

Aus der Klinik für Neurochirurgie
BG Klinikum Bergmannstrost Halle (Saale)

DISSERTATION

**Die minimalinvasive dorsolaterale Schädigung
der ovinen Bandscheibe als Schädigungsmodell degenerativer
Wirbelsäulenveränderungen**

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité - Universitätsmedizin Berlin

von

Ingo Wiesner
aus Halle (Saale)

Datum der Promotion: 10.03.2017

INHALTSVERZEICHNIS

1. Einleitung, Grundlagen	1
1.1 Epidemiologische Aspekte der Bandscheibendegeneration	1
1.2 Ätiologische Aspekte der Bandscheibendegeneration.....	2
1.2.1 Pathogenese der Bandscheibendegeneration	2
1.2.2 Degenerative Strukturveränderungen	4
1.3 Tiermodelle zur Testung operativer und regenerativer Behandlungsverfahren	5
1.4 Anatomische Grundlagen	7
1.4.1 Wirbelsäule, Junghanssches Bewegungssegment.....	7
1.4.2 Bandscheibe	8
1.4.2.1 Anulus fibrosus	9
1.4.2.2 Nucleus pulposus	9
1.4.2.3 Kartilaginäre Endplatte	11
1.5 Biochemische Grundlagen der Bandscheibendegeneration.....	11
1.6 Mechanik des lumbalen Bewegungssegmentes.....	13
1.7 Bildgebende Verfahren zur Beurteilung der Bandscheibendegeneration.....	15
1.7.1 Konventionelle Röntgendiagnostik, Discographie	15
1.7.2 Computertomographie	16
1.7.3 Magnetresonanztomographie.....	16
1.8 Behandlung degenerativer Wirbelsäulenerkrankungen.....	19
1.8.1 Konservative Behandlung.....	19
1.8.2 Operative Behandlung	20
1.8.3 Regenerative Behandlung, Zelltherapie.....	21
1.8.4 Tissue engineering, Trägermaterialien.....	29
1.8.4.1 Kollagen.....	31
1.8.4.2 Gelatine	32
1.8.4.3 Chitosan	33
2. Material und Methoden	33
2.1 Tiermodell Schaf.....	33
2.1.1 Vorversuch	33
2.1.2 Hauptversuch.....	36
2.1.3 Medikamente und Pharmaka	37
2.1.3.1 Prämedikation, Narkoseeinleitung.....	37

2.1.3.2 Inhalationsnarkose	37
2.1.3.3 Postoperative Analgesie.....	38
2.1.3.4 Euthanasie	38
2.1.4 Geräte und Instrumente	39
2.1.5 Praktische Durchführung.....	39
2.1.5.1 Operationsvorbereitung.....	39
2.1.5.2 Schädigungsoperation	41
2.1.5.3 Discographie	45
2.1.5.4 Entnahme der Bewegungssegmente post mortem.....	45
2.2 Bildgebung.....	45
2.2.1 Bestimmung der Bandscheibenhöhen	46
2.2.2 Morphologische Veränderungen in den Bewegungssegmenten.....	47
2.3 Datenanalyse, Statistik.....	47
3. Ergebnisse	48
3.1 Operationszeiten, perioperative Besonderheiten	48
3.2 Bandscheibenhöhen in der sagittalen und coronaren Micro-CT.....	50
3.3 Morphologische Veränderungen in den Bewegungssegmenten.....	55
4. Diskussion	58
4.1 Zum Tiermodell	58
4.2 Zum Versuchsaufbau	63
4.3 Zu den Ergebnissen.....	67
4.3.1 Bandscheibenhöhe.....	67
4.3.2 Morphologische Veränderungen in den Bewegungssegmenten.....	69
4.3.3 OP-Zeiten	70
4.4 Ausblick	71
4.5 Zusammenfassung	71
5. Literaturverzeichnis.....	73
6. Anlagen	89
6.1 Votum der Ethikkommission.....	89
6.2 Eidstattliche Versicherung	93
6.3 Danksagung	94
6.4 Lebenslauf.....	95

ABSTRAKT

Einleitung: In der vorgelegten Studie wurde ein Schädigungsmodell an der Lendenwirbelsäule des Schafes entwickelt, um die Situation eines dorsolateralen Bandscheibenvorfalles zu simulieren und dessen Auswirkungen auf die mögliche Degeneration der geschädigten Bewegungssegmente zu untersuchen.

