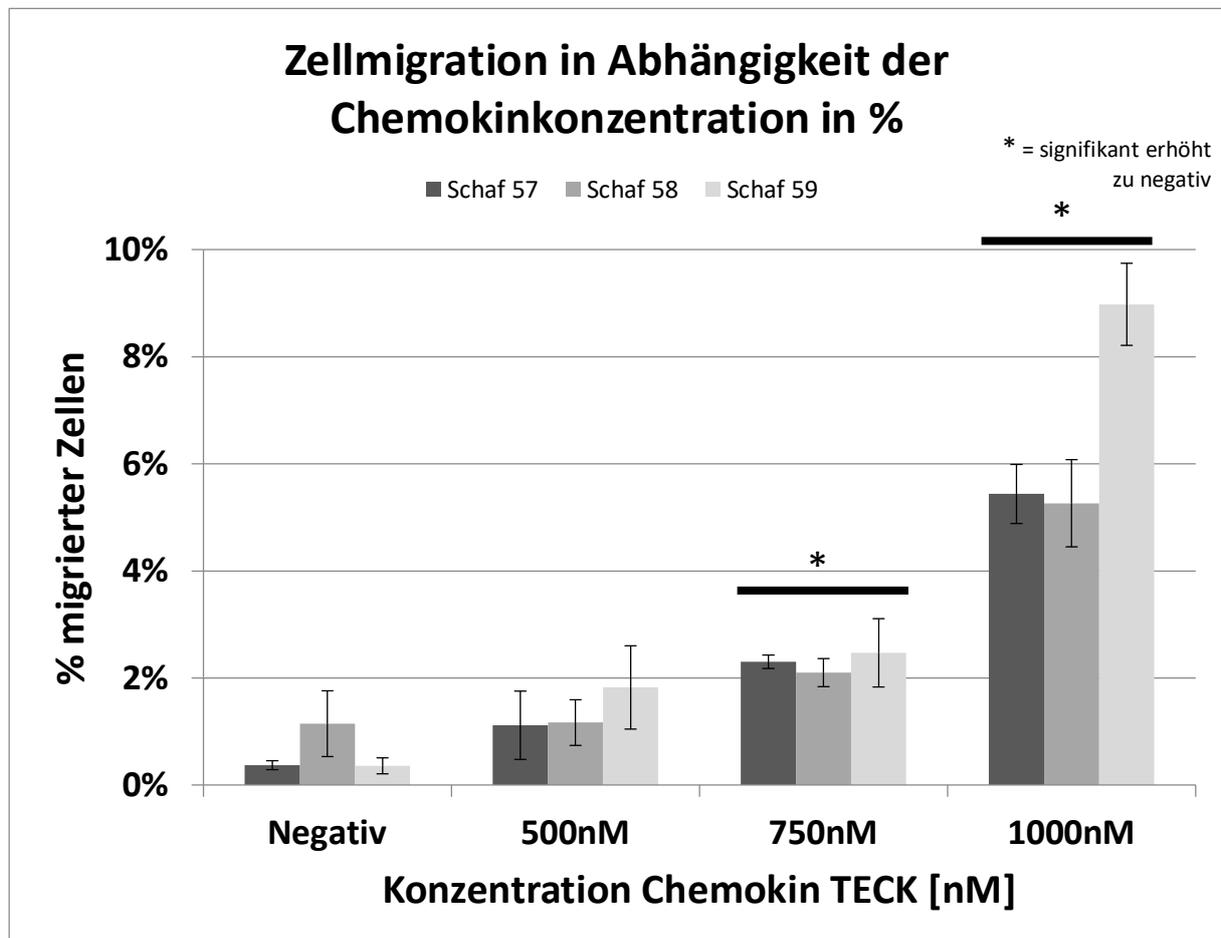


Abbildung 17: Wirkung verschiedener Konzentrationen des Chemokins TECK auf die Migration oviner Anulus fibrosus Zellen in Prozent

5.1.2.2. Zusammenfassung der chemokininduzierten Chemotaxis von ovinen Anulus fibrosus Zellen mit humanem Chemokin

Im durchgeführten Versuch wird deutlich, dass das human rekombinante Chemokin TECK die ovinen Anulus fibrosus Zellen zur Migration anregen kann. Der Rezeptorligand des Chemokins geht also nicht nur mit dem Chemokinrezeptor humaner Anulus fibrosus Zellen eine Bindung ein, sondern auch mit dem oviner Anulus fibrosus Zellen.

Die Grundlage für den tierexperimentellen Versuch an Schafen, also eine vergleichbare Wirkung des Chemokins auf Anulus fibrosus Zellen der Gattung Schaf, ist somit gegeben und stellt eine Voraussetzung für die anschließende Überprüfung am Schafsmodell dar (Proof of Principle). Hätte das humane Chemokin die ovinen Anulus fibrosus Zellen nicht zur Migration angeregt, wäre die Voraussetzung für Gruppe D des Tierversuchs nicht gegeben.

5.1.3. 3D-Zellkulturen oviner Anulus fibrosus Zellen

5.1.3.1. Darstellung der lebenden und toten Zellen mittels der PI/FDA Färbung

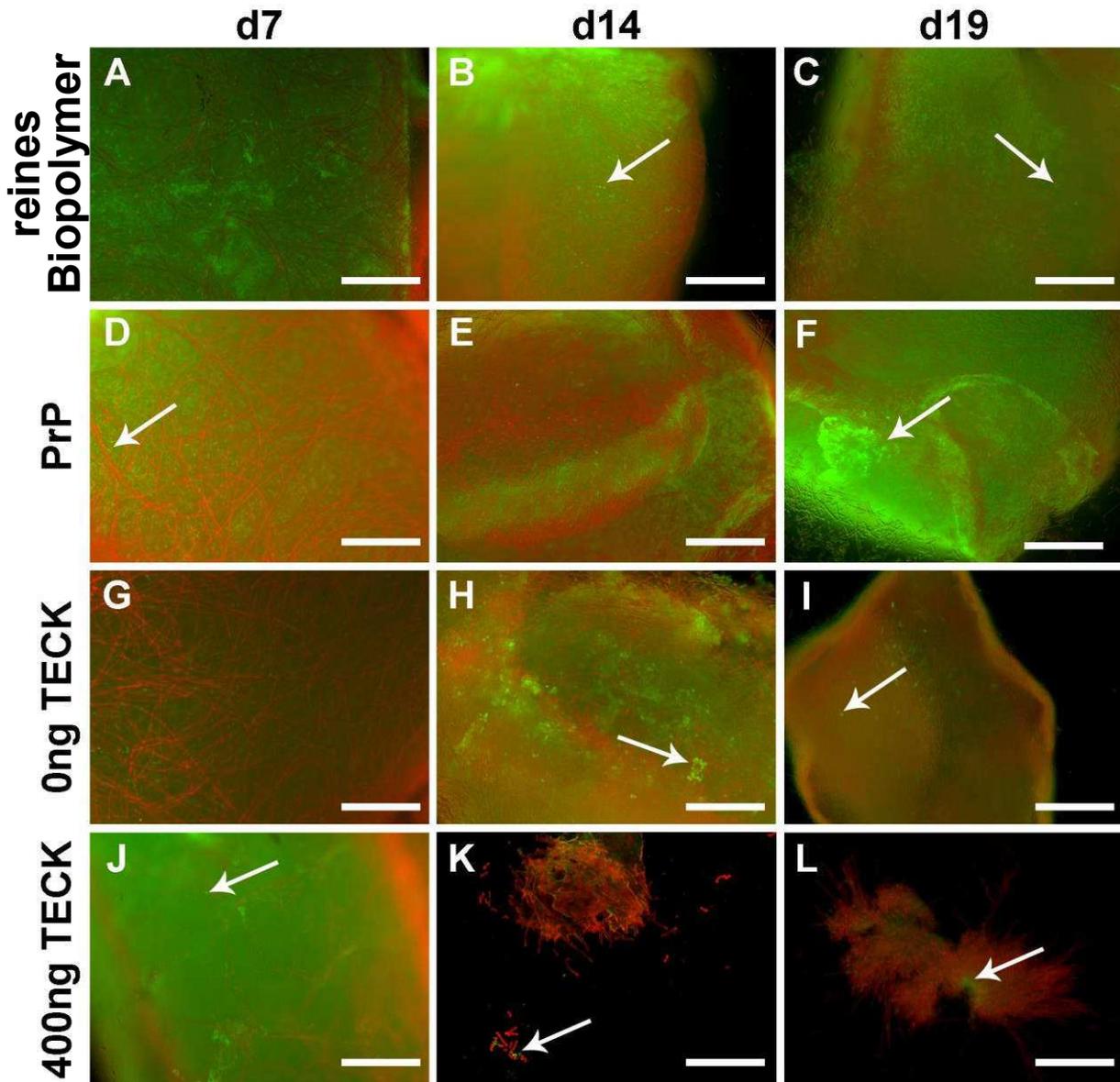


Abbildung 18: PI/FDA-Färbung der 3D-Zellkulturen

Gruppe 1 (reines Biopolymer) Implantat mit Anulus fibrosus Zellen; Gruppe 2 (PrP) Implantat mit Anulus fibrosus Zellen und unter Zusatz von PRP; Gruppe 3 (0ng TECK) Implantat mit Anulus fibrosus Zellen und partikulärem Freisetzungssystem für Arzneimittel; Gruppe 4 (400ng TECK) Implantat mit Anulus fibrosus Zellen und mit dem partikulären Freisetzungssystem für Arzneimittel mit 400ng Konzentration an verkapseltem TECK; Der weiße Messbalken entspricht einer Länge von 200 μm. Die Pfeile deuten auf vitale Zellen bzw. Zellcluster hin.

Um die Zellvitalität bestimmen zu können, wurde zu jedem der drei Untersuchungszeitpunkte eine Färbung mittels PI und FDA durchgeführt. PI kann in tote Zellen eindringen und zeigt bei

Ergebnisse

einer Anregung mit UV-Licht eine rote Fluoreszenz. FDA wird in vitalen Zellen verstoffwechselt und zeigt bei Anregung eine grüne Fluoreszenz. Die einzelnen Gruppen sind in Tabelle 1 dargestellt.

In allen Ansätzen konnten lebende Zellen über den gesamten Kultivierungszeitraum (19 Tage) nachgewiesen werden (siehe Abbildung 18).

Es zeigte sich, dass nicht nur tote Zellen, sondern auch die Faserstrukturen der Implantate sich rot anfärbten. Dies wurde mit zunehmender Kultivierungsdauer immer deutlicher (siehe Abbildung 18 Ausschnitte K und J). Tote Zellen konnten mit dieser Färbung der Implantate nur schwer differenziert werden, lassen sich allerdings durch einen schwächeren Farbton in allen Ansätzen vermuten. Die Pfeile in Abbildung 18 zeigen jeweils auf lebende Zellen.

Zum ersten Untersuchungszeitpunkt, Tag 7 der Kultivierung, stellten sich die Ansätze der Gruppen 1 und 2 mit vielen vitalen Zellen dar. Rot gefärbte, tote Zellen ließen sich in beiden Gruppen wenige nachweisen. An Tag 7 zeigten sich die Ansätze der Gruppen 3 und 4 ebenfalls mit vielen vitalen Zellen. Diese waren jedoch nicht so reichlich wie in den Gruppen 1 und 2 vertreten.

Der an Tag 7 beschriebene Zustand ließ sich zum nächsten Untersuchungszeitpunkt, Tag 14 der Kultivierung, bei allen Gruppen vergleichbar vorfinden. Das Implantat der Gruppe 4 zeigte schon an Tag 14 die weiter fortschreitende Degradierung. Die Implantate wurden im Allgemeinen mit fortschreitender Kultivierung instabiler. Dies zeigte sich verstärkt in den Ansätzen mit dem partikulären Freisetzungssystem für Arzneimittel, also in denen der Gruppen 3 und 4.

Die Färbung zeigte diese Beschleunigung des Implantat-Abbaus der Ansätze mit dem partikulären Freisetzungssystem für Arzneimittel deutlich am 19. Tag (siehe Abbildung 18 Ausschnitte I und L). Am 19. Tag sind hier durch die stark fortschreitende Degradierung nur noch Implantatreste erkennbar. Die Ergebnisse des 19. Tages sollten somit nur unter Vorbehalt betrachtet werden, da die Implantatreste sich aufgrund des starken Abbaus nur schlecht färb- und auswertbar darstellten. Am 19. Tag waren die meisten vitalen Zellen im Ansatz der Gruppe 2 zu sehen. Der Ansatz der Gruppe 1 zeigte ebenfalls vitale Zellen. Die Implantatreste der Gruppen 3 und 4 wiesen an Tag 19 nur noch vereinzelt lebende Zellen auf (siehe Abbildung 18).

5.1.3.2. Zusammenfassung der 3D-Zellkulturen oviner Anulus fibrosus Zellen

Das eingesetzte zellfreie Implantat (Gruppe 1) und dessen Abbauprodukte haben *in vitro* keinen Einfluss auf die Vitalität von ovinen Anulus fibrosus Zellen in der 3D-Zellkultur gezeigt. Das partikuläre Freisetzungssystem für Arzneimittel und dessen Abbauprodukte, das Chemokin und das eingesetzte PRP (Gruppe 2 bis 4) haben *in vitro* ebenfalls keinen Einfluss auf die Vitalität von ovinen Anulus fibrosus Zellen in den 3D-Zellkulturen gezeigt.

Ob das zellfreie Implantat, das Freisetzungssystem für Arzneimittel und dessen Abbauprodukte, das Chemokin TECK beziehungsweise das eingesetzte PRP *in vitro* einen Einfluss auf die Proliferation von ovinen Anulus fibrosus Zellen hat, konnte mittels der PI/FDA-Färbung nicht beurteilt werden. Um dies zu untersuchen, wurde zusätzlich zur PI/FDA-Färbung eine histologische Untersuchung der 3D-Zellkulturen durchgeführt (siehe 5.1.4. Histologische Untersuchungen der 3D-Zellkulturen).

Die Grundlage für den tierexperimentellen Versuch an Schafen, dass keiner der genutzten Materialien und Wirkstoffe einen Einfluss auf die Zellvitalität hat, ist somit gegeben und stellt eine Voraussetzung für eine anschließende Testung am Schafsmodell dar (Proof of Principle).

5.1.4. Histologische Untersuchungen der 3D-Zellkulturen

5.1.4.1. Alcianblau 8GS-Färbung und Safranin-O-Färbung

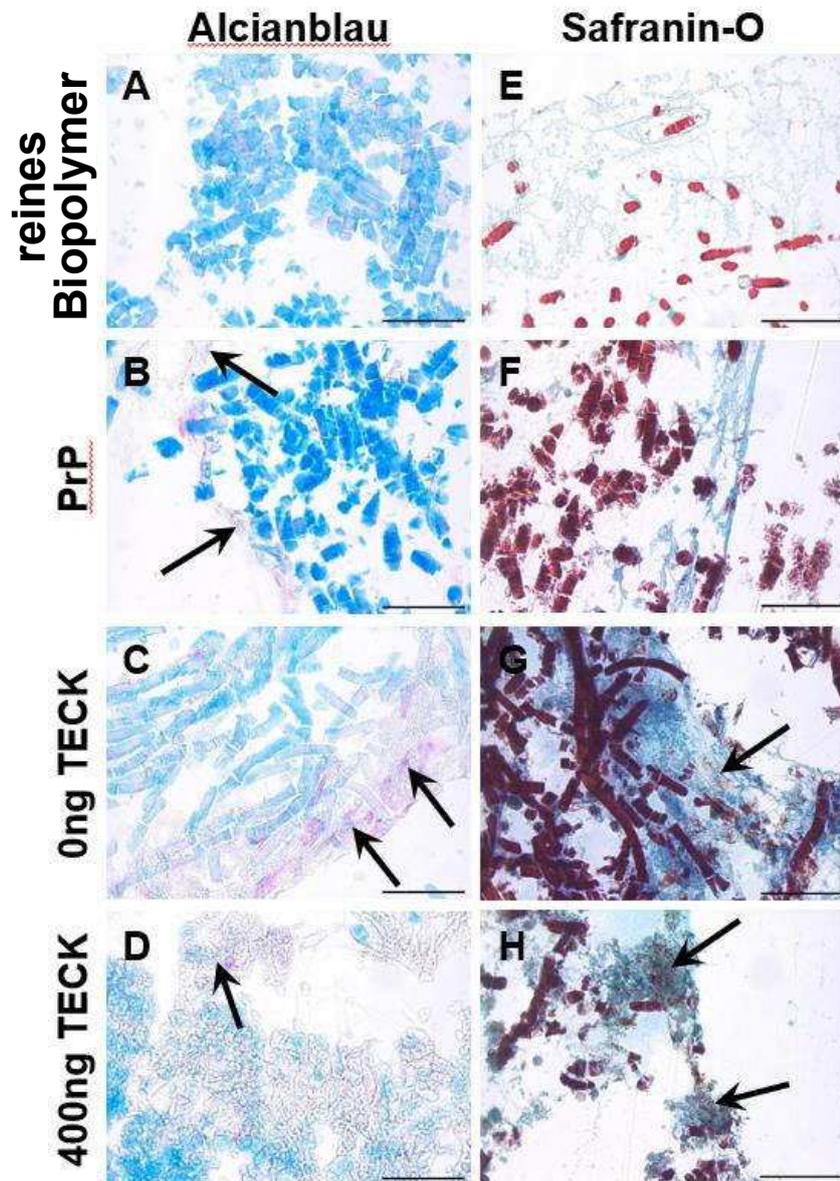


Abbildung 19: Alcianblau 8GS-Färbung und Safranin-O-Färbung der 3D-Zellkultur Transplantate

Die Alcianblau 8GX-Färbung chondrogen induzierter Transplantate nach 19 Tagen Kultivierung lässt bei den Gruppen 1 und 2 eine beginnende Bildung saurer Proteoglykane vermuten (Ausschnitt A und B). Eine intensive Färbung der sauren Proteoglykane lässt sich bei den Gruppen 3 und 4 beobachten (Ausschnitt C und D). Die Pfeile zeigen auf angefärbte Proteoglykane. Der schwarze Messbalken entspricht einer Länge von 50 μm .

Die Alcianblau 8GS-Färbung ist eine Nachweismethode für die knorpeltypischen, sauren sulfatierten Proteoglykane. Nachdem aus den 3D-Zellkultur Transplantaten Kryoschnitte angefertigt wurden, wurde die extrazelluläre Matrix mittels Alcianblau 8GS angefärbt. Die einzelnen Gruppen sind in Tabelle 1 dargestellt.

Ergebnisse

Die Alcianblau 8GS-Färbung zeigt die Darstellung der knorpeltypischen, sauren sulfatierten Proteoglykane der Knorpelgrundsubstanz in blau (Abbildung 19). Durch die Gegenfärbung mit Kernechtrot stellen sich die Zellkerne rot dar. Bei allen Ansätzen zeigte sich, dass sich die Fasern der Implantate ebenfalls deutlich tiefblau anfärbten. Durch die besondere Struktur und den tiefen Blauton, konnten die Fasern jedoch gegenüber der Färbung der Matrix gut abgegrenzt werden.

Im Ansatz der Gruppe 1 ließ sich nach 19 Tagen der Kultivierung zwischen den einzelnen Zellen eine beginnende Bildung von sauren Proteoglykanen vermuten (siehe Abbildung 19 Ausschnitt A). Es wurden vereinzelt Zellen sichtbar. Vergleichbar zeigt sich auch bei Gruppe 2 (siehe Abbildung 19 Ausschnitt B) zwischen den Zellen eine beginnende Bildung von sauren Proteoglykanen, jedoch stellten sich im Vergleich zur Gruppe 1 deutlich mehr Zellen dar.

Im Ansatz der Gruppe 3 zeigten sich ebenfalls viele Zellen und in der Umgebung dieser sichtbare Anfärbung der Proteoglykane (siehe Abbildung 19 Ausschnitt C). Die Gruppe 4 stellte sich vergleichbar mit Gruppe 3 dar (siehe Abbildung 19 Ausschnitt D). Bei beiden Ansätzen mit dem partikulären Freisetzungssystem für Arzneimittel, also bei Gruppe 3 und 4, lassen sich jeweils Partikel des Systems im Abbau erkennen. Bei allen Transplantaten konnten nach 19 Tagen der Kultivierung rote Zellkerne nachgewiesen werden.

Neben dem Nachweis der Proteoglykane mittels Alcianblau 8GS-Färbung wurden auch mit der Safranin-O-Lichtgrün-Färbung Proteoglykane nachgewiesen (siehe Abbildung 19).

In der Safranin-O-Lichtgrün-Färbung werden Proteoglykane rot dargestellt. Ist der Proteoglykangehalt leicht reduziert, erscheint er hell-orange. Ist der Gehalt stark reduziert erscheint er weiß. Sind keine Proteoglykane vorhanden, erscheint dies blau/blaugrün. In allen Ansätzen färbten sich die Fasern der Implantate ebenfalls rot an. Hier zeigten sich bei den Gruppen 1 und 2 geringfügige Abweichungen zum Ergebnis der Alcianblau 8GS-Färbung.

Bei der Gruppe 1 wurden in der Safranin-O-Färbung vereinzelt Zellen, jedoch keine Proteoglykane sichtbar (siehe Abbildung 19 Ausschnitt E). Das Vorkommen von Zellen und der fehlende Proteoglykangehalt stellte sich vergleichbar auch bei Gruppe 2 dar (siehe Abbildung 19 Ausschnitt F).

In der Gruppe 3 ließ sich ein leichter Proteoglykangehalt detektieren, welcher durch eine rote Färbung zu erkennen ist (siehe Abbildung 19 Ausschnitt G). Zellen konnten nur vereinzelt nachgewiesen werden. Bei der Gruppe 4 wurden neben Zellen ebenfalls ein geringer Gehalt an Proteoglykanen durch leicht rote Färbung sichtbar (siehe Abbildung 19 Ausschnitt H). Bei beiden Ansätzen mit dem partikulären Freisetzungssystem für Arzneimittel, also bei Gruppe 3 und 4, lassen sich jeweils die Partikel des Systems im Abbau erkennen (siehe Abbildung 19 Ausschnitt G und H).

5.1.4.2. Zusammenfassung der histologischen Untersuchung der 3D-Zellkulturen oviner Anulus fibrosus Zellen

Die Alcianblau 8GS-Färbung und die Safranin-O-Färbung sind Nachweismethoden für verschiedene Gruppen von Proteoglykanen.

In der Alcianblau 8GS-Färbung der Ansätze mit reinem Transplantat und dem Transplantat mit PrP Zusatz im Kultivierungsmedium lässt sich eine Bildung von Proteoglykanen nur vermuten. In den Ansätzen der Gruppen 3 und 4 konnten proteoglykanhaltige Areale angefärbt werden.

In der Safranin-O-Färbung stellte sich das Ergebnis der Gruppe 3 vergleichbar dar. Das Ergebnis der Gruppe 4 zeigt mehr proteoglykanhaltige Areale als in Gruppe 3. In den Gruppen 1 und 2 ließen sich keine Proteoglykane nachweisen.

Das partikuläre Freisetzungssystem für Arzneimittel war nach 19 Tagen Kultivierung nicht vollständig abgebaut und ließ noch vorhandene Partikel des Systems im Abbau erkennen (siehe Abbildung 19).

Bei allen Transplantaten ließen sich nach 19 Tagen der Kultivierung Zellkerne nachweisen.

Die Grundlage für den tierexperimentellen Versuch an Schafen, dass bei Vorhandensein der genutzten Stoffe eine Bildung von Proteoglykanen stattfinden kann, ist somit gegeben und stellt eine Voraussetzung für eine anschließende Testung am Schafsmodell dar.

5.2. Ergebnisse des *in vivo* Versuchs

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Versuchstiergruppen dargestellt. Hierbei wurde zwischen Tieren der Gruppe A (Leerdefekt), also reiner Defektsetzung ohne Deckung mittels Implantats, und den weiteren Gruppen B, C, D, E, also den Gruppen mit Defektdeckung mittels Implantats unterschieden. In Tabelle 5 sind die einzelnen Versuchstiergruppen erneut dargestellt.

Gruppenname	Angewandte Methode	Anzahl der Tiere
A	Leerdefekt (Kontrollgruppe), ohne Substitution	6
B	Implantat ohne Zusatz	6
C	Implantat + partikuläres Freisetzungssystem für Arzneimittel	6
D	Implantat + partikuläres Freisetzungssystem für Arzneimittel mit verkapseltem Faktor TECK (CCL25)	6
E	Implantat + plättchenreichem Plasma (PRP) - Zusatz	6

Tabelle 5: erneute Darstellung der Versuchstiergruppen (A-E)

5.2.1. Operationszeiten

5.2.1.1. Dauer aller Operationen im zeitlichen Verlauf

Für jedes Tier wurde während des Eingriffs ein Operationsprotokoll angefertigt. Neben den Vitalparametern der Tiere wurde der zeitliche Verlauf des Eingriffs notiert. Hierbei wurde der Zeitpunkt der Narkoseeinleitung bei Gabe der Prämedikation vermerkt.

Die Gesamtdauer des chirurgischen Eingriffs wurde mit dem Zeitpunkt des ersten Schnitts (Hautschnitt) und dem Zeitpunkt des Endes der Operation bei Vollendung der Naht und beginnender Ausleitung der Narkose des Tieres notiert (siehe Abbildung 20). Sichtbar wird, dass die Dauer der Operationen mit steigender Anzahl der durchgeführten Operationen abnimmt.

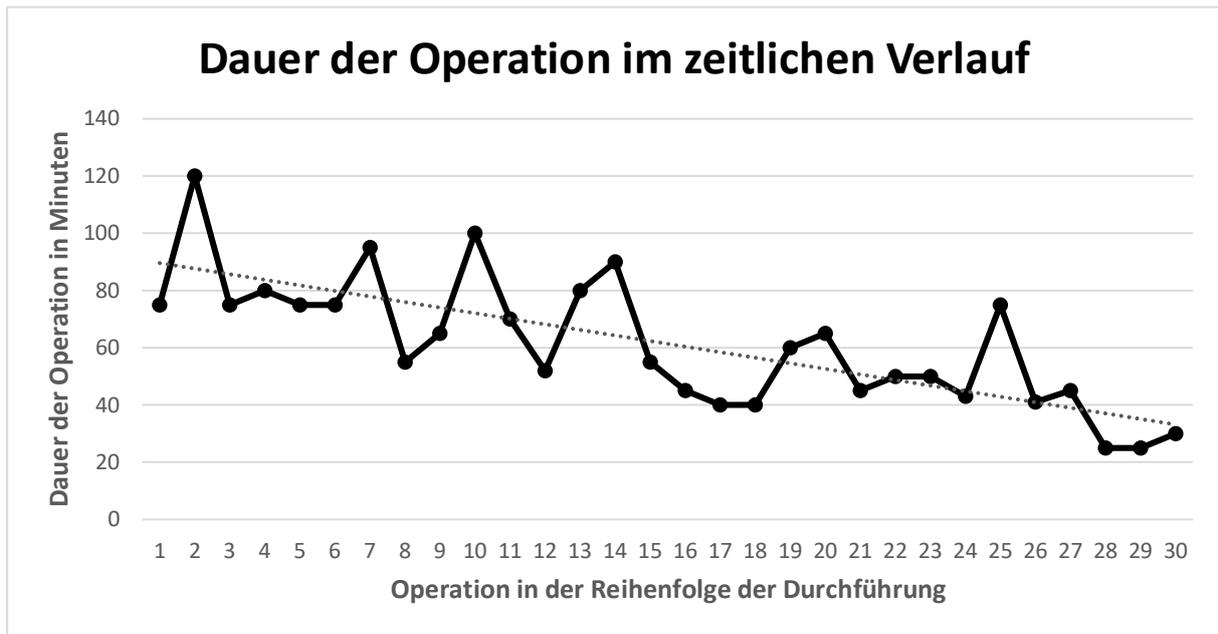


Abbildung 20: Darstellung der Dauer der Operationen im Verlauf der Studie

5.2.1.2. Dauer aller Operationen mit Defektdeckung im zeitlichen Verlauf

Bei Betrachtung der Operationen mit Defektdeckung, somit aller Operationen ausgeschlossen der Gruppe A (Leerdefekt), wird deutlich, dass es ebenfalls mit zunehmender Operationsanzahl zu einer verkürzten Operationsdauer kommt (siehe Abbildung 21). Die maximale Operationsdauer bei den Versuchstieren mit Defektdeckung mittels Implantats betrug circa 2 Stunden. Die minimale Operationsdauer bei Defektdeckung mittels Implantats betrug circa 40 Minuten. Die spezielle operative Erfahrung des Operators in Bezug auf die Implantatbefestigung stieg mit steigender Anzahl der Operationen und verringerte damit die Dauer des chirurgischen Eingriffs.

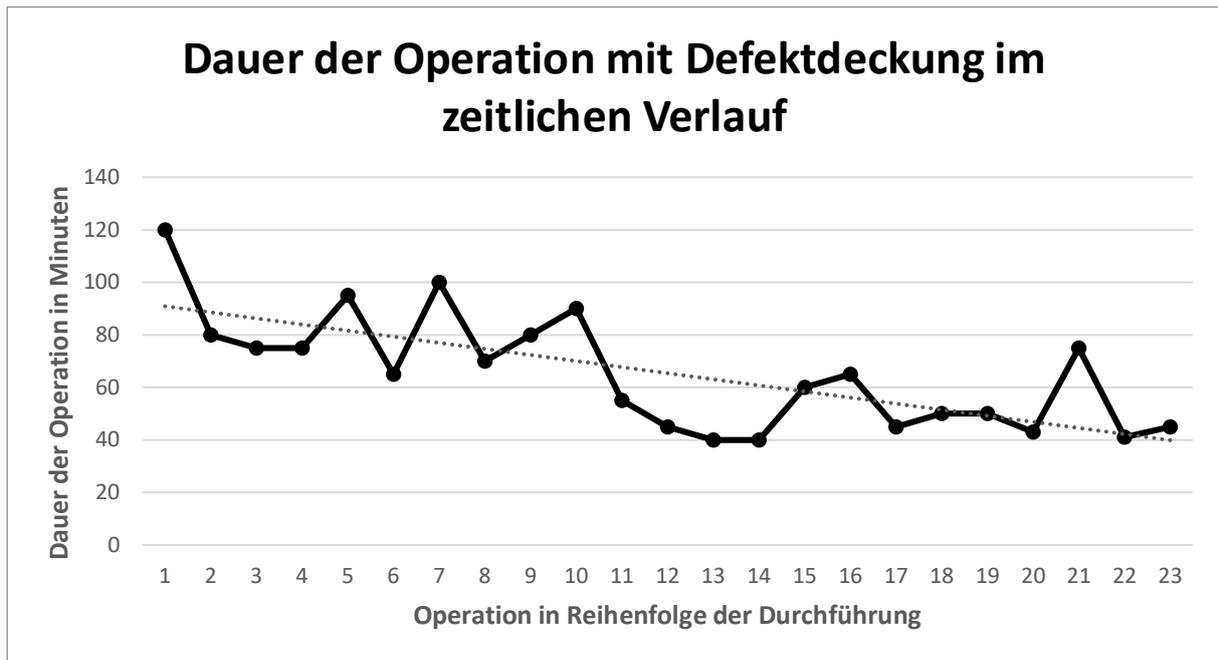


Abbildung 21: Darstellung der Dauer der Operationen mit Defektdeckung im zeitlichen Verlauf der Studie

5.2.2. Defektsetzung

Die invasive Defektsetzung war wenig aufwändig und im Allgemeinen mit einem geringen Zeitaufwand verbunden. Die maximale Operationsdauer bei den Versuchstieren ohne Defektdeckung mittels Implantats betrug circa 1 Stunde und 15 Minuten. Die minimale Operationsdauer bei Defektdeckung betrug circa 25 Minuten. Hieraus folgt, dass die Operationszeiten der Tiere mit reiner Defektsetzung und somit ohne anschließende Deckung mittels Implantats geringer waren als bei den Versuchstieren mit Defektdeckung. Da der Defekt mit Hilfe eines Skalpells und einer Pinzette gesetzt wurde, variierte die geplante Defektgröße (circa 3,5mm x 3,5mm). Dies wurde in der histologischen Auswertung ebenfalls ersichtlich (siehe 5.2.7.1.1 Defektgröße).

5.2.3. Defektdeckung: Einbringen und Befestigen des Implantats

Das Implantationsverfahren verursacht im Vergleich zu der reinen Defektsetzung einen zusätzlichen Schaden des Anulus fibrosus. Intraoperativ gestaltete sich insbesondere die Befestigungsnaht und damit die optimale Platzierung der Implantate als schwierig. Vor allem die vor Einbringen des Implantats durchgeführte Befestigung der Fäden an den Ecken des Defektes erfordert jeweils mehrere Versuche zur korrekten Platzierung der Naht. Die Implantationsmethode ist somit sehr anspruchsvoll.

Bei einem Versuchstier der Gruppe E, das ursprünglich mit einer Defektdeckung mit Zusatz von PRP behandelt werden sollte, war die Befestigung des Implantats trotz mehrfacher Versuche nicht möglich, so dass bei diesem Tier während der Operation nur ein Defekt gesetzt wurde. Es war nicht möglich die Fäden an den Ecken des Defektes zu platzieren, da diese trotz mehrerer Versuche aus dem Gewebe ausrissen. Das Tier wurde somit ab der Operation in der Gruppe A (Leerdefekt) zugeteilt (siehe Tabelle 7).

5.2.4. Postoperativer Verlauf

Während der Operation kam es bei keinem der Tiere zu einer Komplikation. 29 der 30 Versuchstiere zeigten auch nach dem operativen Eingriff ein ungestörtes Allgemeinbefinden. Ein Tier verstarb aufgrund von Narkosenachwirkungen post operationem (siehe Tabelle 7). Die restlichen Tiere erholten sich rasch nach der Operation. Sie konnten unmittelbar nach der Operation aufstehen, alle vier Gliedmaße gleichmäßig belasteten, Futter aufnehmen und wieder in die Herde überführt werden. Bei keinem der 29 Versuchstiere wurde ein neurologischer Defizit nach der Operation festgestellt. Auch in der postoperativen Kontrolle konnte bei keinem Tier eine erhöhte Temperatur oder sonstige klinische Anzeichen für eine Störung des Allgemeinbefindens festgestellt werden. Keines der Tiere zeigte nach der Operation eine Wundheilungsstörung an der Operationswunde. Das Sozialverhalten der Tiere untereinander war ebenfalls unauffällig. Während des gesamten Zeitraums der Studie zeigten die Versuchstiere eine unbeeinträchtigte Futter- und Wasseraufnahme.

5.2.4.1. Standzeiten und Gewicht der Tiere

Zwei Wochen nach der jeweiligen Operation wurden die Versuchstiere in Gruppen von sechs Tieren zu einer Weide transportiert. Die Zeit von der Operation bis zur Euthanasie (postoperative Zeit) betrug bei den Tieren im Mittel 91 Tage +/- 5 Tage. Die genauen Standzeiten können der Tabelle 6 entnommen werden.

Nach Ablauf der Standzeit wurden die Tiere zurück in die tierexperimentelle Einrichtung transportiert und dort euthanasiert.

Das in der Versuchsplanung vorgesehene Gewicht der Tiere betrug circa 80,00 kg. Die Tiere wurden vor der Operation gewogen und wiesen hierbei ein durchschnittliches Gewicht von 71,43 kg (63,00 kg bis 83,00 kg) auf (siehe Tabelle 6). Hierdurch stellte sich ein Gewichtsunterschied von 20,00 kg zwischen dem leichtesten und schwersten Tier ein (Tabelle 6).

Schaf Nr.	Gewicht kg	Standdauer Tage	Schaf Nr.	Gewicht kg	Standdauer Tage
37	70,4	86,0	59	72,3	89,0
36	69,8	93,0	60	63,0	93,0
38	83,0	93,0	61	73,0	93,0
39	77,0	93,0	63	73,6	88,0
40	72,2	93,0	64	81,0	88,0
41	69,8	91,0	62	73,9	91,0
42	73,6	91,0	65	76,2	91,0
43	74,0	91,0	66	75,0	94,0
44	72,0	92,0	67	65,6	94,0
45	67,4	92,0	68	64,4	93,0
46	69,8	91,0	69	66,2	93,0
47	63,0	91,0	70	68,8	91,0
56	69,4	0 (Exitus postoperativ)	71	64,4	91,0
57	72,6	96,0	72	76,8	86,0
58	75,0	89,0	73	69,8	86,0

Tabelle 6: interne Versuchsnummer, Körpergewicht und Standzeit der Versuchstiere

5.2.5. Explantation

Bei der Explantation wurde deutlich, dass die Defektsetzung an unterschiedlichen Bandscheiben der Lendenwirbelsäule durchgeführt wurde und nicht, wie im Versuchsaufbau geplant, nur an der Bandscheibe im Lendenwirbelsegment L4/L5. Da keine Röntgenkontrolle durchgeführt wurde, wurde die Defektsetzung bei manchen Tieren auch an den Bandscheiben ein Segment oberhalb und unterhalb des geplanten Segmentes durchgeführt. Dies führte dazu, dass bei einem Tier bei der en-Bloc-Explantation durch die manipulierte Bandscheibe gesägt wurde. Auf Grund des Sägefählers wurde das Präparat der Gruppe B von der Auswertung ausgeschlossen (siehe Tabelle 7). Da keine Röntgenkontrolle nach der Operation durchgeführt wurde, konnte die genaue Anzahl der Defekte in den Bandscheiben anderer Segmente nicht bestimmt werden. Es verblieben 28 Präparate zur weiteren Auswertung: 7 Präparate bei denen eine reine Defektsetzung durchgeführt wurde und 21 Präparate mit Defektsetzung und Deckung mittels Implantat (siehe Tabelle 7). Die post mortem Untersuchung der Segmente umfasste die Beurteilung der makroskopischen Veränderungen und der histologischen Auswertung der im Anschluss angefertigten Präparate mittels Hämatoxylin/Eosin-Übersichtsfärbung.

Ergebnisse

Gruppe	Angewandte Methode	Anzahl der Tiere	Anzahl der auswertbaren Präparate	Bemerkung
A	Leerdefekt (Kontrollgruppe), ohne Substitution	6	7	+ 1 Tier/Präparat (intraoperativ zusätzlich aus Gruppe E zugeordnet)
B	Implantat ohne Zusatz	6	5	- 1 Tier/Präparat (operierte Bandscheibe bei Sektion durchsägt)
C	Implantat + partikuläres Freisetzungssystem für Arzneimittel	6	5	-1 Tier/Präparat (Exitus postoperativ)
D	Implantat + partikuläres Freisetzungssystem für Arzneimittel mit verkapseltem Faktor TECK (CCL25)	6	6	
E	Implantat + plättchenreichem Plasma (PRP) - Zusatz	6	5	-1 Tier/Präparat (intraoperativ keine Befestigung des Implantats möglich, zusätzlich zur Gruppe A zugeordnet)

Tabelle 7: Übersicht der Versuchstiergruppen und auswertbaren Präparaten mit Bemerkungen

5.2.6. Präparation und makroskopische Beurteilung

Der gesetzte Defekt war bei keinem der Tiere bei der Explantation makroskopisch zu erkennen. Auch weitere makroskopisch erkennbare Veränderungen an den Segmenten waren nicht vorzufinden. Zum Zeitpunkt der Explantation waren makroskopisch keine Unterschiede zwischen den Präparaten mit oder ohne Defektdeckung ersichtlich (siehe Abbildung 22 und Abbildung 23).

Durch die fehlende Röntgenkontrolle und der daraus folgenden Ungewissheit, welche Bandscheibe der Segmente manipuliert wurde, war das Wiederauffinden des nicht resorbieren Fadens erschwert. Nur durch eine sorgfältige Präparation war es möglich das nicht-resorbierbare Fadenmaterial an der Defektstelle wiederzufinden (siehe Abbildung 22 und Abbildung 23). Es konnte bei keinem Tier eine Disklokation des Implantats beziehungsweise des nicht-resorbierbaren Fadenmaterials beobachtet werden. Bei keinem der Präparate konnte eine Fremdkörperreaktion oder Granulombildung detektiert werden (siehe Abbildung 22 und Abbildung 23).

Die resorbierbaren Fäden und das Implantat waren nach den 3 Monaten bei allen Tieren makroskopisch nicht mehr zu erkennen (siehe Abbildung 22 und Abbildung 23).



Abbildung 22.: en-bloc Entnahme der Lendenwirbelsäule der Gruppe A (Leerdefekt) nach Sektion und erster Präparation. Die Skalpellspitze zeigt auf die Defektstelle, gekennzeichnet durch das nicht resorbierbare Nahtgut. Schaf Nr. 47.



Abbildung 23: en-bloc Entnahme der Lendenwirbelsäule der Gruppe E (PRP) nach Sektion und erster Präparation. Die Skalpellspitze zeigt auf die Defektstelle, gekennzeichnet durch das nicht resorbierbare Nahtgut. Schaf Nr. 45.

5.2.7. Histologische Auswertung der Bandscheibenpräparate

5.2.7.1. Hämatoxylin/Eosin-Färbung

Zur Hämatoxylin/Eosin-Übersichtsfärbung wurden nach Anfertigung von Kryoschnitten der Bandscheibenpräparate diese auf den Objektträgern mit Hämatoxylin gefärbt und dann mit Eosin gegengefärbt.