Methodik: 18 Schafe wurden randomisiert in 2 Gruppen unterteilt, die sich nur durch die Standzeit nach der zweiten von zwei Operationen unterschieden, und die perkutan minimalinvasiv über dorsolaterale Zugänge auf die lumbalen Bewegungssegmente operiert wurden. In beiden Gruppen wurde das Bandscheibengewebe mittels einer Faszange für Gewebebiopsien mechanisch geschädigt, indem ein Teil des Bandscheibenkerngewebes entfernt wurde. Die sich entwickelnde Schädigung der Bandscheibe wurde in einem darauffolgenden Eingriff mittels einer Discographie untersucht. In jedem Tier wurde randomisiert eine Nativbandscheibe festgelegt, die nicht geschädigt wurde. Nach der Discographie wurden die Tiere nach 6 bzw. 12 Monaten euthanasiert und sowohl die geschädigten als auch die nativen Bandscheiben in der Micro-Computertomographie hinsichtlich der Bandscheibenhöhe und die Bewegungssegmente hinsichtlich des Vorhandenseins degenerativer Veränderungen untersucht.

Ergebnisse: Jeweils 18 geschädigte und nicht geschädigte Bandscheiben und Bewegungssegmente konnten ausgewertet werden. Dabei war in der 6-Monatsgruppe in der sagittalen Micro-Computertomographie eine signifikante Abnahme der Bandscheibenhöhe der geschädigten Bewegungssegmente gegenüber den nativen Segmenten zu ermitteln; diese Höhenminderung schritt in der 12-Monatsgruppe - nicht signifikant - fort. Die Erfassung der degenerativen Veränderungen in den geschädigten Bewegungssegmenten offenbarte eine deutliche Zunahme der pathomorphologischen Degenerationszeichen in der 12-Monatsgruppe gegenüber der 6-Monatsgruppe. In der 6-Monatsgruppe waren nur bei einem Tier an den nicht geschädigten Bewegungssegmenten Degenerationszeichen zu ermitteln; in der 12-Monatsgruppe an den nicht geschädigten Segmenten bei keinem Tier.

Schlussfolgerung: Das beschriebene Tiermodell führt als standardisiertes minimalinvasives Schädigungsmodell an der ovinen Bandscheibe zu degenerativen Veränderungen, wie sie auch an humanen Wirbelsäulen nach Bandscheibenvorfällen zu beobachten sind. Somit kann das Modell zur Testung regenerativer und systemischer Therapieverfahren genutzt werden.

ABSTRACT

Introduction: The aim of this study is to develop a damage model in the ovine lumbar spine to simulate a posterolateral disk herniation and examine its degenerative impact on the damaged motion segments.

Methodology: The sample population of 18 sheep was randomly divided into two groups, differing only in the postoperative duration until culling (6 month, 12 month). All animals underwent percutaneous, minimally invasive surgery via a posterolateral approach to the lumbar motion segments. In both groups, the intervertebral disc was mechanically damaged by removing a piece of the nucleus pulposus via grasping forceps for tissue biopsy. The resulting damage to the intervertebral disc was investigated by discography in a subsequent operation. Each animal was assigned a randomly-determined native disc to remain undamaged. After discography, the animals were euthanized 6 or 12 months after the first surgery and their lumbar spines excised. Both the injured and native intervertebral discs were examined by micro-computed tomography with respect to the disc height and degenerative changes in the motion segments.