In der Hämatoxylin/Eosin-Übersichtsfärbung konnte bei den 28 gefärbten Präparaten die Defektstelle wiedergefunden werden. Es traten vereinzelt Färbeartefakte und Präparatrisse auf. Diese konnten jedoch eindeutig von pathologischen Veränderungen abgegrenzt werden. Bei keinem der Präparate konnten Implantatreste oder Reste des partikulären Freisetzungssystems für Arzneimittel gefunden werden. Lediglich das nicht resorbierbare Fadenmaterial ließ sich in der Färbung wiederfinden und stellte sich hierbei blau dar (siehe Abbildung 24). Folgend werden histologische Abbildungen der Gruppe A (Leerdeфекt) und stellvertretend für die Präparate mit Defektdeckung die histologischen Abbildungen der Gruppe D genutzt um die Ergebnisse zu veranschaulichen.

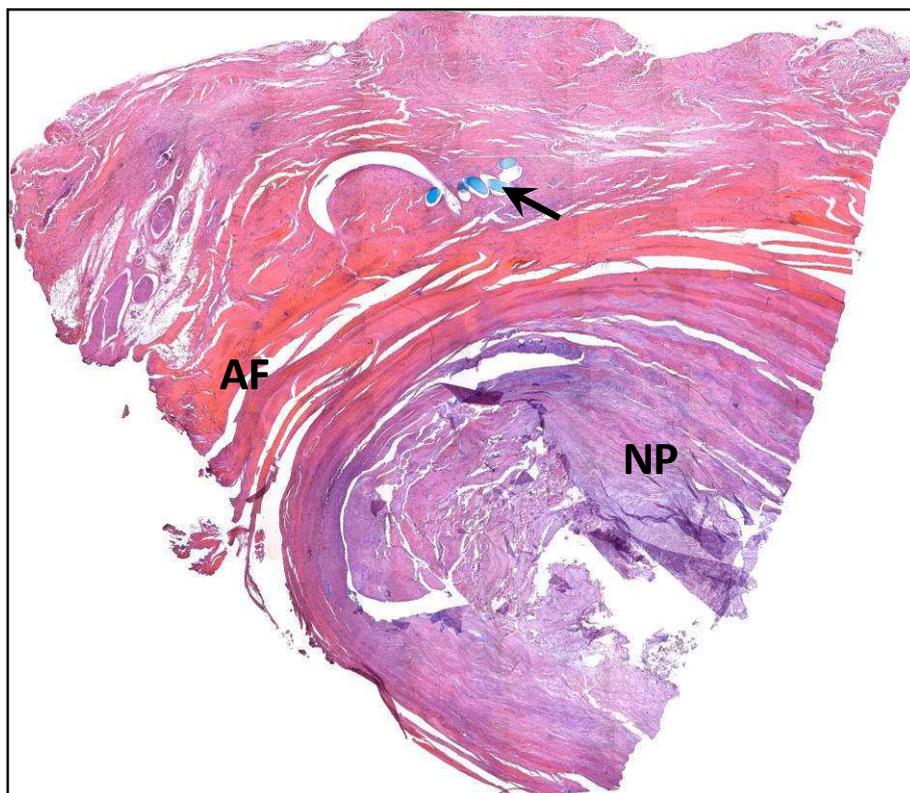


Abbildung 24: Anulus fibrosus Defekt der Gruppe D (TECK).

Ausschnitt der ovinen Bandscheibe nach Hämatoxylin/Eosin-Färbung. Pfeil zeigt auf Nahtmaterialreste. Nucleus pulposus (NP) und Anulus fibrosus (AF). Die Abbildung ist eine Übersicht und aus 100 einzelnen Aufnahmen in 50-facher Vergrößerung zusammengesetzt.

5.2.7.1.1. Defektgröße

Das Versuchsdesign sah eine definierte Defektgröße von 3,5mm x 3,5mm vor. Bei der histologischen Auswertung waren Abweichungen von der gewünschten einheitlichen Defektgröße zu beobachten. So wiesen die histologischen Präparate teils kleinere teils größere Defekte auf, sowohl in der zur Anulus fibrosus Oberfläche waagerechten Ausdehnung, als auch in der Tiefe des Defektes. Die Abbildung 25 zeigt einen Defekt der Gruppe A (Leerdefekt) mit geringer Defekttiefe. Im Vergleich dazu stellt sich in der Abbildung 26 ein Defekt mit einer größeren Defekttiefe dar. Begründen lässt sich die unterschiedliche Ausdehnung des Defektes damit, dass kein Instrument mit vordefinierter Tiefe, wie zum Beispiel ein Stanzwerkzeug, zur Defektsetzung verwendet wurde. Eine quantitative Analyse (Vermessung) der einzelnen Defekte um die Menge des enthaltenen Gewebes zu beurteilen und unter den Präparaten zu vergleichen, war somit nicht möglich.

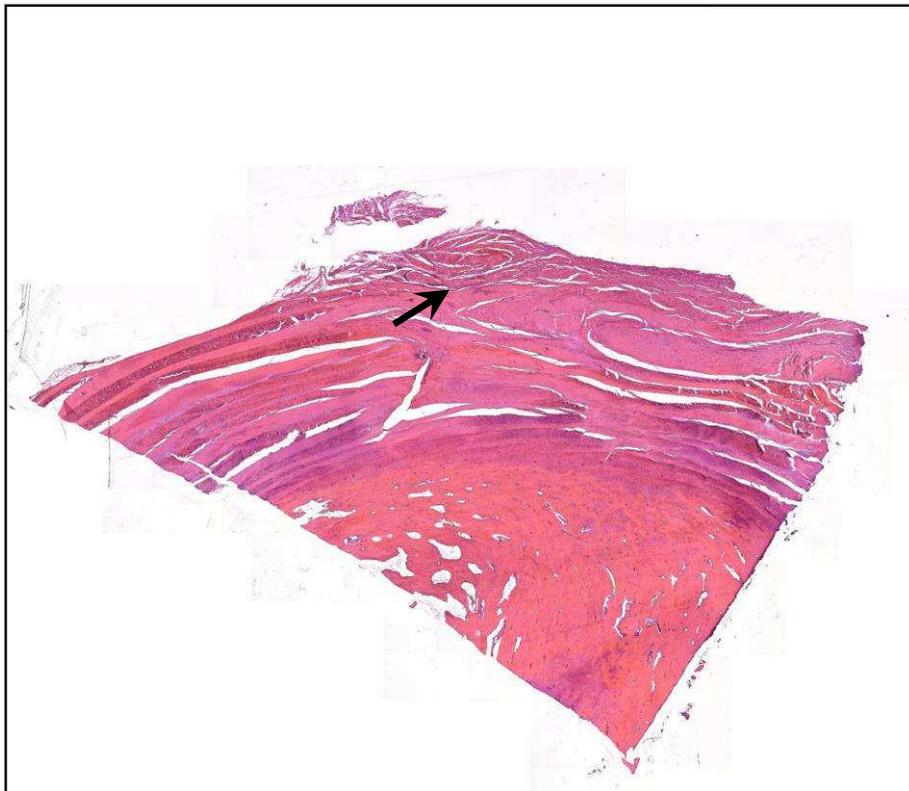


Abbildung 25: Anulus fibrosus Defekt der Gruppe A (Leerdefekt) mit geringer Defekttiefe

Ausschnitt der ovinen Bandscheibe nach Hämatoxylin/Eosin-Färbung. Die Abbildung ist eine Übersicht und aus 100 einzelnen Aufnahmen in 50-facher Vergrößerung zusammengesetzt.

5.2.7.1.2. Defektfüllung

Defekte nach 3 Monaten Standzeit

Die Anulus fibrosus Oberflächen der Defektregionen aller Präparate zeigten nach 3 Monaten eine vollständige Defektauffüllung mit Reparaturgewebe. Die Defektauffüllung erfolgte bis auf das Niveau der ursprünglichen Anulus fibrosus Oberfläche und teilweise wurde eine Hypertrophie des Gewebes über dieses Niveau hinaus beobachtet (siehe Abbildung 26). Nach den 3 Monaten zeigte sich in der histologischen Färbung bei allen Präparaten eine homogene Zellinfiltration. Das entstandene Gewebe zeigte bei allen Präparaten ein ähnliches Aussehen. Es lässt sich vermuten, dass die Präparate der Gruppe A: Leerdefekt im Vergleich zu den Präparaten mit Deckung mittels Implantat eine lockerere Füllung der Defekte zeigen. Eine qualitative Differenzierung des jeweiligen Defektinhaltes konnte mittels der Hämatoxylin/Eosin-Übersichtsfärbung nicht getroffen werden. Hierzu wären weitere Untersuchungen notwendig.

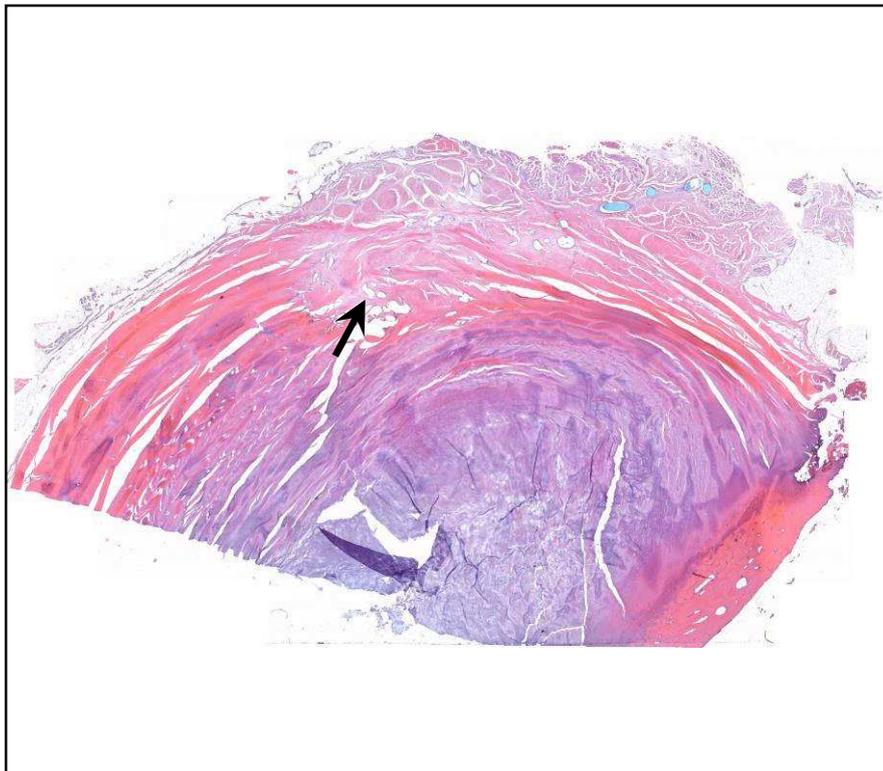


Abbildung 26: Anulus fibrosus Defekt der Gruppe A (Leerdefekt) mit größerer Defekttiefe

Ausschnitt der ovinen Bandscheibe nach Hämatoxylin/Eosin-Färbung. Die Abbildung ist eine Übersicht und aus 100 einzelnen Aufnahmen in 50-facher Vergrößerung zusammengesetzt.

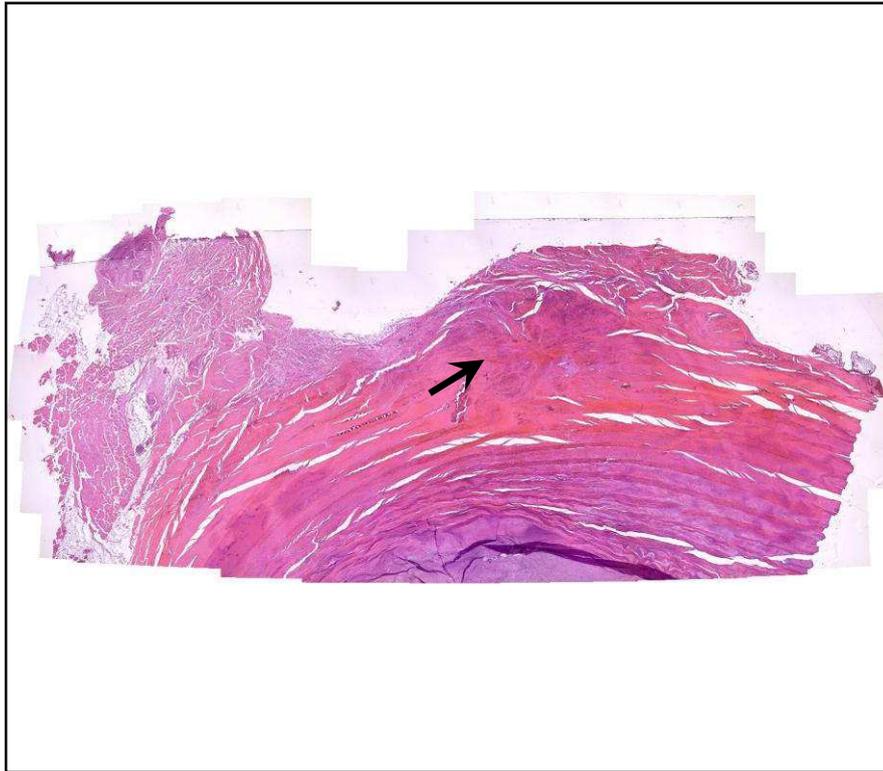


Abbildung 27: Anulus fibrosus Defekt der Gruppe D (TECK).

Ausschnitt der ovinen Bandscheibe nach Hämatoxylin/Eosin-Färbung. Die Abbildung ist eine Übersicht und aus 100 einzelnen Aufnahmen in 50-facher Vergrößerung zusammengesetzt.

5.2.7.1.3. Auftreten von Herniationen

Bei Betrachtung der histologischen Präparate konnte bei 2 von 7 Versuchstieren, also bei 28,6% der histologischen Präparate der Gruppe A (Leerdefekt) und 2 von 21, also bei 9,5% der histologischen Präparate mit Defektdeckung mittels Implantats (Gruppe B bis E) ein Vorfall von Nucleus pulposus Gewebe (Herniation) erfasst werden. Die Abbildung 28 und die Abbildung 29 stellen zwei Präparate mit einer dieser Herniationen dar. Bei 90,5% der Präparate, also bei 19 der 21 Versuchstiere, die mit einer Implantatdeckung behandelt wurden, stellte das Implantat eine wirksame Barriere für die Herniation von Nucleus pulposus Gewebe dar. Bei den Präparaten die eine Herniation aufwiesen, ist nicht erkenntlich ob diese während der Operation iatrogen oder im Anschluss in der postoperativen Phase entstanden sind.

Ergebnisse

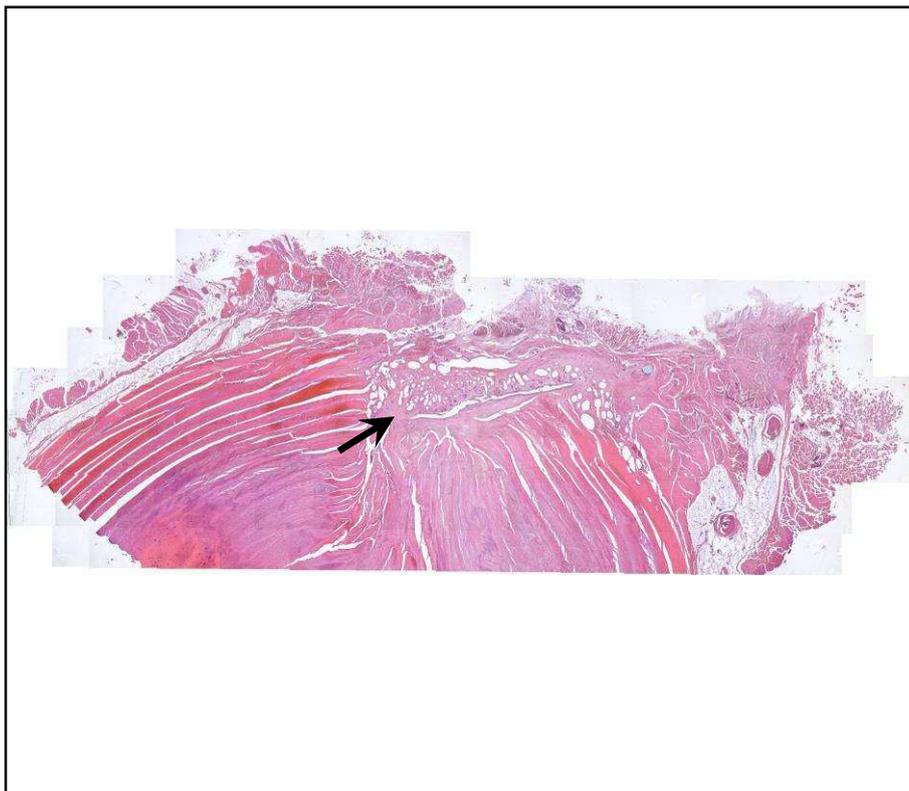


Abbildung 28: Anulus fibrosus Defekt der Gruppe A (Leerdefekt).

Pfeil zeigt auf Vorfall des Nucleus pulposus Gewebe. Ausschnitt der ovinen Bandscheibe nach Hämatoxylin/Eosin-Färbung. Die Abbildung ist eine Übersicht und aus 100 einzelnen Aufnahmen in 50-facher Vergrößerung zusammengesetzt.

Ergebnisse

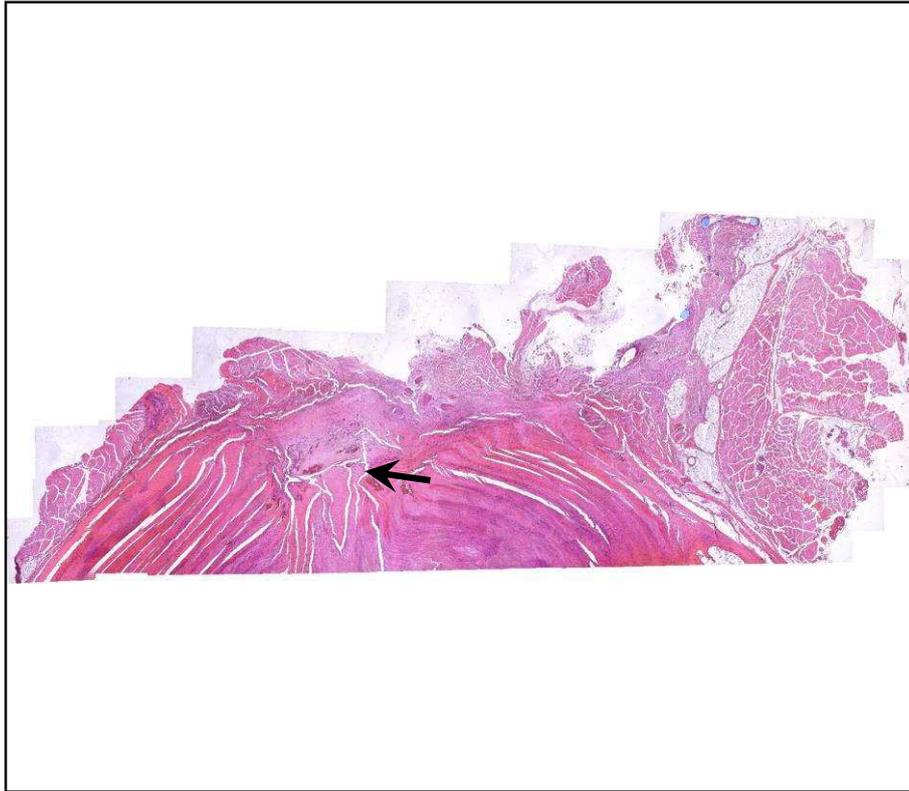


Abbildung 29: Anulus fibrosus Defekt der Gruppe A (Leerdefekt)

Pfeil zeigt auf Vorfall des Nucleus pulposus Gewebe. Ausschnitt der ovinen Bandscheibe nach Hämatoxylin/Eosin-Färbung. Die Abbildung ist eine Übersicht und aus 100 einzelnen Aufnahmen in 50-facher Vergrößerung zusammengesetzt.

6. Diskussion

6.1. Diskussion der Methodik

6.1.1. Tiermodell

In der Grundlagenforschung sind Tierversuche oft eine Vorstufe in der Entwicklung neuer Therapieansätze. Die Auswahl eines geeigneten Modells ist unabdingbar, um eine möglichst große Vergleichbarkeit der gewonnenen Daten auf den Menschen zu ermöglichen (Wilke 2008). Bei Modellen am Tier handelt es sich einerseits um Modelle, mit denen die Degeneration der Bandscheibe erforscht wird und andererseits um Modelle zur Untersuchung verschiedener Implantate und neuer Therapieansätze (Osti et al. 1990; Hegewald et al. 2015). Die Modelle bestehen meist daraus, die bei der Bandscheibendegeneration entstehenden Veränderungen in einem kürzeren Zeitrahmen zu imitieren (Lotz 2004; Hoogendoorn et al. 2008; Wiesner 2017) und kombinieren dies häufig mit der sich anschließenden Untersuchung weiterer Therapiemethoden.

Um die vorgegebenen Ziele der Bandscheibenforschung zu erreichen, müssen die Tiermodelle demnach verschiedene Bedingungen erfüllen. In der Bandscheibenforschung muss das Tiermodell eine Ähnlichkeit zur menschlichen Wirbelsäule und menschlichen Bandscheibe aufweisen, um reproduzierbar zu sein.

Es wurden in der Vergangenheit verschiedene Tiermodelle genutzt, um neue Therapieansätze der Bandscheibenforschung zu untersuchen. Es wurden bisher Modelle an Klein- und Großtieren wie zum Beispiel an Mäusen, Hunden, Ratten, Schweinen und Schafen genutzt (Alini et al. 2008).

Für die vorliegende Arbeit musste ein Tiermodell gewählt werden, welches eine vergleichbare Anatomie der Wirbelsäule und speziell der Bandscheibe des Tieres zu der des Menschen aufweist. Vergleichbare Gewebeeigenschaften, ein vergleichbarer operativer Zugangsweg und eine vergleichbare Defektgröße ermöglichen es, die Eigenschaften des Implantats und der Wirkstoffe so zu nutzen, wie auch in der späteren klinischen Anwendung am Menschen. Das Schaf bietet hierbei gegenüber anderen Tieren als Modell in der Wirbelsäulenforschung bestimmte Vorteile (Alini et al. 2008). Das Gewicht der Tiere, die vergleichbaren anatomischen, biomechanischen sowie statischen Eigenschaften der Wirbelsäule, sowie die Form, der Wassergehalt, der Kollagengehalt, die Hydratation und der Orientierungswinkel der Kollagenfasern der Bandscheibe machen das Schaf zum praktikablen und häufig verwendeten Modell der Bandscheibenforschung (Wilke et al. 1997a; Wilke et al. 1997b; Costi et al. 2002; Reid et al. 2002; Smit 2002; Schmidt und Reitmaier 2013; Mageed et al. 2013a; Mageed et al. 2013b). Die Lendenwirbelsäulenbandscheibe des Pavians und der Maus sind in der Anatomie

mit der des Menschen jedoch eher vergleichbar, als die des Schafs (O'Connell et al. 2006). Versuche an Primaten sind allerdings aus ethischen Gründen umstritten und im Gegensatz zum Schaf sehr kostspielig (Borrie 1960; Alini et al. 2008; Nuckley et al. 2008).

Auch Kleintiermodelle wurden in der Vergangenheit häufig genutzt (Lotz 2004; Alini et al. 2008). Durch die unterschiedlichen anatomischen Dimensionen und das lebenslange Vorhandensein notochordaler Zellen sind Kleintierbandscheiben allerdings nur begrenzt als Modell der humanen Bandscheibe geeignet (Butler 1988; Alini et al. 2008). Die Nutzung dieser Tierarten als Modell in der Untersuchung regenerativer Therapieansätze ist deshalb schwierig, da mit dem Vorhandensein dieser notochordaler Zellen auch ein erhöhtes Regenerationspotential in der Bandscheibe verbleibt (Alini et al. 2008). Im Gegensatz zu den meisten Kleintieren besitzt der erwachsene Mensch im Nucleus pulposus keine notochordalen Zellen mehr (Urban und Roberts 1995; Hunter et al. 2004; Alini et al. 2008).

Unsere Arbeitsgruppe konnte die bisher dokumentierten Erfahrungen anderer Arbeitsgruppen (Guder et al. 2009; Hegewald et al. 2015) in Hinsicht auf die Nutzung des Schafes als Bandscheibendegenerationsmodell bestätigen. Durch die vergleichbaren anatomischen Größenverhältnisse der Wirbelsäulen von Mensch und Schaf kamen bei der Operationstechnik einschließlich der verwendeten Instrumente und der Implantate dieselben Techniken zum Einsatz, wie sie auch unter klinischen Gegebenheiten am Menschen genutzt werden könnten.

Abschließend stellt das Schaf somit wie in vielen Studien bisher beschrieben und der in Punkt 3.1 näher erörterten Gesichtspunkte, ein akzeptables Modell für die *in vivo* Untersuchung von Anulus fibrosus Implantaten dar und wurde deshalb für diesen Versuch gewählt.

6.1.2. Versuchstiere

Das Ziel bei der Auswahl der Versuchstiere ist es, eine große Homogenität zu erreichen.

Hierzu wurden in der Versuchsplanung die Eckdaten der Tiere festgelegt. Die Tiere sollten einer bestimmte Rasse angehören, ein Alter von mindestens 5 Jahren haben und ein Gewicht von circa 80,00 kg aufweisen.

Die Versuchstiere gehörten alle der Rasse Merinofleischschaf an, waren weiblich und älter als 5 Jahre. Der Epiphysenfugenschluss findet bei Schafen bis zu einem Alter von 3,5 Jahren statt (Viera 1974; Ho et al. 1989). Damit ist Skelettreife bei einem Alter von mindestens 5 Jahren abgeschlossen. Durch die Auswahl von weiblichen Tieren gelang es, Unruhen und Rangordnungskämpfe in der postoperativen Haltung zu vermeiden.

Das Gewicht der Einzeltiere zeigte innerhalb der Gruppe Unterschiede. So betrug das Gewicht des leichtesten Tieres 63,00 kg und das Gewicht des schwersten Tieres 83,00 kg. Das mittlere

Gewicht der Tiere betrug 71,43 kg. Es ergab sich somit eine Differenz des Körpergewichts von 20,00 kg zwischen dem leichtesten und dem schwersten Tier. Trotzdem liegen die Tiere mit den Körpergewichten zwischen 63,00 kg und 83,00 kg im vergleichbaren Bereich des durchschnittlichen humanen Körpergewichtes. Nach dem Mikrozensus des Statistischen Bundesamtes von 2009 beträgt dieses 75,60 kg (Bundesamt(Destatis), Mikrozensus 2009 - Körpermaße der Bevölkerung, Tabelle 1: Körpergröße, Körpergewicht und Body-Mass-Index 2009 nach Geschlecht und Altersgruppen, 2011).

Der Gewichtsunterschied unter den Versuchstieren ist zu vernachlässigen, da er lediglich für das Handling während der Studie von Bedeutung war und keinen direkten Einfluss auf die Auswertung und die ermittelten Ergebnisse hatte.

6.1.3. Operation

Bei allen 30 Versuchstieren wurden über einen minimalinvasiven lateralen, parallel zu den Processus transversi verlaufendem, retroperitonealen Zugang operiert. Dieser Zugang wurde wie von Oehme et al. (2012) beschrieben durchgeführt. Hegewald et al. (2015) nutzten diesen Zugang ebenfalls, um ein Implantat zum Verschluss des Anulus fibrosus zu untersuchen. Beide Arbeitsgruppen (Oehme et al. 2012; Hegewald et al. 2015) konnten keine Komplikationen, wie zum Beispiel Blutungen und Nervenverletzungen, verzeichnen. Hegewald et al. (2015) beobachteten postoperativ zwei Fälle einer schweren Wundinfektion und geben an, dass als Folge dieser die betroffenen Tiere euthanasiert wurden.

Auch dorsale oder dorsolaterale Zugänge wurden als Operationsmethoden ebenfalls beschrieben. Diese werden unter anderem aufgrund des vom Menschen abweichenden Verlaufs der ovinen Spinalnerven als zu ungünstig beschrieben, um sie am Schaf zu verwenden (Baramki et al. 2000; Oehme et al. 2012; Hegewald et al. 2015). Bei Hegewald et al. (2015) kam es nach dorsalem Zugang zu einer hochgradigen Schwäche der Hinterhand zweier weiterer Tiere, wodurch diese euthanasiert werden mussten und auf den retroperitonealen Zugang umgestiegen wurde.

In den hier durchgeführten Operationen kam es bei keinem der 30 Versuchstiere zu einer der beschriebenen Komplikationen. Dennoch konnten nicht alle 30 Versuchstiere in den weiteren Verlauf der Untersuchung eingeschlossen werden, da ein Tier aufgrund von Narkosenachwirkungen postoperativ verstarb.

6.1.3.1. Operationszeiten

Oehme et al. (2012) gaben die Dauer der reinen Präparation der Wirbelsäule bei Durchführung des minimalinvasiven, lateralen, retroperitonealen Zugangs mit durchschnittlich 60 Minuten an.

Der zeitliche Ablauf der 30 von uns durchgeführten Operationen mit dem gleichen Zugang wurde ebenfalls dokumentiert. Es wurde je nach Versuchsgruppe entweder nur ein Defekt in den Anulus fibrosus gesetzt (Gruppe A) oder im Anschluss an die Defektsetzung zusätzlich mit einem Implantat gedeckt (Gruppe B bis E).

Die mittlere Operationszeit betrug bei reiner Defektsetzung 48 Minuten (25 Minuten bis 75 Minuten). Bei den Gruppen mit Deckung des Defektes mittels Implantats betrug die mittlere Operationsdauer 65 Minuten (40 Minuten bis 120 Minuten). Es war bei allen Operationen eine Lernkurve innerhalb des Versuchsverlaufs zu verzeichnen (siehe Abbildung 20 und Abbildung 21). Die Dauer des chirurgischen Eingriffs wurde hierbei mit dem Zeitpunkt des ersten Hautschnittes bis zum Zeitpunkt des Endes der Operation bei Vollendung der Naht und beginnender Ausleitung der Narkose des Tieres gemessen.

Im Vergleich zu Oehme et al. (2012) konnten wir im Mittel eine geringere Dauer für die reine Präparation und die Defektsetzung verzeichnen. Mit zunehmender operativer Erfahrung des Chirurgen speziell auf den durchgeführten Eingriff verkürzte sich zusätzlich die Operationsdauer.

6.1.3.2. Defektsetzung

Bei der Versuchsplanung zu beachten ist die sogenannte kritische Defektgröße. Ist diese erreicht, kommt es innerhalb des Versuchszeitraums nicht zu einer spontanen Ausheilung (Ahern et al. 2009). Verschiedene Arbeiten beschäftigten sich in der Vergangenheit mit Inzisionsarten und Defekttiefen und ihren Auswirkungen auf die manipulierte Bandscheibe (Ahlgren et al. 1994; Ahlgren et al. 2000). Beim Schaf wurde die kritische Größe von Knorpeldefekten am Knie mit einem Durchmesser von 7,0 mm angegeben (Ahern et al. 2009).

Schon Osti et al. (1990) beschrieben ein Degenerationsmodell durch eine chirurgische Defektsetzung an der Schafsbandscheibe. Dieses Modell untersuchte die nicht in den Nucleus pulposus eindringende Defektsetzung per kontrollierter Inzision von 5mm x 5mm Größe. Melrose et al. (2012) applizierten einen Defekt mit einer Größe von 20mm x 6mm, ohne dass es zu einem Vorfall von Nucleus pulposus Gewebe kam und gaben an, dass die Tiefe des Defekts mehr Auswirkung auf die Biomechanismen der Bandscheibe hat als die Breite des Defekts. Ahlgren et al. (2000) untersuchten drei Inzisionsarten in Form von Schlitz-, Kreuz- und Boxinzisionen am Schafsmodell. Die Defekte, die den Anulus fibrosus komplett

durchdringen, brachten dabei eine schnellere Degeneration und einen größeren Stabilitätsverlust mit sich als Defekte mit geringerer Defekttiefe, die nur die äußere Zone des Anulus fibrosus durchdringen (Ahlgren et al. 1994; Ahlgren et al. 2000; Melrose et al. 2012).

In der vorliegenden Studie wurde bei 30 ovinen Versuchstieren ein Defekt in den Anulus fibrosus gesetzt. Das vorliegende Versuchsdesign sah vor, dass der Defekt eine definierte Größe von 3,5mm x 3,5mm haben sollte. Dies wurde analog zu der Arbeit von Hegewald et al. (2015) durchgeführt, welche in einem vergleichbaren Versuchsaufbau ebenfalls eine Boxinzision mit einer definierten Größe von 3,5mm x 3,5mm nutzte, um ein resorbierbares Implantat am Schafsmodell zu untersuchen.

Nach Schneider-Wald et al. (2013) sollte zusätzlich bei der Auswahl der Defektgröße die Vergleichbarkeit zur humanen Situation hergestellt werden. Aus diesem Grund wählten Hegewald et al. (2015) die verwendete Defektgröße. Da es bei humanen Bandscheibenvorfällen bei vergleichbar großen Defekten des Anulus fibrosus zum erneuten Auftreten von Herniationen (27%) und zur höchsten Reoperationsrate von 21% (Carragee et al. 2003) kam. Die sogenannte kritische Defektgröße sollte aber, wie schon erwähnt, bei der Auswahl nicht überschritten werden, da diese Defekte nicht spontan ausheilen.

Hegewald et al. (2015) stellten bei gleicher Defektgröße eine erste deutliche Ausbildung von Reparaturgewebe nach sechs bis zwölf Wochen fest und gaben an, dass dabei die Bildung von Reparaturgewebe mit der Zeit anstieg. Deshalb wählte auch unsere Forschungsgruppe den Zeitpunkt der Auswertung 3 Monate nach der Operation.

Die Untersuchung nach 3 Monaten zeigte, dass die Defektgröße unterschiedlich ausfiel.

Im Vergleich zu Hegewald et al. (2015) wird rückblickend deutlich, dass während der Operation die gewünschte Defekttiefe nicht erreicht wurde, da nicht wie bei Hegewald et al. (2015) beschrieben, Nucleus pulposus Gewebe während der Operation koaguliert werden musste. Dies bestätigte sich auch in der späteren histologischen Auswertung.

Da kein standardisiertes Instrument mit zuvor definierter Tiefe zur Defektsetzung genutzt wurde, wiesen die Präparate teils kleinere, teils größere Defekte auf.

Um eine quantitative Analyse (Vermessung) der Defektfüllung, also der Menge des enthaltenen Gewebes, durchzuführen und unter den Präparaten zu vergleichen, wäre eine standardisierte Defekttiefe notwendig. Matz (2010) verwendete zur Defektsetzung in den ovinen Kniegelenksknorpeln eine Hohlfräse mit einer Millimeterskalierung, alternativ wäre ein Stanzwerkzeug mit einer vordefinierten Tiefe denkbar. Lim et al. (2017) nutzten im Degenerationsmodell zur Defektsetzung an der ovinen Bandscheibe einen Bohrer mit einem Tiefenbegrenzer (Bohrstopp). Mit diesen Instrumenten ließe sich eine definierte Defekttiefe einstellen und im Anschluss eine quantitative Auswertung vornehmen.

Während der Operation überprüften Hegewald et al. (2015) mit einer fluoroskopischen Echtzeituntersuchung die Lokalisation des gewünschten Segmentes.

Eine zweifelsfreie Identifikation der Bandscheibe zwischen den geplanten Wirbelkörpern vier und fünf fand bei der hier durchgeführten Studie nicht statt.

Die bei der späteren Untersuchung durchgeführten Präparationen der Wirbelsäulensegmente bestätigten, dass nicht immer die vorgesehene Bandscheibe manipuliert wurde.

Da die Anzahl der Lendenwirbelkörper des Schafes variiert (Frewein et al. 2003; Salomon et al. 2008), wäre es von Vorteil gewesen, intraoperativ zu röntgen, denn nur so wäre die vorgesehene Bandscheibe zweifelsfrei identifiziert worden.

6.1.3.3. Defektdeckung

Die Defektdeckung gestaltete sich intraoperativ schwierig. Vor allem die vor Einbringen des Implantats durchgeführte Befestigung der Fäden an den Ecken des Defektes erforderte jeweils mehrere Versuche zur korrekten Platzierung der Naht. Hierdurch wurde dem Anulus fibrosus neben dem Defekt zusätzlicher Schaden zugefügt.

Bei einem Versuchstier, das ursprünglich mit dem Implantat behandelt werden sollte, war es nicht möglich, das Implantat zu befestigen. Trotz mehrerer Versuche riss das Fadenmaterial, sobald Knoten gesetzt wurden, aus dem Gewebe aus. Das Versuchstier wurde nach wiederholt frustrierten durchgeführten Versuchen intraoperativ der Gruppe A (Leerdefekt) zugeteilt (siehe Tabelle 7).

Die in der vorliegenden Studie genutzte Technik, zuerst die Fäden an den Ecken des Defektes zu applizieren, im Anschluss das Implantat auf die Fäden „aufzufädeln“, mit Hilfe einer Pinzette auf den Defekt hinunter zu schieben und die Fäden außerhalb der Wunde zu verknüpfen und hinunter zu schieben, erforderte viel Geschick des Chirurgen.

Der gewählte Hautschnitt und das tiefliegende, enge Operationsfeld, machten eine Befestigung des Implantats und ein Verknüpfen des Fadenmaterials direkt auf dem Implantat nicht möglich.

Nach der Befestigung des Implantats lagen vier Knoten des Nahtmaterials auf dem Defekt vor. Einer der Knoten bestand aus nicht resorbierbarem Nahtmaterial um eine spätere einwandfreie Identifikation der Bandscheibe zu ermöglichen.

Knoten, die in den Spinalkanal hervorragen, können Irritationen hervorrufen und sollten deshalb möglichst nicht verwendet werden (Suh et al. 2015).

Schon bei Hegewald et al. (2015) waren bei vergleichbarem Versuchsdesign mehrere Versuche zur korrekten Platzierung der Naht nötig und die Forschungsgruppe betonte die Notwendigkeit eines Applikationsinstrumentes. Dies bestätigte unsere Arbeitsgruppe ebenfalls.

Alternativ wäre zu überdenken, ob eine Veränderung der Implantatstruktur, wie zum Beispiel von Guillaume et al. (2014) in Form eines schwellbaren Scaffolds genutzt, möglich ist. Das von Guillaume et al. (2014) schwellbare Scaffold wurde im komprimierten Zustand in einen Defekt eingebracht und füllte diesen durch anschließendes Aufquellen aus. Das Implantat wurde bisher nur *in vitro* untersucht, wodurch sich keine Aussagen über eine ausreichende Stabilität und Integration *in vivo* treffen lässt (Guillaume et al. 2014; Guillaume et al. 2015).

In Bezug auf die Befestigung des Implantats lässt sich abschließend sagen, dass erst durch die Befestigungsmethode in Kombination mit einem Applikationsinstrument die zusätzliche Schädigung des umliegenden Anulus fibrosus vermieden werden kann und das Verfahren klinisch sicher, reproduzierbar und praktikabel anwendbar wird. Aktuelle Determinante des verwendeten Befestigungsverfahrens zum Schritt in die klinische Anwendung und damit zur Akzeptanz in der chirurgischen Gemeinschaft ist die fehlende, sicher reproduzierbare Anwendung und damit die einfache Integration des Verfahrens in die bestehenden chirurgischen Operationsmethoden.

6.1.4. Postoperativer Verlauf und Anfertigung der Präparate

Im Anschluss an die Operationen erfolgte die Haltung der Tiere in Weidehaltung.

Nach der 3-monatigen Standzeit wurden die Tiere zurück in die tierexperimentelle Haltung transportiert und nach einer Abschlussuntersuchung euthanasiert. Der Euthanasie folgte eine en-bloc Resektion der Lendenwirbelsäulen der Tiere und die weitere Präparation der manipulierten Bandscheiben. Bei der Gewinnung und Aufarbeitung der Proben wurde erneut deutlich, dass eine Lagekontrolle der manipulierten Bandscheibe fehlte. Eine Lagekontrolle würde die Orientierung während der Präparation erleichtern. Es ließen sich keine strukturellen Veränderungen an den Präparaten durch den Demineralisierungsprozess beobachten. Durch die fehlende Kontrolle der Lage kam es zu einem Sägefehler und das betroffene Präparat musste von der Auswertung ausgeschlossen werden. Der Ausfall des Präparats ist somit auf einen Fehler in der Versuchsplanung zurückzuführen. Weitere Versuche sollten eine Lagekontrolle vorsehen, um diese Ausfälle zu verhindern. Dieser Fehler der Versuchsplanung hatte keinen direkten Einfluss auf die Auswertung der restlichen Präparate und die ermittelten Ergebnisse.

6.2. Diskussion der Ergebnisse

6.2.1. *in vitro* Untersuchungen

6.2.1.1. Chemotaxis oviner Anulus fibrosus Zellen

Das Anulus fibrosus Tissue Engineering basiert auf der Verwendung von Zellen oder sogenannten Gerüsten (Scaffolds) oder einer Kombination dieser Komponenten zur regenerativen Therapie (Li und Kong 2015). Ein Teil des Tissue Engineering bilden zellfreie Therapieansätze. Diese versuchen Zellen aus der Umgebung eines Defektes durch bestimmte Stoffe in den Defekt zu locken und dort zur Differenzierung in das ursprüngliche Gewebe anzuregen. Die eingesetzten Lockstoffe, zum Beispiel Chemokine, regen hierbei die Zellen *in situ* zur Migration aus dem umliegenden Gewebe an.