Results: All 36 intervertebral discs and motion segments (18 damaged, 18 undamaged) were successfully harvested and evaluated. A statistically significant decrease in the disc height of the damaged motion segments compared to the native segments was seen in the 6-month group; although this height reduction was also seen in the 12-month group, it was not significant. Investigation of degenerative changes in the affected motion segments revealed a significant increase in pathomorphological signs of degeneration in the 12-month group compared with the 6-month group. Additionally, in the 6-month group, signs of degeneration in the native motion segments could only be seen in a single animal; meanwhile none 12-month group animals showed native segment degeneration.

Conclusion: The described animal model represents a standardized, minimally invasive damage model of the ovine intervertebral disc and its degenerative changes, as also observed in human spines affected by herniated discs. Therefore, this model is valid for testing renewable and systemic therapies aimed at mitigating this degeneration.

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

6MG	-	6-Monatsgruppe
12MG	-	12-Monatsgruppe
AF	-	Anulus fibrosus
BS	-	Bandscheibe/-n
BWS	-	Brustwirbelsäule
CT	-	Computertomographie
EZM	-	Extrazellulärmatrix
FG	-	Facettengelenk/-e
GAG	-	Glycosaminoglycane
HWS	-	Halswirbelsäule
KE	-	kartilaginäre Endplatte
Lig./Ligg.	-	Ligament/Ligamenta
LWK	-	Lendenwirbelkörper
LWS	-	Lendenwirbelsäule
MMP	-	Matrixmetalloproteinasen
MRT	-	Magnetresonanztomographie
NP	-	Nucleus pulposus
PLIF	-	posterior lumbar interbody fusion
PG	-	Proteoglycan/-e
RM	-	Rückenmark
RS	-	Rückenschmerz/-en
rT	-	regenerative Therapie
SP	-	Serinproteinasen
TE	-	tissue engineering
TNF- α	-	Tumornekrosefaktor α
WK	-	Wirbelkörper
WS	-	Wirbelsäule

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1	Sagittalschnitt eines Bewegungssegmentes	8
Abbildung 2	Schema der Belastung der Bandscheiben und Facettengelenke	14
Abbildung 3	Schema der einwirkenden Druck- und Zugkräfte auf die Bandscheibe	14
Abbildung 4	MRT-Bild der Lendenwirbelsäule; Modic-Klassifikation Typ 1	17
Abbildung 5	MRT-Bild der Lendenwirbelsäule; Modic-Klassifikation Typ 2	17
Abbildung 6	MRT-Bild der Lendenwirbelsäule; Modic-Klassifikation Typ 3	17
Abbildung 7	Elektronenmikroskopische Aufnahme natives und synthetisch gesponnenes Kollagen	32
Abbildung 8	Frontalschnitt durch ein Bewegungssegment der ovinen Wirbelsäule	34
Abbildung 9	Ex vivo-Präparat der ovinen Wirbelsäule	35
Abbildung 10	Versuchsdesign Hauptversuch	36
Abbildung 11	Ahle Aesculap FG 268 R-4000 K	38
Abbildung 12	Fasszange Fehling NKR-1	39
Abbildung 13	Versuchstier auf dem OP-Tisch	40
Abbildung 14	Orientierungspunkte zur Punktion der lumbalen Bandscheiben	40
Abbildung 15	Miniinzisionen zur Punktion der lumbalen Bandscheiben	41
Abbildung 16	Fasszange in das Bewegungssegment vorgeführt	41
Abbildung 17	Bildwandleraufnahmen der punktierten Bewegungssegmente	41
Abbildung 18	Discographie einer geschädigten Bandscheibe	44
Abbildung 19	Micro-CT einer Bandscheibe	45
Abbildung 20	Micro-CT, sagittaler Strahlengang, Bewegungssegment prä- und postoperativ, Beurteilung der Bandscheibenhöhe	45
Abbildung 21	Micro-CT, sagittaler Strahlengang, Bewegungssegment postoperativ	46
Abbildung 22	Micro-CT, coronarer Strahlengang, Bewegungssegment postoperativ	46
Abbildung 23	Boxplots BS-Höhe im sagittalen Strahlengang	52
Abbildung 24	Boxplots BS-Höhe im coronaren Strahlengang, coronar-dorsale Level	53
Abbildung 25	Boxplots BS-Höhe im coronaren Strahlengang, coronar-zentrale Level	53
Abbildung 26	Boxplots BS-Höhe im coronaren Strahlengang, coronar-ventrale Level	54
Abbildung 27	Pathomorphologische Veränderungen im coronaren Strahlengang	55