Hegewald et al. (2012) zeigten, dass auch humane Anulus fibrosus Zellen sich durch verschiedene Stoffe wie Chemokine stimulieren lassen. Das in der vorliegenden Arbeit genutzte Chemokin TECK konnte *in vitro* mesenchymale Vorläuferzellen am Beispiel von Periostzellen und mesenchymalen Zellen dosisabhängig zur Migration anregen (Stich et al. 2008; Binger et al. 2009; Endres et al. 2010; Ullah et al. 2013). Das Chemokin TECK ist als Rezeptorligand für den Chemokinrezeptor CCR9 und als Lockstoff für Lymphozyten, dendritische Zellen und Makrophagen bekannt (Murphy et al. 2000). *In vitro* und *in vivo* ist der Einfluss des Chemokins TECK auf ovine Anulus fibrosus Zellen noch nicht untersucht worden. Als Teil des Versuchsziels, einen *in vivo* Tissue Engineering Ansatz in Form eines resorbierbaren Beispiel-Implantats in einer Kombination mit dem Chemokin TECK am Schafsmodell zu untersuchen, wurde vorab *in vitro* die Wirkung des human rekombinanten Chemokins auf ovinen Anulus fibrosus Zellen getestet.

Um die Frage zu klären, inwieweit ovine Anulus fibrosus Zellen sich überhaupt von einem human rekombinanten Chemokin zur Migration anregen lassen, wurde die Chemotaxis zum Chemokin TECK untersucht. In der Abbildung 16 ist das Ergebnis unterschiedlicher Konzentrationen des Chemokins TECK auf die Zellen drei oviner Spendertiere dargestellt.

Die hier vorliegende Arbeit zeigt, dass das Chemokin TECK die ovinen Anulus fibrosus Zellen dosisabhängig zur Migration anregen kann. Der Rezeptorligand des human rekombinanten Chemokins geht also nicht nur mit dem humanen Chemokinrezeptor, sondern auch mit dem der ovinen Anulus fibrosus Zellen eine Bindung ein.

Mit diesem Ergebnis war die Voraussetzung zum Einsatz eines human rekombinanten Chemokins für die *in vivo* Untersuchung am Schafsmodell gegeben, da das Chemokin TECK in einer Konzentration von 750 nM und 1000 nM die ovinen Anulus fibrosus signifikant zur Migration anregen konnte.

6.2.1.2. 3D-Zellkultur oviner Anulus fibrosus Zellen

Ziel dieses *in vitro* Versuchs war es, die Wirkung des Implantats in Kombination mit dem Chemokin TECK und dem PRP für den folgenden *in vivo* Versuch am Schaf zu evaluieren.

Der *in vitro* Versuch sollte Aufschluss darüber geben, ob das human rekombinante Chemokin TECK und das verwendete PRP einen Einfluss auf die Proteoglykanbildung der ovinen Anulus fibrosus Zellen haben. Hierzu wurden die Ansätze der 3D-Zellkultur nach 19 Tagen der Kultivierung zum Nachweis von Proteoglykanen mittels Alcianblau 8GS-Färbung und Safranin-O-Färbung untersucht. Gleichzeitig wurde durch eine PI-FDA-Färbung überprüft, ob einer der später im Tierversuch eingesetzten Stoffe *in vitro* einen Einfluss auf die Vitalität der ovinen Anulus fibrosus Zellen hat.

Die Überlebensfähigkeit humaner Anulus fibrosus Zellen konnte in 3D-Zellkulturen mit einer PI-FDA-Färbung über einen Zeitraum von 21 Tagen nachgewiesen und eine Bildung von Proteoglykanen detektiert werden (Cabraja et al. 2012). Hondke et al. (2018) konnten in einer 3D-Zellkultur in Kombination mit PRP über einen Zeitraum von 14 Tagen vitale humane Anulus fibrosus Zellen mittels PI-FDA-Färbung nachweisen.

Dabei konnte die Arbeitsgruppe (Hondke et al. 2018) in der Alcianblau 8GS-Färbung und in der Safranin-O-Färbung dieser 3D-Zellkulturen nahezu keine Bildung von Proteoglykanen in der Anwesenheit von PRP beobachten.

In der hier vorliegenden Arbeit gelang es zum Untersuchungszeitpunkt nach 19 Tagen (Ende des Kultivierungszeitraums) in allen Ansätzen der 3D-Zellkulturen vitale ovine Anulus fibrosus Zellen nachzuweisen. Das Implantat, das partikuläre Freisetzungssystem für Arzneimittel, das eingesetzte Chemokin TECK und das PRP hatten somit im untersuchten Zeitraum keinen Einfluss auf die Vitalität der Zellen.

Nach 19 Tagen der Kultivierung wurden mit der Alcianblau 8GS-Färbung und der Safranin-O-Färbung Proteoglykane im Ansatz mit dem Implantat in Kombination mit dem partikulären Freisetzungssystem für Arzneimittel ohne das Chemokin TECK (Gruppe 3) nachgewiesen. Proteoglykane wurden auch im Ansatz mit dem Implantat in Kombination mit dem partikulären Freisetzungssystem für Arzneimittel mit 400ng Konzentration an verkapseltem TECK (Gruppe 4) nachgewiesen. Im Ansatz, mit dem Implantat (Gruppe 1) ließ sich keine Proteoglykanbildung detektieren.

Im Ansatz mit PRP im Kultivierungsmedium (Gruppe 2) zeigten die ovinen Anulus fibrosus Zellen in der 3D-Zellkultur nahezu keine Bildung von Proteoglykanen. Das Ergebnis bei Einsatz von PRP, also eine nahezu nicht erfolgte Proteoglykanbildung, ist vergleichbar zu bereits publizierten Ergebnissen mit humanen Anulus fibrosus Zellen (Hondke et al. 2018). Im Gegensatz dazu konnte in der Vergangenheit der Einsatz von PRP (10%) in der 3D-Zellkultur mit Anulus fibrosus Zellen des Schweins eine vermehrte Bildung von Proteoglykanen erzielen (Akedo et al. 2006).

Diese unterschiedlichen Ergebnisse könnten durch die verschiedenen Methoden zur Herstellung des PRPs zustande kommen, durch die es zu einer ungleichen Konzentration der verschiedenen Wachstums- und Differenzierungsfaktoren, der Thrombozyten und der Leukozyten kommt (Weibrich et al. 2002; Kruger et al. 2013; Hondke et al. 2018).

Aus den Ergebnissen geht dabei nicht hervor, weshalb im Ansatz mit dem partikulären Freisetzungssystem für Arzneimittel ohne Chemokin (Gruppe 3) eine Proteoglykanbildung stattgefunden hat.

Mit diesem Ergebnis war die Voraussetzung zum Einsatz eines human rekombinanten Chemokins für die *in vivo* Untersuchung am Schafsmodell gegeben, da die ovinen Anulus fibrosus Zellen *in vitro* in Anwesenheit des human rekombinanten Chemokins TECK in den 3D-Zellkulturen Proteoglykane bilden können.

Weiterführende Untersuchungen, um den Einfluss des verwendeten Chemokins TECK und des PRPs auf die Bildung von Kollagen Typ I und II durch die ovinen Anulus fibrosus Zellen nachzuweisen, wären von Interesse.

6.2.2. Tierversuch

6.2.2.1. Makroskopische und histologische Auswertung

Im folgenden Abschnitt werden die Ergebnisse des Tierversuchs diskutiert. Die Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war zu untersuchen, ob das ovine Tiermodell für die Evaluation des Heilungsverlaufs von Anulus fibrosus Defekten nach Versorgung mit Implantaten geeignet ist. Hierzu wurde der Einfluss des Implantats auf die Geweberegeneration und auf die Stabilität untersucht.

Das nicht-resorbierbare Fadenmaterial ließ bei der Explantation in 100% der Fälle eine Identifizierung der manipulierten Bandscheibe zu. Bei der Explantation war bei keinem der Versuchstiere der gesetzte Anulus fibrosus Defekt makroskopisch erkennbar. Auch Veränderungen der umliegenden Strukturen waren nicht vorzufinden. Makroskopisch waren bei den verschiedenen Versuchstiergruppen keine Unterschiede zwischen den Präparaten mit oder ohne Defektdeckung sichtbar. Ebenfalls gab es makroskopisch bei keinem der Präparate eine Implantatdislokation.

Implantatdislokation, häufig aus unzureichender Befestigung der Implantate resultierend, stellt eines der Hauptprobleme in Hinsicht auf die primäre Implantatstabilität der Anulus fibrosus Verschlusstechniken dar (Hegewald et al. 2015). So untersuchte eine Forschungsgruppe die Versiegelung des Anulus fibrosus durch ein Polymer, welches bei der makroskopischen Untersuchung zu 100% außerhalb des Anulus fibrosus vorlag (Brand 2003).

Hegewald et al. (2015) konnten bei Verwenden einer Nahttechnik zur Befestigung des Implantats ebenfalls keine Implantatdislokation verzeichnen.

In der Hämatoxylin/Eosin-Färbung zeigte das genutzte Implantat eine gute Biokompatibilität sowie eine gute Biodegradation, da bei keinem der Präparate nach 3 Monaten zum Untersuchungszeitpunkt Implantatreste, Reste des partikulären Freisetzungssystems für Arzneimittel oder Materialunverträglichkeiten vorgefunden wurden.

Alle Präparate wiesen im Defektbereich eine homogene Zellinfiltration auf. Zum Untersuchungszeitpunkt ließ sich in der Hämatoxylin/Eosin-Färbung bei 2 der 7 Präparate der Leerdefektgruppe (28,6%) in den Anulus fibrosus Defekt vorgefallenes Nucleus pulposus Gewebe beobachten. Von den mit dem Implantat behandelten Versuchstieren ließ sich bei 2 der 21 angefertigten Präparate (9,5%) ein vorgefallenes Nucleus pulposus Gewebe nachweisen. Bei den Präparaten, die eine Herniation aufwiesen, ist nicht erkenntlich gewesen, ob diese während der Operation iatrogen oder im Anschluss an die Operation in der postoperativen Phase entstanden ist. Da es während der Operation nicht notwendig war, Nucleus pulposus Gewebe zu koagulieren, wie es von Hegewald et al. (2015) bei der genutzten Defektgröße von 3,5mm x 3,5mm beschrieben wurde, lässt sich abschließend vermuten, dass die Herniationen erst in der postoperativen Phase und nicht iatrogen während der Operation entstanden sind.

Um den Heilungsverlauf über die dreimonatige postoperative Standzeit darzustellen, wären zusätzliche Untersuchungen notwendig gewesen. Untersuchungen zum Heilungsverlaufs könnten eine Aussage zur Primärstabilität des Implantats erlauben (Hegewald et al. 2015). Nach Hegewald et al. (2015) ist diese Primärstabilität eines Implantats, gerade bei einem schon vorgeschädigten humanen Anulus fibrosus und die hierdurch möglicherweise verlängerte Dauer der biologischen Integration des Implantats, von großer Bedeutung.

Die Hämatoxylin/Eosin-Färbung ermöglichte keine Differenzierung des entstanden Regeneratgewebes. Inwieweit das Implantat somit eine chondroinduktive Wirkung und damit einen Einfluss auf die Knorpelgeweberegeneration in qualitativer Hinsicht hat, konnte mit den durchgeführten Untersuchungen nicht beurteilt werden. Mit der Applikation eines einheitlich großen Defektes wäre ein direkter Vergleich des im Anschluss gebildeten Regeneratgewebes der einzelnen Präparate zueinander möglich gewesen. Unterschiedliche histomorphologische Scoring-Systeme, auch kurz als Scores bezeichnet, sind bekannt und wären hier denkbar, um mit Hilfe von vorab definierten Kriterien den Regenerationsgrad und die Gewebequalität zu klassifizieren und die Aussagekraft der histologischen Untersuchung zu verbessern (Matz 2010).

Die Hypothese, dass das zellfreie Implantat in Kombination mit den verschiedenen Wirkstoffgruppen das Reparaturverhalten an der Defektstelle erhöht und dass es durch die Defektdeckung zu einem deutlicher ausgeprägten Reparaturverhalten kommt, konnte nicht beurteilt werden.

Das genutzte Versuchsdesign ermöglichte in einem ovinen Bandscheibenschädigungsmodell die Untersuchung eines Anulus fibrosus Implantats in Hinsicht auf seine Biodegeneration und auf seine Stabilität. In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass eine Versiegelung des Anulus fibrosus mit dem genutzten Implantat möglich war. Das verwendete Implantat war bei 90,5% der mit Implantat behandelten Versuchstiere in der Lage einen Verschluss der Bandscheibe zu ermöglichen und somit eine wirksame Barriere für das Hervortreten von Nucleus pulposus Gewebe darzustellen.

Zusammenfassend zeigte das untersuchte Implantat in der Funktion als mechanische Barriere und in Bezug auf seine Biodegradation vielversprechende Ergebnisse im genutzten Schafmodell.

Allerdings konnte das genutzte Versuchsdesign die Beurteilung in Hinsicht auf die unterschiedlichen Quantitäten und die Qualitäten des entstandenen Regeneratgewebes zwischen den einzelnen Gruppen nicht ermöglichen und zeigte verbesserungsbedürftige Aspekte. Die detektierten Fehlerquellen wie die unterschiedliche Defektgröße, die fehlende Lagekontrolle der manipulierten Bandscheibe sowie die fehlende Darstellung des Heilungsverlaufs sollten zukünftig eliminiert werden, um die Aussagekraft der Ergebnisse zu erhöhen.

Ob das Implantat eine Verbesserung des Reparaturverhaltens an der Defektstelle im Vergleich zu den Kontrolldefektgruppen ermöglicht, wäre ein interessanter Schwerpunkt zukünftiger Untersuchungen. Weitere Schwerpunkte können die Etablierung eines Applikationsinstrumentes zur praktikableren Befestigung des Implantats sowie die qualitative Untersuchung des Regeneratgewebes und damit die Beurteilung des Einflusses der genutzten Stoffe auf die Geweberegeneration sein.

Zusätzliche Forschungsarbeit ist notwendig bevor das genutzte Implantat klinische Anwendung findet und ein mögliches Therapieverfahren für die Anulus fibrosus Defektheilung darstellen kann.

Vorbehaltlich der nicht erhobenen Ergebnisse zur Qualität des entstandenen Gewebes, ist unseren Ergebnissen zufolge das ovine Lendenwirbelsäulensegment L4/5, sowie die benachbarten Segmente des Schafes als Modell für die chirurgische Manipulation sowie als Modell für die Untersuchung neuer Implantate geeignet.

7. Zusammenfassung

Die operative Versorgung von Bandscheibenvorfällen umfasst häufig die Entfernung des prolabierte Gewebes und den sich anschließenden Ersatz des Nucleus pulposus. Durch den hierzu gesetzten Zugang über den Anulus fibrosus kommt es, neben dem schon bestehenden Schaden im Anulus fibrosus, häufig zu einer weiteren Defektsetzung und damit zur weiteren Schädigung des Anulus fibrosus. Zahlreiche experimentelle Studien über die Therapie von Bandscheibenveränderungen berichten von Ergebnissen zur regenerativen und restaurativen Versorgung des Nucleus pulposus. Der Erfolg dieser Therapiemethoden hängt maßgeblich von der funktionellen Wiederherstellung des Anulus fibrosus ab, da nur ein intakter Anulus fibrosus den Druckverhältnissen innerhalb der Bandscheibe standhalten und damit eine erneute Herniation verhindern kann. Therapieansätze, die sich mit dem Regenerationspotential des Anulus fibrosus beschäftigen, werden unter dem Begriff Anulus fibrosus Tissue Engineering zusammengefasst. Sie basieren auf der Nutzung von verschiedenen Gerüsten (Scaffolds) und von Zellen zur Regeneration.

Das Ziel dieser Arbeit war zu bewerten, ob das genutzte Modell geeignet ist, diese Implantate zur Therapie von Anulus fibrosus Defekten auf ihre Eignung zu prüfen.

Als Prüfpräparat wurde in der vorliegenden Arbeit erstmals ein Implantat in Kombination mit einem human rekombinanten Chemokin TECK (CCL25) und in Kombination mit PRP in einem *in vivo* Versuch zur Anulus fibrosus Defektheilung im Schafmodell auf seine Bioverträglichkeit und seine Stabilität getestet. Da es sich bei dem Chemokin TECK um ein human rekombinantes Chemokin handelt, wurde vorab die Wirkung des Chemokins auf ovine Anulus fibrosus Zellen *in vitro* in einem Chemotaxisassay und in einer 3D-Zellkultur untersucht. *In vitro* konnte das human rekombinante Chemokin TECK die ovinen Anulus fibrosus Zellen dosisabhängig zur Migration anregen und dies in einer Konzentration von 750nM und 1000nM signifikant. Der Rezeptorligand des human rekombinanten Chemokins TECK geht demnach nicht nur mit humanen Zellen eine Bindung ein, sondern auch mit dem Chemokinrezeptor oviner Anulus fibrosus Zellen. Zusätzlich konnten die ovinen Anulus fibrosus Zellen in der 3D-Zellkultur in Anwesenheit des human rekombinanten Chemokins TECK Proteoglykane bilden. In Kombination mit dem verwendeten PRP bildeten die ovinen Anulus fibrosus Zellen nahezu keine Proteoglykane. Die Grundlage für die sich anschließende Verwendung des human rekombinanten Chemokins TECK, im tierexperimentellen Versuch am Schaf, konnte mit diesen *in vitro* Versuchen erstmals nachgewiesen werden.

Im folgenden Tierversuch wurden über einen retroperitonealen Zugang 3,5mm x 3,5mm große Defekte in den Anulus fibrosus der Lendenwirbelsäulenbandscheibe von 30 ovinen Versuchstieren appliziert. Hierbei wurden die Versuchstiere randomisiert in 5 Gruppen à 6 Tiere (Gruppen A bis E) eingeteilt. Gruppe A (Leerdekt) stellte die Kontrollgruppe zur

Zusammenfassung

Überprüfung der körpereigenen Reaktions- und Regenerationsmechanismen dar, bei der ein Defekt in den Anulus fibrosus gesetzt und anschließend nicht mit einem Implantat verschlossen wurde. Bei den Gruppen B bis E wurde der Defekt mit verschiedenen Prüfpräparaten und Wirkstoffkombinationen gedeckt. Eine makroskopische und histologische Auswertung wurde nach 3 Monaten Standzeit der Tiere durchgeführt.

Das beschriebene Modell ist geeignet, Implantate auf ihre Eignung zu prüfen, da:

- das ovine Versuchstier ein akzeptables Modell für die Untersuchung neuer Therapien in Form von Implantaten zur Anulus fibrosus Defektheilung darstellte, weil vergleichbare anatomische Größenverhältnisse zum Menschen vorliegen und bei der verwendeten Operationstechnik (Instrumente und Implantate) dieselben Techniken zum Einsatz kamen, wie sie auch unter klinischen Gegebenheiten am Mensch genutzt werden sollen. In Summe sind das Modell und die Operationstechnik damit auf den Menschen übertragbar und das Modell geeignet, dies zu zeigen.
- der genutzte retroperitoneale Zugang, sowie die Defektsetzung mit Skalpell und Pinzette sich bei allen Tieren mit steigender Effizienz reproduzierbar durchführen ließen.
- das genutzte Befestigungsverfahren in Form von Nahtmaterial an den vier Ecken des Implantats, eine Dislokation der Implantate sicher verhindern konnte.
- die Explantation, die Präparation und die Herstellung der Präparate reproduzierbar durchführbar waren.
- die genutzte histologische Hämatoxylin/Eosin-Färbung sich als zuverlässiges Diagnostikum erwies, um die Biodegeneration des Implantates, die Herniationsraten und damit die Defektstabilität zu evaluieren.

Bei erneuter Anwendung des beschriebenen Modells, sollte jedoch das Befestigungsverfahren modifiziert werden, um eine klinische, sichere, reproduzierbare Anwendung und die einfache Integration des Verfahrens in die bestehenden chirurgischen Arbeitsabläufe zukünftiger Studien zu ermöglichen. Für das genutzte, anspruchsvolle Befestigungsverfahren sollte ein Applikationsinstrument genutzt werden, da jeweils mehrere Versuche zur korrekten Platzierung des Implantats notwendig waren. Die im beschriebenen Modell genutzte Hämatoxylin/Eosin-Färbung ließ außerdem keine Rückschlüsse auf die Qualität des entstandenen Regeneratgewebes zu und somit auch nicht auf die Wirkung der eingesetzten Stoffe auf die Geweberegeneration, sondern lediglich die Quantität. Die Hypothese, ob das eingesetzte Chemokin TECK neben der *in vitro* nachgewiesenen Wirkung auf die ovinen Anulus fibrosus Zellen, auch *in vivo* einen Einfluss auf die Defektheilung hatte, konnte mit den verwendeten Methoden nicht beurteilt werden. Somit sollte bei einer erneuten Nutzung des Modells der Defekt in bei allen Tieren in gleicher Größe gesetzt werden und anschließend auch die Untersuchung des Defektinhaltes im Fokus weiterer Forschungsarbeiten stehen. Da

Zusammenfassung

das Modell grundsätzlich geeignet ist, kann bei gleicher Defektgröße zukünftig ein Klassifikationssystem einen qualitativen Vergleich der Geweberegeneration der Versuchstiergruppen untereinander und damit auch eine Auswertung in Bezug auf das verwendete Chemokin TECK zulassen.