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1	Modic-Klassifikation der Wirbelkörperdegeneration.....	17
Tabelle 2	Gegenüberstellung MRT-Klassifikation nach Pfirrmann und histopathologische Klassifikation nach Thompson	18
Tabelle 3	Trägermaterialien Tissue engineering	30
Tabelle 4	Operationszeiten, perioperative Besonderheiten, Versuchsgruppe 1	48
Tabelle 5	Operationszeiten, perioperative Besonderheiten, Versuchsgruppe 2	48
Tabelle 6	BS-Höhe, Mittelwerte, Standardabweichung, Versuchsgruppe 1	50
Tabelle 7	BS-Höhe, Mittelwerte, Standardabweichung, Versuchsgruppe 2	51
Tabelle 8	Morphologische Veränderungen, Versuchsgruppe 1	56
Tabelle 9	Morphologische Veränderungen, Versuchsgruppe 2	57
Tabelle 10	Beispiele publizierter Kleintiermodelle	59
Tabelle 11	Beispiele publizierter Tiermodelle (Schaf).....	60

1. Einleitung, Grundlagen

1.1 Epidemiologische Aspekte der Bandscheibendegeneration

Auf Grund ihrer Inzidenz sind degenerative Wirbelsäulenerkrankungen als Volkskrankheit anzusehen. 50% aller Patienten, die sich bei einem niedergelassenen Orthopäden vorstellen, werden wegen Rückenschmerzen (RS) bei Bandscheibendegeneration (BS-Degeneration) behandelt. Bei einem Allgemeinmediziner ist dies immerhin jeder 10. Patient.

In knapp 93% liegen der Wirbelsäulenerkrankung degenerative Bandscheibenschäden (BS-Schäden) zu Grunde. In der Altersklasse über 60 Jahre sind in der Magnetresonanztomographie (MRT) in weit über 90% der Fälle Bandscheibenveränderungen abzubilden, wobei überwiegend die lumbalen BS betroffen sind [1, 2]. In Deutschland sind degenerative Wirbelsäulenerkrankungen für ein Fünftel der Krankschreibungen und die Hälfte vorzeitig gestellter Rentenanträge verantwortlich [2]. Im AOK-Krankenhaus-Report 2013 ist nachzulesen, dass die Rate der Wirbelsäuleneingriffe bei AOK-Patienten im Jahr 2010 537,5/100.000 Einwohner betrug und sich damit im Vergleich zum Jahr 2005 fast verdoppelt hatte [3].

Die sozioökonomische Bedeutung der degenerativen Wirbelsäulenerkrankung und des chronischen RS ist enorm. In den USA beispielsweise belaufen sich die entstehenden Kosten auf etwa 100 Milliarden Dollar pro Jahr, wobei 66% hiervon indirekte Folgekosten wie Lohnausfallkosten darstellen [4, 5]. In Deutschland werden jährlich etwa 800.000 Patienten aufgrund degenerativer BS-Schäden behandelt. Die Höhe der unmittelbaren Behandlungskosten wird auf 8,4 Milliarden Euro pro Jahr geschätzt; 85% entfallen dabei auf Kosten infolge Arbeitsunfähigkeit und Produktionsausfall, 15% bilden die medizinischen Versorgungskosten ab. Die Folgekosten (medizinische Rehabilitation, Berentung) sind indes mit über 30 Milliarden Euro zu beziffern [6].