8. Summary

Model for the implantation of implants stimulating the body's own mechanisms for repair and regeneration of ovine annulus fibrosus defects.

The surgical management of herniated discs often involves removal of the prolapsed tissue and subsequent replacement of the nucleus pulposus. Invasive surgical access via the annulus fibrosus frequently leads to further tissue defects and consequently to additional damage to the existing damage of the annulus fibrosus. Numerous experimental studies on the treatment of degenerative and traumatic changes in intervertebral discs report results of surgical treatment with the aim of repair and regeneration of the nucleus pulposus. The success of these therapeutic methods largely depends on the functional restoration of the annulus fibrosus, since only an intact annulus fibrosus can resist the pressure from inside the intervertebral disc and thus prevent recurrent herniation. Therapeutic methods taking advantage of the regenerative potential of the annulus fibrosus are referred to as Annulus Fibrosus Tissue Engineering. They are based on the implantation of various different scaffolds and cells fostering repair and regeneration.

The aim of this study was to assess the suitability of the model under review to test the suitability of the absorbable implants used for the treatment of annulus fibrosus defects.

In the present study, for the first time, an implant in combination with a human recombinant chemokine TECK (CCL25) and in combination with PRP was tested for its bio-compatibility and stability in an *in vivo* test for annulus fibrosus defect healing in a sheep model. Since the chemokine TECK is a human recombinant chemokine, the effect of this specific chemokine on ovine annulus fibrosus cells was studied *in vitro* in a chemotaxis assay and also in a 3D cell culture before testing *in vivo*. *In vitro*, the human recombinant chemokine TECK was able to dose-dependently induce migration of ovine annulus fibrosus cells, which was significant at concentrations of 750nM and 1000nM. Hence, the receptor ligand of the human recombinant chemokine TECK not only binds to human cells, but also to the chemokine receptor of ovine annulus fibrosus cells. In addition, in 3D cell culture, the ovine annulus fibrosus cells were able to generate proteoglycans in the presence of human recombinant chemokine TECK. In combination with PRP, the ovine annulus fibrosus cells generated almost no proteoglycans. For the first time, the suitability of the human recombinant chemokine TECK for use in animal experiments on sheep could be demonstrated with these *in vitro* experiments.

In the following animal experiment, 3.5mm x 3.5mm defects were set via a retroperitoneal approach to the annulus fibrosus of the lumbar intervertebral discs of 30 experimental ovine animals. The experimental animals were randomized into 5 groups of 6 (groups A to E). Group A (empty defect), where a defect was set in the annulus fibrosus and subsequently not covered

Summary

with an implant, was the control group to study the body's own repair and regeneration mechanisms. In groups B to E, the defect was covered with various combinations of implants and therapeutic substances. A macroscopic and histological evaluation was carried out 3 months after surgery.

The assessed model is suitable for testing absorbable implants as this thesis shows, that:

- the sheep was an acceptable model for the study of new surgical therapies with implants for the repair and regeneration of annulus fibrosus defects, since the proportional anatomical conditions are comparable with humans and the same surgical techniques (instruments and implants) were used as would be under clinical conditions for humans. In summary, the model and surgical techniques are transferable to humans. The assessed model is suitable to demonstrate this.
- the retroperitoneal access as well as the defect setting with scalpel and tweezers was reproducible in all animals with increasing efficiency.
- the attachment method with sutures at the four corners of the implant reliably prevented dislocation of the absorbable implants.
- the explantation, anatomical preparation, and preparation of specimens were reproducible.
- histological hematoxylin / eosin staining proved to be a reliable diagnostic tool to study implant bio-degeneration, recurrent herniation rates, and, thus, defect stabilization.

For future use of the assessed model in new studies however, the implant attachment method should be modified to allow for clinically safe, reproducible application and easy integration of the method into existing surgical protocols. A surgical application aid should be used for the challenging application of sutures, since in each instance several attempts to correctly place the implant were required. Also, hematoxylin / eosin staining as used in the assessed model did not allow conclusions as to the quality of the regenerated tissue, and, thus, not as to the effectiveness of the applied therapeutic substances on tissue repair and regeneration. Only quantitative effects could be assessed. The hypothesis, whether human recombinant chemokine TECK (CCL25), in addition to the demonstrated *in vitro* effect, also has an *in vivo* effect on defect healing of ovine annulus fibrosus cells, could not be assessed with the methods under review. Hence, for future use of the model, defects of equal size should be set in all animals, and the study of the defect content should also be in the focus of further research. Since the model is suitable in principle, with defects set of equal size, a classification system for quantitative analysis of tissue repair and regeneration between groups of animals as well as relative to the chemokine TECK used can be developed.

9. Literaturverzeichnis

Adams, M. A. and P. J. Roughley (2006). "What is intervertebral disc degeneration, and what causes it?" Spine (Phila Pa 1976) **31**: 2151-2161.

Ahern, B. J., J. Parvizi, R. Boston and T. P. Schaer (2009). "Preclinical animal models in single site cartilage defect testing: a systematic review." Osteoarthritis and Cartilage **17**: 705-713.

Ahlgren, B. D., W. Lui, H. N. Herkowitz, M. M. Panjabi and J. P. Guiboux (2000). "Effect of annular repair on the healing strength of the intervertebral disc: a sheep model." Spine (Phila Pa 1976) **25**: 2165-2170.

Ahlgren, B. D., A. Vasavada, R. S. Brower, C. Lydon, H. N. Herkowitz and M. M. Panjabi (1994). "Annular incision technique on the strength and multidirectional flexibility of the healing intervertebral disc." Spine (Phila Pa 1976) **19**: 948-954.

Akeda, K., H. S. An, R. Pichika, M. Attawia, E. J. Thonar, M. E. Lenz, A. Uchida and K. Masuda (2006). "Platelet-rich plasma (PRP) stimulates the extracellular matrix metabolism of porcine nucleus pulposus and annulus fibrosus cells cultured in alginate beads." Spine (Phila Pa 1976) **31**: 959-966.

Alini, M., S. M. Eisenstein, K. Ito, C. Little, A. A. Kettler, K. Masuda, J. Melrose, J. Ralphs, I. Stokes and H. J. Wilke (2008). "Are animal models useful for studying human disc disorders/degeneration?" Eur Spine J **17**: 2-19.

Amaia, C., L. Claudia, S. Hanna, W. Wolfgang, R. J. C, H. D. W, F. Peter and D. G. N (2012). "Porous scaffold architecture guides tissue formation." Journal of Bone and Mineral Research **27**: 1275-1288.

Andersen, M. L. and L. M. F. Winter (2017). "Animal models in biological and biomedical research - experimental and ethical concerns." An Acad Bras Cienc: 0.

Andersson, G. B. (1998). "Epidemiology of low back pain." Acta Orthopaedica Scandinavica **69**: 28-31.

Angele, P., M. Aurich, C. Becher, G. Bode, P. Brucker, F. Dirisamer, C. Erggelet, J. Fay, M. Feucht and S. Fickert (2016). Knorpeltherapie: Praxisleitfaden der AG Klinische Geweberegeneration der DGOU, De Gruyter.

Aota, Y., K. Kumano and S. Hirabayashi (1995). "Postfusion Instability at the Adjacent Segments after Rigid Pedicle Screw Fixation for Degenerative Lumbar Spinal-Disorders." Journal of Spinal Disorders **8**: 464-473.

Assad, M., P. Jarzem, M. A. Leroux, C. Coillard, A. V. Chernyshov, S. Charette and C. H. Rivard (2003). "Porous titanium-nickel for intervertebral fusion in a sheep model: part 1. Histomorphometric and radiological analysis." J Biomed Mater Res B Appl Biomater **64**: 107-120.

- Atlas, S. J., R. A. Deyo, D. L. Patrick, K. Convery, R. B. Keller and D. E. Singer (1996). "The Quebec Task Force classification for Spinal Disorders and the severity, treatment, and outcomes of sciatica and lumbar spinal stenosis." Spine (Phila Pa 1976) **21**: 2885-2892.
- Bao, Q. B., G. M. McCullen, P. A. Higham, J. H. Dumbleton and H. A. Yuan (1996). "The artificial disc: theory, design and materials." Biomaterials **17**: 1157-1167.
- Bao, Q. B. and H. A. Yuan (2002). "New technologies in spine: nucleus replacement." Spine (Phila Pa 1976) **27**: 1245-1247.
- Baramki, H. G., P. Papin and T. Steffen (2000). "A surgical approach to the ventral aspect of the lumbar vertebrae in the sheep model." Surg Radiol Anat **22**: 25-27.
- Barth, M., M. Diepers, C. Weiss and C. Thome (2008b). "Two-year outcome after lumbar microdiscectomy versus microscopic sequestrectomy: part 2: radiographic evaluation and correlation with clinical outcome." Spine (Phila Pa 1976) **33**: 273-279.
- Barth, M., C. Weiss and C. Thome (2008a). "Two-year outcome after lumbar microdiscectomy versus microscopic sequestrectomy: part 1: evaluation of clinical outcome." Spine (Phila Pa 1976) **33**: 265-272.
- Battie, M. C., T. Videman and E. Parent (2004). "Lumbar disc degeneration: epidemiology and genetic influences." Spine (Phila Pa 1976) **29**: 2679-2690.
- Baumgärtner, W. and A. D. Gruber (2015). Allgemeine Pathologie für die Tiermedizin, Enke.
- Berg, S., T. Tullberg, B. Branth, C. Olerud and H. Tropp (2009). "Total disc replacement compared to lumbar fusion: a randomised controlled trial with 2-year follow-up." European Spine Journal **18**: 1512-1519.
- Bernick, S. and R. Cailliet (1982). "Vertebral end-plate changes with aging of human vertebrae." Spine (Phila Pa 1976) **7**: 97-102.
- Binger, T., S. Stich, K. Andreas, C. Kaps, O. Sezer, M. Notter, M. Sittlinger and J. Ringe (2009). "Migration potential and gene expression profile of human mesenchymal stem cells induced by CCL25." Experimental Cell Research **315**: 1468-1479.
- Blumenkrantz, N., J. Sylvest and G. Asboe-Hansen (1977). "Local low-collagen content may allow herniation of intervertebral disc: biochemical studies." Biochem Med **18**: 283-290.
- Blumenthal, S., P. C. McAfee, R. D. Guyer, S. H. Hochschuler, F. H. Geisler, R. T. Holt, R. Garcia, Jr., J. J. Regan and D. D. Ohnmeiss (2005). "A prospective, randomized, multicenter Food and Drug Administration investigational device exemptions study of lumbar total disc replacement with the CHARITE artificial disc versus lumbar fusion: part I: evaluation of clinical outcomes." Spine (Phila Pa 1976) **30**: 1565-1575; discussion E1387-1591.
- Bogduk, N., L. T. Twomey, T. Schöttker-Königer, K. Heimann and B. Ferber-Busse (2000). Klinische Anatomie von Lendenwirbelsäule und Sakrum: 13 Tabellen, Springer Berlin Heidelberg.

Boos, N., S. Weissbach, H. Rohrbach, C. Weiler, K. F. Spratt and A. G. Nerlich (2002). "Classification of age-related changes in lumbar intervertebral discs: 2002 Volvo Award in basic science." Spine (Phila Pa 1976) **27**: 2631-2644.

Börm, W. (2009). Spinale Neurochirurgie: operatives Management von Wirbelsäulenerkrankungen ; mit 107 Tabellen, Schattauer.

Borrie, J. e. a. (1960). "The Sheep as an Experimental Animal in Surgical Science." British Journal of Surgery **47**: 435-445.

Boszczyk, B. M., A. A. Boszczyk and R. Putz (2001). "Comparative and functional anatomy of the mammalian lumbar spine." The Anatomical Record **264**: 157-168.

Bowles, R. D., H. H. Gebhard, R. Hartl and L. J. Bonassar (2011). "Tissue-engineered intervertebral discs produce new matrix, maintain disc height, and restore biomechanical function to the rodent spine." Proc Natl Acad Sci U S A **108**: 13106-13111.

Boyd, L. M. and A. J. Carter (2006). "Injectable biomaterials and vertebral endplate treatment for repair and regeneration of the intervertebral disc." European Spine Journal **15**: 414-421.

Brand, B. (2003). Eine in vivo Studie über die Biokompatibilität des Bandscheibenersatzstoffes Annular Sealant Device (ASD), Dissertation, University of Zurich. Available at: <http://opac.nebis.ch/ediss/20030001.pdf>.

Brettschneider, H. (1952). "[A contribution to the normal anatomy of intervertebral disk]." Z Mikrosk Anat Forsch **58**: 381-403.

Brinckmann, P. and H. Grootenboer (1991). "Change of disc height, radial disc bulge, and intradiscal pressure from discectomy. An in vitro investigation on human lumbar discs." Spine (Phila Pa 1976) **16**: 641-646.

Bromme, J., M. Mohokum, A. C. Disch and U. Marnitz (2015). "[Multidisciplinary outpatient care program vs. usual care : Cost-benefit analysis in patients with chronic low back pain]." Schmerz **29**: 195-202.

Bron, J. L., A. J. van der Veen, M. N. Helder, B. J. van Royen and T. H. Smit (2010). "Biomechanical and in vivo evaluation of experimental closure devices of the annulus fibrosus designed for a goat nucleus replacement model." European Spine Journal **19**: 1347-1355.

Bron, J. L., A. J. van der Veen, M. N. Helder, B. J. van Royen, T. H. Smit, A. Skeletal Tissue Engineering Group and M. Research Institute (2010). "Biomechanical and in vivo evaluation of experimental closure devices of the annulus fibrosus designed for a goat nucleus replacement model." Eur Spine J **19**: 1347-1355.

Brown, S., J. Melrose, B. Caterson, P. Roughley, S. M. Eisenstein and S. Roberts (2012). "A comparative evaluation of the small leucine-rich proteoglycans of pathological human intervertebral discs." Eur Spine J **21 Suppl 2**: S154-159.

Bundesamt(Destatis), S. (2011). "Mikrozensus-Fragen zur Gesundheit, Körpermaße der Bevölkerung 2009, Tabelle 1, Statistisches Bundesamt (Destatis) 2011." Retrieved 16.05.2018, 2018.

Butler, W. F. (1988). "Comparative anatomy and development of the mammalian disc." The biology of the intervertebral disc.

Bywaters, E. G. and J. Dorling (1970). "Amyloid deposits in articular cartilage." Ann Rheum Dis **29**: 294-306.

Cabraja, M., M. Endres, A. A. Hegewald, S. Vetterlein, C. Thome, C. Woiciechowsky and C. Kaps (2012). "A 3D environment for annulus fibrosus regeneration Laboratory investigation." Journal of Neurosurgery-Spine **17**: 177-183.

Carragee, E. J., M. Y. Han, P. W. Suen and D. Kim (2003). "Clinical outcomes after lumbar discectomy for sciatica: The effects of fragment type and anular competence." Journal of Bone and Joint Surgery-American Volume **85a**: 102-108.

Cassidy, J. J., A. Hiltner and E. Baer (1989). "Hierarchical structure of the intervertebral disc." Connect Tissue Res **23**: 75-88.

Chatterjee, S., P. M. Foy and G. F. Findlay (1995). "Report of a controlled clinical trial comparing automated percutaneous lumbar discectomy and microdiscectomy in the treatment of contained lumbar disc herniation." Spine (Phila Pa 1976) **20**: 734-738.

Cho, H., S. H. Park, K. Park, J. W. Shim, J. Huang, R. Smith, S. Elder, B. H. Min and K. A. Hasty (2013). "Construction of a Tissue-Engineered Annulus Fibrosus." Artificial Organs **37**: E131-E138.

Chosa, E., K. Goto, K. Totoribe and N. Tajima (2004). "Analysis of the effect of lumbar spine fusion on the superior adjacent intervertebral disk in the presence of disk degeneration, using the three-dimensional finite element method." J Spinal Disord Tech **17**: 134-139.

Colloca, C. J., T. S. Keller, R. J. Moore, D. E. Harrison and R. Gunzburg (2009). "Validation of a noninvasive dynamic spinal stiffness assessment methodology in an animal model of intervertebral disc degeneration." Spine (Phila Pa 1976) **34**: 1900-1905.

Colombini, A., S. Lopa, C. Ceriani, A. B. Lovati, S. J. Croiset, A. Di Giancamillo, G. Lombardi, G. Banfi and M. Moretti (2015). "In vitro characterization and in vivo behavior of human nucleus pulposus and annulus fibrosus cells in clinical-grade fibrin and collagen-enriched fibrin gels." Tissue Eng Part A **21**: 793-802.

Connor, J. M., A. N. Conner, R. A. Connor, J. L. Tolmie, B. Yeung and D. Goudie (1987). "Genetic aspects of early childhood scoliosis." Am J Med Genet **27**: 419-424.

Coppes, M. H., E. Marani, R. T. Thomeer and G. J. Groen (1997). "Innervation of "painful" lumbar discs." Spine (Phila Pa 1976) **22**: 2342-2349; discussion 2349-2350.

Costi, J. J., T. C. Hearn and N. L. Fazzalari (2002). "The effect of hydration on the stiffness of intervertebral discs in an ovine model." Clin Biomech (Bristol, Avon) **17**: 446-455.

Cruz, M. A., W. W. Hom, T. J. DiStefano, R. Merrill, O. M. Torre, H. A. Lin, A. C. Hecht, S. Illien-Junger and J. C. Iatridis (2018). "Cell-Seeded Adhesive Biomaterial for Repair of Annulus Fibrosus Defects in Intervertebral Discs." Tissue Eng Part A **24**: 187-198.

- Daly, C. D., K. Z. Lim, J. Lewis, K. Saber, M. Molla, N. Bar-Zeev and T. Goldschlager (2017). "Lumbar microdiscectomy and post-operative activity restrictions: a protocol for a single blinded randomised controlled trial." BMC Musculoskelet Disord **18**: 312.
- van den Eerenbeemt, K. D., R. W. Ostelo, B. J. van Royen, W. C. Peul and M. W. van Tulder (2010). "Total disc replacement surgery for symptomatic degenerative lumbar disc disease: a systematic review of the literature." Eur Spine J **19**: 1262-1280.
- Di Martino, A., A. R. Vaccaro, J. Y. Lee, V. Denaro and M. R. Lim (2005). "Nucleus pulposus replacement - Basic science and indications for clinical use." Spine **30**: S16-S22.
- Dvorak, J., M. H. Gauchat and L. Valach (1988). "The outcome of surgery for lumbar disc herniation. I. A 4-17 years' follow-up with emphasis on somatic aspects." Spine (Phila Pa 1976) **13**: 1418-1422.
- Ebeling, U., H. Kalbarczyk and H. J. Reulen (1989). "Microsurgical reoperation following lumbar disc surgery. Timing, surgical findings, and outcome in 92 patients." J Neurosurg **70**: 397-404.
- Edeland, H. G. (1981). "Suggestions for a Total Elasto-Dynamic Intervertebral-Disk Prosthesis." Biomaterials Medical Devices and Artificial Organs **9**: 65-72.
- Emmerich, Ganter and Wittek (2016). Dosierungsvorschläge für Arzneimittel bei kleinen Wiederkäuern und Neuweltkameliden.
- Endres, M., K. Andreas, G. Kalwitz, U. Freymann, K. Neumann, J. Ringe, M. Sittinger, T. Haupt and C. Kaps (2010). "Chemokine profile of synovial fluid from normal, osteoarthritis and rheumatoid arthritis patients: CCL25, CXCL10 and XCL1 recruit human subchondral mesenchymal progenitor cells." Osteoarthritis Cartilage **18**: 1458-1466.
- Eyre, D. R. (1979). "Biochemistry of the intervertebral disc." Int Rev Connect Tissue Res **8**: 227-291.
- Eyre, D. R. and H. Muir (1976). "Types I and II collagens in intervertebral disc. Interchanging radial distributions in annulus fibrosus." Biochem J **157**: 267-270.
- Eyre, D. R. and H. Muir (1977). "Quantitative analysis of types I and II collagens in human intervertebral discs at various ages." Biochim Biophys Acta **492**: 29-42.
- Fardon, D. F. (2001). "Nomenclature and classification of lumbar disc pathology." Spine (Phila Pa 1976) **26**: 461-462.
- Fernstrom, U. (1966). "Arthroplasty with intercorporal endoprosthesis in herniated disc and in painful disc." Acta Chir Scand Suppl **357**: 154-159.
- Forsting, M., D. Uhlenbrock and I. Wanke (2009). MRT der Wirbelsäule und des Spinalkanals, Thieme.
- Freemont, A. J. (2009). "The cellular pathobiology of the degenerate intervertebral disc and discogenic back pain." Rheumatology (Oxford) **48**: 5-10.

Freudiger, S., G. Dubois and M. Lorrain (1999). "Dynamic neutralisation of the lumbar spine confirmed on a new lumbar spine simulator in vitro." Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery **119**: 127-132.