Mit der fortschreitenden BS-Degeneration ist das Phänomen Rückenschmerz (RS) verbunden. Degenerative BS-Schäden können bereits zum Ende der zweiten Lebensdekade nachgewiesen werden, ohne dass diese schon mit Schmerzen einhergehen müssen [7]. Bei Auftreten eines BS-Vorfalles können sich ausgeprägte radikuläre Schmerzsyndrome entwickeln. Dabei setzen aber bildmorphologisch fassbare BS-Schäden nicht zwingend eine Schmerzgeschichte voraus. Nicht selten werden entsprechende degenerative Veränderungen bei asymptomatischen Patienten erst während einer Autopsie gesehen [8], obwohl bei 70-80% der über 60jährigen und bei mehr als 90% der über 63jährigen eine Spinalkanalstenose bildmorphologisch diagnostizierbar ist [8, 9].

Andererseits sind nur in 23% der Fälle die RS direkt auf nachweisbare degenerative BS-Schäden zurückzuführen. Gerade deshalb ist die Trennung zwischen „normaler Alterung“ und „vorzeitiger Degeneration“ der BS oft schwer möglich [10].

RS können bei Individuen aller Altersklassen auftreten [11]. Die Zunahme des RS ab der sechsten bis siebten Lebensdekade lässt vermuten, dass die zum Schmerz führenden degenerativen BS-Schäden während des physiologischen Alterungsprozesses des Menschen auftreten [12, 13]. Die bevorzugten WS-Segmente sind hierbei L3-L4, L4-L5 und L5-S1, da dort die Bandscheiben die größte Dicke (bis 10 mm) und den weitesten Durchmesser (bis 40 mm) besitzen, so dass sich die strukturellen Veränderungen der Diffusionsstrecke in diesen Wirbelsäulenabschnitten besonders auf den Metabolismus der BS-Zellen auswirken [14, 15].

Die Entwicklung des Phänomens Schmerz, dessen Auswirkungen auf das Krankheitsempfinden der Patienten und die Beeinträchtigung der Lebensqualität scheinen ebenfalls multifaktoriellen Ursprungs zu sein. Psychologische, soziale, kulturelle, neuro- und pathophysiologische Aspekte spielen hierbei eine Rolle. Faktoren wie die Lebensführung (körperliche Bewegung, Konstitution, Ernährung, Übergewicht, Zigarettenrauchen) und genetische Aspekte scheinen eine wichtige Rolle zu spielen. Außerdem kann oftmals bei Patienten mit chronischen RS ein geradezu schmerzprovozierendes Verhalten beobachtet werden [11, 16]. Die Besonderheit chronischer RS ist, dass in einer Vielzahl der Fälle kein eindeutiger Auslöser des Schmerzerlebens eruiert werden kann, sogar dann nicht, wenn radiologisch degenerative Veränderungen an der WS nachzuweisen sind. Diese Tatsache macht deutlich, dass das Lebensalter nur eine der möglichen Ursachen der BS-Degeneration darstellt und das Schmerzerleben einer ausgeprägten Individualtoleranz unterliegt.

1.2 Ätiologische Aspekte der Bandscheibendegeneration

1.2.1 Pathogenese der Bandscheibendegeneration

Die BS-Degeneration ist multifaktoriellen Ursprungs und nicht ausschließlich Folge des „normalen“ Alterns eines Individuums.

Endogene Risikofaktoren können anatomische Gefügestörungen der Wirbelsäule (WS), wie ein Morbus Scheuermann, Achsenabweichungen, Spondylolysen, Skoliosen, numerische Variationen oder Folgen statischer Fehlhaltungen wie Amputation an den unteren Gliedmaßen,

Beinlängendifferenzen oder Funktionsstörungen in den Knie- und Hüftgelenken nach Frakturen sein [2]. Auch genetische und ethnische Faktoren, ausgeprägte mechanische Belastung, vor allem Erschütterungen bei Berufskraftfahrern, Bauarbeitern etc. und Nikotinkonsum scheinen eine Schrittmacherrolle zu spielen [7, 17, 18]. Vor allem Schwingungen im Resonanzbereich zwischen 3,5 - 8 Hz beeinflussen den dem BS-Stoffwechsel zugrunde liegenden Flüssigkeitsstrom zwischen Nucleus pulposus (NP) und kartilaginärer Endplatte (KE) und die daran gebundenen Diffusionsvorgänge in den BS negativ [19, 20].