Frewein, J., R. Nickel, A. Schummer, E. Seiferle, K. H. Wille and H. Wilkens (2003). Lehrbuch der Anatomie der Haustiere: Bewegungsapparat, Parey.

Gatchel, R. J., P. B. Polatin and T. G. Mayer (1995). "The dominant role of psychosocial risk factors in the development of chronic low back pain disability." Spine (Phila Pa 1976) **20**: 2702-2709.

Ghiselli, G., J. C. Wang, N. N. Bhatia, W. K. Hsu and E. G. Dawson (2004). "Adjacent segment degeneration in the lumbar spine." J Bone Joint Surg Am **86-A**: 1497-1503.

Gollnast, H. (2012). In vivo Evaluation eines posterioren dynamischen Stabilisationssystems am lumbalen ovinen Bandscheibendegenerationsmodell., Medizinische Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin

Gotz, W., S. Barnert, R. Bertagnoli, N. Miosge, H. Kresse and R. Herken (1997). "Immunohistochemical localization of the small proteoglycans decorin and biglycan in human intervertebral discs." Cell Tissue Res **289**: 185-190.

Guder, E. (2008). In vivo Evaluation eines posterioren dynamischen Stabilisationssystems am lumbalen ovinen Bandscheibendegenerationsmodell. Dissertation, Medizinische Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin.

Guder, E., S. Hill, F. Kandziora and K. J. Schnake (2009). "[Partial nucleotomy of the ovine disc as an in vivo model for disc degeneration]." Z Orthop Unfall **147**: 52-58.

Guigui, P., B. Devyver, L. Rillardon, P. Ngounou, A. Deburge and J. P. Ghosez (2004). "[Intraoperative and early postoperative complications of lumbar and lumbosacral fusion: prospective analysis of 872 patients]." Rev Chir Orthop Reparatrice Appar Mot **90**: 5-15.

Guillaume, O., A. Daly, K. Lennon, J. Gansau, S. F. Buckley and C. T. Buckley (2014). "Shape-memory porous alginate scaffolds for regeneration of the annulus fibrosus: effect of TGF- β 3 supplementation and oxygen culture conditions." Acta biomaterialia **10**: 1985-1995.

Guillaume, O., S. M. Naqvi, K. Lennon and C. T. Buckley (2015). "Enhancing cell migration in shape-memory alginate-collagen composite scaffolds: In vitro and ex vivo assessment for intervertebral disc repair." J Biomater Appl **29**: 1230-1246.

Guterl, C. C., E. Y. See, S. B. Blanquer, A. Pandit, S. J. Ferguson, L. M. Benneker, D. W. Grijpma, D. Sakai, D. Eglin, M. Alini, J. C. Iatridis and S. Grad (2013). "Challenges and strategies in the repair of ruptured annulus fibrosus." Eur Cell Mater **25**: 1-21.

Guyer, R. D., R. Collier, W. J. Stith, D. D. Ohnmeiss, S. H. Hochschuler, R. F. Rashbaum and J. J. Regan (1988). "Discitis after discography." Spine (Phila Pa 1976) **13**: 1352-1354.

Hanley, E. N., Jr. and D. E. Shapiro (1989). "The development of low-back pain after excision of a lumbar disc." J Bone Joint Surg Am **71**: 719-721.

Hassler, O. (1969). "The human intervertebral disc. A micro-angiographical study on its vascular supply at various ages." Acta Orthop Scand **40**: 765-772.

Hayes, A. J., M. Benjamin and J. R. Ralphs (2001). "Extracellular matrix in development of the intervertebral disc." Matrix Biol **20**: 107-121.

Hefti, F. (2002). "Kongenitale Fehlbildungen an der Wirbelsäule." Der Orthopäde **31**: 34-43.

Hegewald, A. A., F. Medved, D. Feng, C. Tsagogiorgas, A. Beierfuss, G. A. Schindler, M. Trunk, C. Kaps, D. S. Mern and C. Thome (2015). "Enhancing tissue repair in annulus fibrosus defects of the intervertebral disc: analysis of a bio-integrative annulus implant in an in-vivo ovine model." J Tissue Eng Regen Med **9**: 405-414.

Hegewald, A. A., K. Neumann, G. Kalwitz, U. Freymann, M. Endres, K. Schmieder, C. Kaps and C. Thome (2012). "The chemokines CXCL10 and XCL1 recruit human annulus fibrosus cells." Spine (Phila Pa 1976) **37**: 101-107.

Hegewald, A. A., S. Zouhair, M. Endres, M. Cabraja, C. Woiciechowsky, C. Thome and C. Kaps (2013). "Towards biological anulus repair: TGF-beta3, FGF-2 and human serum support matrix formation by human anulus fibrosus cells." Tissue Cell **45**: 68-76.

Henriksson, H., M. Thornemo, C. Karlsson, O. Hagg, K. Junevik, A. Lindahl and H. Brisby (2009). "Identification of cell proliferation zones, progenitor cells and a potential stem cell niche in the intervertebral disc region: a study in four species." Spine (Phila Pa 1976) **34**: 2278-2287.

Heuer, F., S. Ulrich, L. Claes and H. J. Wilke (2008). "Biomechanical evaluation of conventional anulus fibrosus closure methods required for nucleus replacement. Laboratory investigation." J Neurosurg Spine **9**: 307-313.

Hickey, D. S. and D. W. Hukins (1980a). "X-ray diffraction studies of the arrangement of collagenous fibres in human fetal intervertebral disc." J Anat **131**: 81-90.

Hickey, D. S. and D. W. Hukins (1980b). "Relation between the structure of the annulus fibrosus and the function and failure of the intervertebral disc." Spine (Phila Pa 1976) **5**: 106-116.

Ho, L., R. A. Field, W. C. Russell, M. L. Riley, S. K. Ercanbrack and F. L. Williams (1989). "Influence of Gender, Breed and Age on Maturity Characteristics of Sheep." Journal of Animal Science **67**: 2460-2470.

Hoffman, R. M., K. J. Wheeler and R. A. Deyo (1993). "Surgery for herniated lumbar discs: a literature synthesis." J Gen Intern Med **8**: 487-496.

Holm, S., A. Maroudas, J. P. Urban, G. Selstam and A. Nachemson (1981). "Nutrition of the intervertebral disc: solute transport and metabolism." Connect Tissue Res **8**: 101-119.

- Holmes, P. F., D. W. Osterman and H. S. Tullos (1988). "Aspergillus discitis. Report of two cases and review of the literature." Clin Orthop Relat Res: 240-246.
- Honan, M., G. W. White and G. M. Eisenberg (1996). "Spontaneous infectious discitis in adults." Am J Med **100**: 85-89.
- Hondke, S., M. Cabraja, J. P. Krüger, S. Stich, T. Hartwig, M. Sittlinger and M. Endres (2018). "Proliferation, Migration, and ECM Formation Potential of Human Annulus Fibrosus Cells Is Independent of Degeneration Status." CARTILAGE **0**: 1947603518764265.
- Hoogendoorn, R. J., M. N. Helder, R. J. Kroeze, R. A. Bank, T. H. Smit and P. I. Wuisman (2008). "Reproducible long-term disc degeneration in a large animal model." Spine (Phila Pa 1976) **33**: 949-954.
- Hunter, C. J., J. R. Matyas and N. A. Duncan (2004). "Cytomorphology of notochordal and chondrocytic cells from the nucleus pulposus: a species comparison." J Anat **205**: 357-362.
- Iatridis, J. C., J. J. MacLean, M. O'Brien and I. A. Stokes (2007). "Measurements of proteoglycan and water content distribution in human lumbar intervertebral discs." Spine (Phila Pa 1976) **32**: 1493-1497.
- Idelberger, K. (1984). Konstitutionserkrankungen des Skeletts. Lehrbuch der Orthopädie. Berlin, Heidelberg, Springer Berlin Heidelberg: 9-31.
- Inkinen, R. I., M. J. Lammi, S. Lehmonen, K. Puustjarvi, E. Kaapa and M. I. Tammi (1998). "Relative increase of biglycan and decorin and altered chondroitin sulfate epitopes in the degenerating human intervertebral disc." J Rheumatol **25**: 506-514.
- Johnstone, B. and M. T. Bayliss (1995). "The large proteoglycans of the human intervertebral disc. Changes in their biosynthesis and structure with age, topography, and pathology." Spine (Phila Pa 1976) **20**: 674-684.
- Junghanns, H. (1951). "[Functional pathology of the intervertebral disks as a basis of clinical observations]." Langenbecks Arch Klin Chir Ver Dtsch Z Chir **267**: 393-417.
- Kandziora, F., M. Scholz, R. Pflugmacher, G. Krummrey, G. Schollmeier, G. Schmidmaier, K. J. Schnake, G. Duda, M. Raschke and N. P. Haas (2002). "Experimentelle Spondylodese der Schafshalswirbelsäule." Der Chirurg **73**: 1025-1038.
- Kiani, C., L. Chen, Y. J. Wu, A. J. Yee and B. B. Yang (2002). "Structure and function of aggrecan." Cell Res **12**: 19-32.
- Kim, K. T., S. H. Lee, K. S. Suk, J. H. Lee and B. O. Jeong (2010). "Biomechanical changes of the lumbar segment after total disc replacement : charite(r), prodisc(r) and maverick(r) using finite element model study." J Korean Neurosurg Soc **47**: 446-453.
- Kirkaldy-Willis, W. H. and H. F. Farfan (1982). "Instability of the lumbar spine." Clin Orthop Relat Res: 110-123.
- Kirkaldy-Willis, W. H., J. H. Wedge, K. Yong-Hing and J. Reilly (1978). "Pathology and pathogenesis of lumbar spondylosis and stenosis." Spine (Phila Pa 1976) **3**: 319-328.

Koes, B. W., M. W. van Tulder and S. Thomas (2006). "Diagnosis and treatment of low back pain." BMJ **332**: 1430-1434.

Kolditz, D., J. Kramer and R. Gowin (1985). "[Water and electrolyte content of human intervertebral disks under varying load]." Z Orthop Ihre Grenzgeb **123**: 235-238.

Koller, M. (2010). "Therapie bei Bandscheibenerkrankungen." Journal für Neurologie, Neurochirurgie und Psychiatrie **12**: 16-21.

Korge, A., T. Nydegger, J. L. Polard, H. M. Mayer and J. L. Husson (2002). "A spiral implant as nucleus prosthesis in the lumbar spine." European Spine Journal **11**: S149-S153.

Krämer, R., J. Matussek and T. Theodoridis (2014). Bandscheibenbedingte Erkrankungen: Ursachen, Diagnose, Behandlung, Vorbeugung, Begutachtung, Thieme.

Krämer, R., T. Theodoridis and J. Krämer (2011). Die lumbale Spinalkanalstenose, Springer Berlin Heidelberg.

Kruger, J. P., U. Freymann, S. Vetterlein, K. Neumann, M. Endres and C. Kaps (2013). "Bioactive factors in platelet-rich plasma obtained by apheresis." Transfus Med Hemother **40**: 432-440.

Krugluger, J. and K. Knahr (2001). "Minimally invasive disc surgery: a review." Int Orthop **24**: 303-306.

Ladefoged, C. (1985). "Amyloid in intervertebral discs. A histopathological investigation of intervertebral discs from 30 randomly selected autopsies." Appl Pathol **3**: 96-104.

Langlois, S., J. P. Cedoz, A. Lohse, E. Toussiroit and D. Wendling (2005). "Aseptic discitis in patients with ankylosing spondylitis: a retrospective study of 14 cases." Joint Bone Spine **72**: 248-253.

Laus, M., F. Bertoni, P. Bacchini, C. Alfonso and A. Giunti (1993). "Recurrent lumbar disc herniation: what recurs? (A morphological study of recurrent disc herniation)." Chir Organi Mov **78**: 147-154.

Le Visage, C., S. H. Yang, L. Kadakia, A. N. Sieber, J. P. Kostuik and K. W. Leong (2006). "Small intestinal submucosa as a potential bioscaffold for intervertebral disc regeneration." Spine **31**: 2423-2430.

Lebow, R. L., O. Adogwa, S. L. Parker, A. Sharma, J. Cheng and M. J. McGirt (2011). "Asymptomatic Same-Site Recurrent Disc Herniation After Lumbar Discectomy Results of a Prospective Longitudinal Study With 2-Year Serial Imaging." Spine **36**: 2147-2151.

Lee, C. K. (1988). "Accelerated degeneration of the segment adjacent to a lumbar fusion." Spine (Phila Pa 1976) **13**: 375-377.

Lehmann, T. R., K. F. Spratt, J. E. Tozzi, J. N. Weinstein, S. J. Reinartz, G. Y. el-Khoury and H. Colby (1987). "Long-term follow-up of lower lumbar fusion patients." Spine (Phila Pa 1976) **12**: 97-104.

- Leu, H. J. (1990). "[From percutaneous nucleotomy with diskoscopy to percutaneous spondylodesis: a new concept emerges]." Z Orthop Ihre Grenzgeb **128**: 266-275.
- Li, X. and Q. Kong (2015). "[Development and Challenges of Annulus Fibrosus Tissue Engineering]." Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi **29**: 498-502.
- Lim, K. Z., C. D. Daly, P. Ghosh, G. Jenkin, D. Oehme, J. Cooper-White, T. Naidoo and T. Goldschlager (2017). "Ovine Lumbar Intervertebral Disc Degeneration Model Utilizing a Lateral Retroperitoneal Drill Bit Injury." J Vis Exp.
- Link, H. D. (2002). "History, design and biomechanics of the LINK SB Charite artificial disc." Eur Spine J **11 Suppl 2**: S98-S105.
- Lotz, J. C. (2004). "Animal models of intervertebral disc degeneration: lessons learned." Spine (Phila Pa 1976) **29**: 2742-2750.
- Loupasis, G. A., K. Stamos, P. G. Katonis, G. Sapkas, D. S. Korres and G. Hartofilakidis (1999). "Seven- to 20-year outcome of lumbar discectomy." Spine (Phila Pa 1976) **24**: 2313-2317.
- Luoma, K., H. Riihimaki, R. Luukkonen, R. Raininko, E. Viikari-Juntura and A. Lamminen (2000). "Low back pain in relation to lumbar disc degeneration." Spine (Phila Pa 1976) **25**: 487-492.
- Lyons, G., S. M. Eisenstein and M. B. Sweet (1981). "Biochemical changes in intervertebral disc degeneration." Biochim Biophys Acta **673**: 443-453.
- Ma, J., Y. F. He, X. L. Liu, W. M. Chen, A. Wang, C. Y. Lin, X. M. Mo and X. J. Ye (2018). "A novel electrospun-aligned nanoyarn/three-dimensional porous nanofibrous hybrid scaffold for annulus fibrosus tissue engineering." International Journal of Nanomedicine **13**: 1553-1566.
- Magalhaes, F. N. D., L. Dotta, A. Sasse, M. J. Teixeira and E. T. Fonoff (2012). "Ozone Therapy as a Treatment for Low Back Pain Secondary to Herniated Disc: A Systematic Review and Meta-analysis of Randomized Controlled Trials." Pain Physician **15**: E115-E129.
- Mageed, M., D. Berner, H. Jülke, C. Hohaus, W. Brehm and a. K. Gerlach (2013a). "Morphometrical dimensions of the sheep thoracolumbar vertebrae as seen on digitised CT images." Lab Anim Res.
- Mageed, M., B. D, J. H, H. C, B. W and G. K. (2013b). "Is sheep lumbar spine a suitable alternative model for human spinal researches? Morphometrical comparison study." Lab Anim Res. **29**: 183-189.
- Malanga, G. A. and S. F. Nadler (1999). "Nonoperative treatment of low back pain." Mayo Clin Proc **74**: 1135-1148.
- Martini, L., M. Fini, G. Giavaresi and R. Giardino (2001). "Sheep model in orthopedic research: a literature review." Comp Med **51**: 292-299.

Marx, R. E. (2001). "Platelet-rich plasma (PRP): what is PRP and what is not PRP?" Implant dentistry **10**: 225-228.

Matz, L. (2010). Osteochondrale Defektheilung nach chirurgischer Versorgung mittels biodegradierbarer synthetischer Implantate im Schafsmodell., Medizinische Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin.

Mayer, H. M., K. Wiechert, A. Korge and I. Qose (2002). "Minimally invasive total disc replacement: surgical technique and preliminary clinical results." Eur Spine J **11 Suppl 2**: S124-130.

McAfee, P. C., B. Cunningham, G. Holsapple, K. Adams, S. Blumenthal, R. D. Guyer, A. Dmietriev, J. H. Maxwell, J. J. Regan and J. Isaza (2005). "A prospective, randomized, multicenter Food and Drug Administration investigational device exemption study of lumbar total disc replacement with the CHARITE artificial disc versus lumbar fusion: part II: evaluation of radiographic outcomes and correlation of surgical technique accuracy with clinical outcomes." Spine (Phila Pa 1976) **30**: 1576-1583; discussion E1388-1590.

McCulloch, J. A. (1980). "Chemonucleolysis: experience with 2000 cases." Clin Orthop Relat Res: 128-135.

McIntosh, G. and H. Hall (2011). "Low back pain (acute)." BMJ Clin Evid **2011**.

Meakin, J. R. and D. W. Hukins (2000). "Effect of removing the nucleus pulposus on the deformation of the annulus fibrosus during compression of the intervertebral disc." J Biomech **33**: 575-580.

Meakin, J. R., J. E. Reid and D. W. L. Hukins (2001). "Replacing the nucleus pulposus of the intervertebral disc." Clinical Biomechanics **16**: 560-565.

Melrose, J., P. Ghosh and T. K. Taylor (2001a). "A comparative analysis of the differential spatial and temporal distributions of the large (aggrecan, versican) and small (decorin, biglycan, fibromodulin) proteoglycans of the intervertebral disc." J Anat **198**: 3-15.

Melrose, J., C. Shu, C. Young, R. Ho, M. M. Smith, A. A. Young, S. S. Smith, B. Gooden, A. Dart, J. Podadera, R. C. Appleyard and C. B. Little (2012). "Mechanical Destabilization Induced by Controlled Annular Incision of the Intervertebral Disc Dysregulates Metalloproteinase Expression and Induces Disc Degeneration." Spine **37**: 18-25.

Melrose, J., S. Smith, P. Ghosh and J. Whitelock (2003). "Perlecan, the multidomain heparan sulfate proteoglycan of basement membranes, is also a prominent component of the cartilaginous primordia in the developing human fetal spine." J Histochem Cytochem **51**: 1331-1341.

Melrose, J., S. Smith, S. Knox and J. Whitelock (2002). "Perlecan, the multidomain HS-proteoglycan of basement membranes, is a prominent pericellular component of ovine hypertrophic vertebral growth plate and cartilaginous endplate chondrocytes." Histochem Cell Biol **118**: 269-280.

Melrose, J., S. M. Smith, E. S. Fuller, A. A. Young, P. J. Roughley, A. Dart and C. B. Little (2007). "Biglycan and fibromodulin fragmentation correlates with temporal and spatial annular remodelling in experimentally injured ovine intervertebral discs." Eur Spine J **16**: 2193-2205.

Merck KGaA (2017). Farbe bekennen. Osteosoft und Osteomoll

Miller, J. A., C. Schmatz and A. B. Schultz (1988). "Lumbar disc degeneration: correlation with age, sex, and spine level in 600 autopsy specimens." Spine (Phila Pa 1976) **13**: 173-178.

Mulisch, M. and U. Welsch (1990). B. Romeis, Mikroskopische Technik (18. neubearbeitete und erweiterte Auflage, 2015, herausgegeben von Mulisch, M., Welsch, U.), Springer Berlin Heidelberg.

Murphy, P. M., M. Baggiolini, I. F. Charo, C. A. Hébert, R. Horuk, K. Matsushima, L. H. Miller, J. J. Oppenheim and C. A. Power (2000). "International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors." Pharmacological reviews **52**: 145-176.

Mwale, F., P. Roughley and J. Antoniou (2004). "Distinction between the extracellular matrix of the nucleus pulposus and hyaline cartilage: a requisite for tissue engineering of intervertebral disc." Eur Cell Mater **8**: 58-63; discussion 63-54.

Nerlich, A. G., E. D. Schleicher and N. Boos (1997). "1997 Volvo Award winner in basic science studies. Immunohistologic markers for age-related changes of human lumbar intervertebral discs." Spine (Phila Pa 1976) **22**: 2781-2795.

Niethard, F. U., J. Pfeil and P. Biberthaler (2014). Duale Reihe Orthopädie und Unfallchirurgie, Thieme.

Nordby, E. J., P. H. Wright and S. R. Schofield (1993). "Safety of chemonucleolysis. Adverse effects reported in the United States, 1982-1991." Clin Orthop Relat Res: 122-134.

Nuckley, D. J., P. A. Kramer, A. Del Rosario, N. Fabro, S. Baran and R. P. Ching (2008). "Intervertebral disc degeneration in a naturally occurring primate model: radiographic and biomechanical evidence." J Orthop Res **26**: 1283-1288.

O'Connell, G., E. Vresilovic and D. Elliott (2006). Comparative intervertebral disc anatomy across several animal species. 52nd Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society.

Oehme, D., T. Goldschlager, J. Rosenfeld, A. Danks, P. Ghosh, A. Gibbon and G. Jenkin (2012). "Lateral surgical approach to lumbar intervertebral discs in an ovine model." ScientificWorldJournal **2012**: 873726.

Oertel, B. (1990). "B. Romeis, Mikroskopische Technik (17. neubearbeitete und erweiterte Auflage, herausgegeben von P. BÖCK). 697 S., 49 Abb., ca. 40 Tab. München – Wien – Baltimore 1989. Urban und Schwarzenberg. DM 148,00. ISBN: 3-541-11227-1." Journal of Basic Microbiology **30**: 144-144.

Ogata, K. and L. A. Whiteside (1981). "1980 Volvo award winner in basic science. Nutritional pathways of the intervertebral disc. An experimental study using hydrogen washout technique." Spine (Phila Pa 1976) **6**: 211-216.

Ogon, M., H. Maurer, C. Wimmer, F. Landauer, W. Sterzinger and M. Krismer (1997). "[Minimally invasive approach and surgical procedures in the lumbar spine]." Orthopade **26**: 553-561.

Olmarker, K., N. Danielsen, U. Nannmark, L. Sennerby and B. Rydevik (1990). "Microvascular effects of chondroitinase ABC and chymopapain. An in vivo experimental study on hamsters and rabbits." Clin Orthop Relat Res: 274-279.

van Ooij, A., F. C. Oner and A. J. Verbout (2003). "Complications of artificial disc replacement: a report of 27 patients with the SB Charite disc." J Spinal Disord Tech **16**: 369-383.

Osterholt, B. (2011). Nukleotomie und dynamische Restabilisierung des Lendenwirbelsäulen-Segments L3/4 bei Schaf und Mensch. Dissertation, Medizinische Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin.

Osti, O. L., B. Vernon-Roberts and R. D. Fraser (1990). "1990 Volvo Award in experimental studies. Anulus tears and intervertebral disc degeneration. An experimental study using an animal model." Spine (Phila Pa 1976) **15**: 762-767.

Parker, S. L., G. Grahovac, D. Vukas, M. Vilendecic, D. Ledic, M. J. McGirt and E. J. Carragee (2016). "Effect of an Annular Closure Device (Barricaid) on Same-Level Recurrent Disk Herniation and Disk Height Loss After Primary Lumbar Discectomy: Two-year Results of a Multicenter Prospective Cohort Study." Clin Spine Surg **29**: 454-460.

Paulsen, F. and J. Waschke (2011). Sobotta, Atlas der Anatomie des Menschen Band 1: Allgemeine Anatomie und Bewegungsapparat, Elsevier Health Sciences.

Pirvu, T., S. B. Blanquer, L. M. Benneker, D. W. Grijpma, R. G. Richards, M. Alini, D. Eglin, S. Grad and Z. Li (2015). "A combined biomaterial and cellular approach for annulus fibrosus rupture repair." Biomaterials **42**: 11-19.

Putzier, M., J. F. Funk, S. V. Schneider, C. Gross, S. W. Tohtz, C. Khodadadyan-Klostermann, C. Perka and F. Kandziora (2006). "Charite total disc replacement--clinical and radiographical results after an average follow-up of 17 years." Eur Spine J **15**: 183-195.

Quint, U., H. J. Wilke, A. Shirazi-Adl, M. Parnianpour, F. Loer and L. E. Claes (1998). "Importance of the intersegmental trunk muscles for the stability of the lumbar spine. A biomechanical study in vitro." Spine (Phila Pa 1976) **23**: 1937-1945.

Raj, P. P. (2008). "Intervertebral disc: anatomy-physiology-pathophysiology-treatment." Pain Practice **8**: 18-44.

Raspe, H. (2012). "Gesundheitsberichterstattung des Bundes: Heft 53 Rückenschmerzen." Robert Koch-Institut.

Rathke, F. W. (1954). "Generalisierte Ossifikationsverzögerung am Wirbelskelet bei allgemeiner Störung der Knorpelverknöcherung." Archiv für orthopädische und Unfall-Chirurgie, mit besonderer Berücksichtigung der Frakturenlehre und der orthopädisch-chirurgischen Technik **46**: 415-425.

- Ray, C. D. (2002). "The PDN prosthetic disc-nucleus device." *Eur Spine J* **11 Suppl 2**: S137-142.
- Reid, J. E., J. R. Meakin, S. P. Robins, J. M. S. Skakle and D. W. L. Hukins (2002). "Sheep lumbar intervertebral discs as models for human discs." *Clinical Biomechanics* **17**: 312-314.
- Reitmaier, S., U. Wolfram, A. Ignatius, H. J. Wilke, A. Gloria, J. M. Martin-Martinez, J. Silva-Correia, J. Miguel Oliveira, R. Luis Reis and H. Schmidt (2012). "Hydrogels for nucleus replacement--facing the biomechanical challenge." *J Mech Behav Biomed Mater* **14**: 67-77.
- Ringe, J., S. Strassburg, K. Neumann, M. Endres, M. Notter, G. R. Burmester, C. Kaps and M. Sittinger (2007). "Towards in situ tissue repair: human mesenchymal stem cells express chemokine receptors CXCR1, CXCR2 and CCR2, and migrate upon stimulation with CXCL8 but not CCL2." *J Cell Biochem* **101**: 135-146.
- Roberts, S., B. Caterson, J. Menage, E. H. Evans, D. C. Jaffray and S. M. Eisenstein (2000). "Matrix metalloproteinases and aggrecanase: their role in disorders of the human intervertebral disc." *Spine (Phila Pa 1976)* **25**: 3005-3013.
- Roberts, S., J. Menage, V. Duance, S. Wotton and S. Ayad (1991). "1991 Volvo Award in basic sciences. Collagen types around the cells of the intervertebral disc and cartilage end plate: an immunolocalization study." *Spine (Phila Pa 1976)* **16**: 1030-1038.
- Roberts, S., J. Menage and J. P. Urban (1989). "Biochemical and structural properties of the cartilage end-plate and its relation to the intervertebral disc." *Spine (Phila Pa 1976)* **14**: 166-174.
- Roberts, S., J. P. Urban, H. Evans and S. M. Eisenstein (1996). "Transport properties of the human cartilage endplate in relation to its composition and calcification." *Spine (Phila Pa 1976)* **21**: 415-420.
- Rodrigues, F. F., D. C. Dozza, C. R. de Oliveira and R. G. de Castro (2006). "Failed back surgery syndrome: casuistic and etiology." *Arq Neuropsiquiatr* **64**: 757-761.
- Rothoerl, R. D., C. Woertgen and A. Brawanski (2002). "When should conservative treatment for lumbar disc herniation be ceased and surgery considered?" *Neurosurg Rev* **25**: 162-165.
- Roughley, P., D. Martens, J. Rantakokko, M. Alini, F. Mwale and J. Antoniou (2006). "The involvement of aggrecan polymorphism in degeneration of human intervertebral disc and articular cartilage." *Eur Cell Mater* **11**: 1-7; discussion 7.
- Roughley, P. J. (2004). "Biology of intervertebral disc aging and degeneration: involvement of the extracellular matrix." *Spine (Phila Pa 1976)* **29**: 2691-2699.
- Roughley, P. J., M. Alini and J. Antoniou (2002). "The role of proteoglycans in aging, degeneration and repair of the intervertebral disc." *Biochem Soc Trans* **30**: 869-874.
- Rudert, M. and B. Tillmann (1993). "Detection of lymph and blood vessels in the human intervertebral disc by histochemical and immunohistochemical methods." *Ann Anat* **175**: 237-242.

- Salomon, F. V., H. Geyer and U. Gille (2008). Anatomie für die Tiermedizin, Enke.
- Sambrook, P. N., A. J. MacGregor and T. D. Spector (1999). "Genetic influences on cervical and lumbar disc degeneration: a magnetic resonance imaging study in twins." Arthritis Rheum **42**: 366-372.
- Sartoretto, S. C., M. J. Uzeda, F. B. Miguel, J. R. Nascimento, F. Ascoli and M. D. Calasans-Maia (2016). "Sheep as an Experimental Model for Biomaterial Implant Evaluation." Acta Ortop Bras **24**: 262-266.
- Schmidt CO, R. H., Pflingsten M et al. (2007). "Back Pain in the German Adult Population: Prevalence, Severity, and Sociodemographic Correlates in a Multiregional Survey." Spine.
- Schmidt, H. and S. Reitmaier (2013). "Is the ovine intervertebral disc a small human one? A finite element model study." J Mech Behav Biomed Mater **17**: 229-241.
- Schmoelz, W., J. F. Huber, T. Nydegger, L. Claes and H. J. Wilke (2006). "Influence of a dynamic stabilisation system on load bearing of a bridged disc: an in vitro study of intradiscal pressure." Eur Spine J **15**: 1276-1285.
- Schmorl, G. and H. Junghanns (1968). Die gesunde und die kranke Wirbelsäule in Röntgenbild und Klinik, Thieme.
- Schneider-Wald, B., A. Thaden and M. Schwarz (2013). "Defektmodelle für die Gelenkknorpelregeneration im Großtier." Der Orthopäde **42**.
- Schünke, M. (2014). Topografie und Funktion des Bewegungssystems: Funktionelle Anatomie, Thieme.
- Schünke, M., E. Schulte and U. Schumacher (2005). Prometheus: Allgemeine Anatomie und Bewegungssystem : LernAtlas der Anatomie, Thieme.
- Schwan, S., C. Ludtka, I. Wiesner, A. Baerthel, A. Friedmann and F. Gohre (2017). "Percutaneous posterolateral approach for the simulation of a far-lateral disc herniation in an ovine model." Eur Spine J.
- Scott, J. E., T. R. Bosworth, A. M. Cribb and J. R. Taylor (1994). "The chemical morphology of age-related changes in human intervertebral disc glycosaminoglycans from cervical, thoracic and lumbar nucleus pulposus and annulus fibrosus." J Anat **184 (Pt 1)**: 73-82.
- Shapiro, I. M. and M. V. Risbud (2013). The Intervertebral Disc: Molecular and Structural Studies of the Disc in Health and Disease, Springer Vienna.
- Sharifi, S., S. K. Bulstra, D. W. Grijpma and R. Kuijer (2015). "Treatment of the degenerated intervertebral disc; closure, repair and regeneration of the annulus fibrosus." Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine **9**: 1120-1132.
- Shedid, D., K. T. Ugokwe and E. C. Benzel (2005). "Lumbar total disc replacement compared with spinal fusion: treatment choice and evaluation of outcome." Nat Clin Pract Neurol **1**: 4-5.

Singh, V., L. Manchikanti, R. M. Benyamin, S. Helm and J. A. Hirsch (2009). "Percutaneous lumbar laser disc decompression: a systematic review of current evidence." Pain Physician **12**: 573-588.

Smit, T. H. (2002). "The use of a quadruped as an in vivo model for the study of the spine - biomechanical considerations." European Spine Journal **11**: 137-144.

Soh, J., J. C. Lee and B. J. Shin (2013). "Analysis of risk factors for adjacent segment degeneration occurring more than 5 years after fusion with pedicle screw fixation for degenerative lumbar spine." Asian Spine J **7**: 273-281.

Stich, S. (2012). Charakterisierung von humanen Periostzellen für das Tissue Engineering Dissertation, Technischen Universität Berlin.

Stich, S., A. Loch, I. Leinhase, K. Neumann, C. Kaps, M. Sittinger and J. Ringe (2008). "Human periosteum-derived progenitor cells express distinct chemokine receptors and migrate upon stimulation with CCL2, CCL25, CXCL8, CXCL12, and CXCL13." European Journal of Cell Biology **87**: 365-376.

Stock, U. A. and J. P. Vacanti (2001). "Tissue engineering: current state and prospects." Annu Rev Med **52**: 443-451.

Stoll, T. M., G. Dubois and O. Schwarzenbach (2002). "The dynamic neutralization system for the spine: a multi-center study of a novel non-fusion system." European Spine Journal **11**: S170-S178.

Streitparth, F. and A. C. Disch (2015). "Interventionen an der Bandscheibe." Der Radiologe **55**: 868-877.

Suh, B. G., J. H. Uh, S. H. Park and G. W. Lee (2015). "Repair using conventional implant for ruptured annulus fibrosus after lumbar discectomy: surgical technique and case series." Asian Spine J **9**: 14-21.

Sztrolovics, R., M. Alini, P. J. Roughley and J. S. Mort (1997). "Aggrecan degradation in human intervertebral disc and articular cartilage." Biochem J **326 (Pt 1)**: 235-241.

Tavakoli, J. (2017). "Tissue Engineering of the Intervertebral Disc's Annulus Fibrosus: A Scaffold-Based Review Study." Tissue Engineering and Regenerative Medicine **14**: 81-91.

Taylor, J. R., J. E. Scott, A. M. Cribb and T. R. Bosworth (1992). "Human intervertebral disc acid glycosaminoglycans." J Anat **180 (Pt 1)**: 137-141.

Thomas, J., A. Lowman and M. Marcolongo (2003). "Novel associated hydrogels for nucleus pulposus replacement." J Biomed Mater Res A **67**: 1329-1337.

Tsai, T. L., B. C. Nelson, P. A. Anderson, T. A. Zdeblick and W. J. Li (2014). "Intervertebral disc and stem cells cocultured in biomimetic extracellular matrix stimulated by cyclic compression in perfusion bioreactor." Spine J **14**: 2127-2140.

- Ullah, M., J. Eucker, M. Sittinger and J. Ringe (2013). "Mesenchymal stem cells and their chondrogenic differentiated and dedifferentiated progeny express chemokine receptor CCR9 and chemotactically migrate toward CCL25 or serum." Stem Cell Research & Therapy **4**.
- Urban, J. P., S. Holm and A. Maroudas (1978). "Diffusion of small solutes into the intervertebral disc: as in vivo study." Biorheology **15**: 203-221.
- Urban, J. P., S. Holm, A. Maroudas and A. Nachemson (1977). "Nutrition of the intervertebral disk. An in vivo study of solute transport." Clin Orthop Relat Res: 101-114.
- Urban, J. P. and S. Roberts (1995). "Development and degeneration of the intervertebral discs." Mol Med Today **1**: 329-335.
- Urban, J. P. and S. Roberts (2003). "Degeneration of the intervertebral disc." Arthritis Res Ther **5**: 120-130.
- Urban, J. P., S. Smith and J. C. Fairbank (2004). "Nutrition of the intervertebral disc." Spine (Phila Pa 1976) **29**: 2700-2709.
- Viera, R. (1974). "Die postnatale Entwicklung des Extremitätenskeletts bei Schaf und Ziege." Anatomia, Histologia, Embryologia **3**: 29-39.
- Vik, A., J. A. Zwart, G. Hulleberg and O. P. Nygaard (2001). "Eight year outcome after surgery for lumbar disc herniation: a comparison of reoperated and not reoperated patients." Acta Neurochir (Wien) **143**: 607-610; discussion 610-611.
- Vogl, T. J., W. Reith and E. J. Rummeny (2011). Diagnostische und interventionelle Radiologie, Springer Berlin Heidelberg.
- Walker, B. F. (2000). "The prevalence of low back pain: a systematic review of the literature from 1966 to 1998." Clinical Spine Surgery **13**: 205-217.
- Weibrich, G., W. K. Kleis, G. Hafner and W. E. Hitzler (2002). "Growth factor levels in platelet-rich plasma and correlations with donor age, sex, and platelet count." Journal of cranio-maxillo-facial surgery **30**: 97-102.
- Weidenbaum, M., R. J. Foster, B. A. Best, F. Saed-Nejad, E. Nickoloff, J. Newhouse, A. Ratcliffe and V. C. Mow (1992). "Correlating magnetic resonance imaging with the biochemical content of the normal human intervertebral disc." J Orthop Res **10**: 552-561.
- Weiss, J., K. Becker, E. Bernsmann, S. Chourbaji and H. Dietrich (2014). Versuchstierkunde: Tierpflege in Forschung und Klinik, Enke.
- Wiesner, I. (2017). Die minimalinvasive dorsolaterale Schädigung der ovinen Bandscheibe als Schädigungsmodell degenerativer Wirbelsäulenveränderungen, Freie Universität Berlin.
- Wilke, H. J. (2008). "Animal models for spinal research." Eur Spine J **17**: 1.
- Wilke, H. J., F. Heuer, C. Neidlinger-Wilke and L. Claes (2006). "Is a collagen scaffold for a tissue engineered nucleus replacement capable of restoring disc height and stability in an animal model?" Eur Spine J **15 Suppl 3**: S433-438.

Wilke, H. J., S. Kavanagh, S. Neller and L. Claes (2002). "[Effect of artificial disk nucleus implant on mobility and intervertebral disk high of an L4/5 segment after nucleotomy]." Orthopade **31**: 434-440.

Wilke, H. J., S. Kavanagh, S. Neller, C. Haid and L. E. Claes (2001). "Effect of a prosthetic disc nucleus on the mobility and disc height of the L4-5 intervertebral disc postnucleotomy." J Neurosurg **95**: 208-214.

Wilke, H. J., A. Kettler and L. E. Claes (1997b). "Are sheep spines a valid biomechanical model for human spines?" Spine (Phila Pa 1976) **22**: 2365-2374.

Wilke, H. J., A. Kettler, K. H. Wenger and L. E. Claes (1997a). "Anatomy of the sheep spine and its comparison to the human spine." Anat Rec **247**: 542-555.

Winter, R. B., J. E. Lonstein, A. S. Leonard and D. E. Smith (1983). Congenital Deformities of the Spine, Thieme-Stratton Incorporated.

Yajun, W., Z. Yue, H. Xiuxin and C. Cui (2010). "A meta-analysis of artificial total disc replacement versus fusion for lumbar degenerative disc disease." Eur Spine J **19**: 1250-1261.

Zhu, Q., X. Gao, M. D. Brown, H. T. Temple and W. Gu (2017). "Simulation of water content distributions in degenerated human intervertebral discs." J Orthop Res **35**: 147-153.

Zutphen, v. (1995). Grundlagen der Versuchstierkunde: ein Beitrag zum tierschutzgerechten Umgang mit Versuchstieren und zur Qualität tierexperimenteller Ergebnisse ; mit 38 Tabellen, G. Fischer.

Danksagung

Ich möchte mich ganz herzlich bei Herrn PD. Dr. Christian Große-Siestrup für die Vergabe des Themas, die Betreuung der Arbeit von Seiten der Freien Universität Berlin bedanken und dafür, dass er mir die Möglichkeit gegeben hat die Dissertation an der Freien Universität Berlin einzureichen.

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. Michael Sittinger für die fachliche Betreuung der Arbeit und für die Möglichkeit eine wissenschaftliche Arbeit in seiner Arbeitsgruppe anfertigen zu können.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Stefan Stich für die fachliche Betreuung, fleißiges Korrekturlesen und seine unermüdliche Unterstützung zum Gelingen und Fertigstellen dieser Arbeit.

Dank gilt auch den anderen Mitgliedern unserer Arbeitsgruppe Frau Katja Reiter, Herrn Dr. Tony Hartwig und Herrn Dr. Jan Philipp Krüger, die unsere Arbeitsgruppe zu einem Team formten, in dem gegenseitige Unterstützung und stets auch eine gute Portion Humor für ein gutes Arbeitsklima sorgten.

Frau Katja Reiter möchte ich außerdem für die kollegiale Zusammenarbeit und ihre tierexperimentelle Erfahrung danken, die mir eine sehr große Hilfe waren.

Herrn Dr. Tony Hartwig danke ich für die sehr lehrreiche Zusammenarbeit bei der durch Ihn durchgeführten Operationen sowie für das Korrekturlesen des chirurgischen Teils der Arbeit. Der gesamten Gruppe von TransTissue Technologies GmbH (TTT) unter der Leitung von Frau Dr. Michaela Endres bin ich dankbar für die fachliche Hilfe in den zellkulturtechnischen und histologischen Bereichen und die tolle Zusammenarbeit.

Im Speziellen danke ich Frau Dr. Sylvia Hondke, Herrn Dr. Jan Philipp Krüger, Frau Anja Wachtel, Herrn Samuel Vetterlein für die gute Zusammenarbeit bei der Analyse der Daten und das tolle Arbeitsklima.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Stephan Thönnißen für seine Unterstützung und für das Verständnis, dass er für mich aufgebracht hat und vor allem aber für das aufmunternde Zusprechen in den schwierigeren Zeiten.

Zuletzt danke ich meinen Eltern und meinem Bruder für die unermüdliche Unterstützung und aufmunternden Worte und für Ihre liebevolle Art mir immer zur Seite zu stehen.

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen Anspruch genommen habe.

Berlin, den 22.01.2019

Pia Katharina Sophia Ostach



9 783863 879549
mbvberlin | mensch und buch verlag
49,90 Euro | ISBN: 978-3-86387-954-9