Infolge des im Stoffwechsel der BS anfallenden Laktats herrscht neben einer geringen intrazellulären Sauerstoffkonzentration ein saures Milieu mit pH-Werten bis unter 6 [21], da die für die BS-Zellen nötige Energie hauptsächlich über Glucose durch anaerobe Glykolyse bereitgestellt wird [22, 23]. Die BS-Zellen, vor allem die Zellen im zentralen NP sind an dieses Milieu adaptiert, so dass dem niedrigen pH-Wert allein nicht die Schrittmacherrolle der BS-Degeneration zugeschrieben werden kann.

Für eine mechanische Genese der BS-Degeneration spricht das gehäufte Auftreten von BS-Schäden bei Individuen mit einem body mass index über 25 (Übergewicht). Offenbar folgt die BS-Degeneration aber nicht nur auf die erhöhte mechanische Belastung des Stammskelettes. Auch die Koexistenz des Übergewichtes mit einem Diabetes mellitus Typ II forciert über die Bildung und Ausschüttung proinflammatorisch wirkender Zytokine (Interleukin 6, TNF- α) die BS-Degeneration [24].

Aus dem BS-Gewebe von Patienten, die wegen eines Bandscheibenvorfalles (BS-Vorfalles) operiert wurden, waren außerdem Herpes simplex-Virus Typ I und Cytomegalieviren zu isolieren, so dass auch eine Virusinfektion als möglicher Schrittmacher der BS-Degeneration diskutiert wird [25].

Die BS-Degeneration ist als biochemische Antwort der BS-Zellen auf externe Einflüsse aufzufassen [16, 22]. Im Zuge dieser Degeneration kommt es u.a. zur Formveränderung der BS-Zellen, indem die Zellen im Anulus fibrosus (AF) ihre spindelförmige Gestalt verlieren und in mehr abgerundeter oder sternförmiger Form vorliegen [26, 27]. Die Umorganisation der Zellverbände führt zur Bildung von Clustern (Zellnester). Die biochemische Progression der BS-Degeneration auf Zellebene führt zu Veränderungen auf Gewebeebene [26, 27], die sich z.B. in Form radiärer Rupturen im AF, bone bruise (Mikrofrakturen) in den KE oder Herniationen von BS-Gewebe in den Spinalkanal ausdrücken.

Diese strukturellen Veränderungen sind nur in begrenztem Umfang reparabel und daher als valide morphologische Marker degenerativer Wirbelsäulenerkrankungen anzusehen.

Die Beanspruchbarkeit der Kollagenfasergeflechte im AF nimmt mit zunehmendem Lebensalter ab, so dass Teile des NP vor allem bei exzentrischer Belastung in die entstehenden Anulusrupturen ausweichen können [28]. Eine BS-Protrusion entsteht, wenn sich Anteile des NP bei axialer Druckbelastung in den zentralen AF vorwölben, die peripheren Anuluslamellen aber intakt bleiben. Bei einer Zerreißung von AF und hinterem Längsband dringt BS-Gewebe durch den Defekt in den Spinalkanal ein - ein BS-Vorfall ist entstanden. In 2 - 12% der Fälle gelangen freie BS-Fragmente (Sequester) in den Spinalkanal [29]. Häufiger aber besteht noch Kontakt zwischen dem prolabierten Gewebe und der BS.

1.2.2 Degenerative Strukturveränderungen

Die Strukturveränderungen der BS führen im Falle eines BS-Vorfalles nicht nur zur ventralen Einengung des Spinalkanals (Spinalkanalstenose) sondern auch zur Höhenminderung des betreffenden Bewegungssegmentes mit konsekutiver Einengung des Recessus und des Foramen intervertebrale. Biomechanisch verursachen sie zudem eine Erschlaffung der zum Bewegungssegment gehörenden Bänder. Auf die mangelnde Bandvorspannung folgen Hypermobilität in den Bewegungssegmenten und knöcherne Anbauten an den WK (Spondylophyten) und den mehrbelasteten Facettengelenken (FG), die infolgedessen hypertrophieren. An den Ligamenta (Ligg). flava findet zusätzlich zur Zusammenfaltung wegen des Höhenverlustes eine fibrotische Hypertrophie statt.

Die mangelnde stabilisierende Funktion der FG und Bandstrukturen wird über einen erhöhten Tonus der Rumpfmuskulatur teilweise ausgeglichen [30]. Die zunehmende segmentale Hypermobilität und die morphologischen Veränderungen bewirken eine Kompression der die Foramina intervertebralia passierenden Nervenwurzeln. Diese Kompression ist u.a. von der Position der WS und der Aktivität des Individuums beeinflusst; schon in aufrechter Körperhaltung kommt es zu einer Hyperlordosierung des betroffenen Segmentes – konsekutiv wölbt sich das Lig. flavum weiter in den Spinalkanal vor, wobei nicht allein eine rein mechanische Irritation der Nervenwurzeln vorzuliegen scheint, sondern wahrscheinlich auch eine vaskuläre Kompression beteiligt ist.

Pathophysiologisch werden sowohl eine arterielle Ischämie als auch eine venöse Kongestion diskutiert. Unter Gehbelastung dekompensiert dann die vaskuläre Versorgung der Spinalnerven, die in Ruhe meist noch ausgereicht hat (Claudicatio spinalis) [30, 31].

Zur Bestimmung des resultierenden Stenosegrades wird der Sagittaldurchmesser des Spinalkanals in der Computertomographie (CT) gemessen. Die relative Spinalkanalstenose ist mit einer Weite des Spinalkanals von 10–14 mm von der absoluten Spinalkanalstenose mit einer Weite < 10 mm abzugrenzen [30, 32]. Allerdings bildet diese Einteilung die komplexen pathomorphologischen Veränderungen nicht ausreichend ab, da nur die zentrale Stenose und nicht die laterale Stenose um den Recessus lateralis und die Foramina intervertebralia sowie die FG berücksichtigt wird. Meist liegen jedoch Kombinationen aus beiden Formen vor [30, 32, 33]. Die klinische Beschwerdesymptomatik kann sowohl den RS als auch ausstrahlende belastungsabhängige Symptome in den Beinen im Sinne einer Claudicatio spinalis umfassen [12, 32]. Die Abgrenzung stenosebedingter Beschwerden gegenüber konkurrierend vorliegender Begleiterkrankungen kann schwierig sein. In 26% der Fälle liegt zusätzlich eine periphere arterielle Verschlusskrankheit vor. Auch Beschwerden auf Grund einer Coxarthrose können Diagnostik und Therapie der Spinalkanalstenose erschweren [34].

1.3 Tiermodelle zur Testung operativer und regenerativer Behandlungsverfahren

Die Höhe der Behandlungs- und Lohnausfallkosten wegen degenerativer Wirbelsäulenerkrankungen (vgl. Kapitel 1.1) verdeutlicht die Bedeutung der weiteren Erforschung von Ätiologie und Pathogenese der BS-Degeneration und die Wichtigkeit der Suche nach wirksamen Behandlungsansätzen mit möglichst längerfristigen Therapieeffekten. Die Beobachtung physiologischer Regenerationsprinzipien der BS spielt hierbei eine wichtige Rolle. Neben der konservativen und operativen Behandlung degenerativer Wirbelsäulenerkrankungen etabliert sich zunehmend die regenerative Therapie, die anders als die beiden erstgenannten Therapieverfahren einen kausalen Therapieansatz an der BS darstellt. Operative und regenerative Behandlungsformen sind an geeigneten Modellen auf ihren therapeutischen Effekt hin zu testen und weiterzuentwickeln.

Hierbei stehen fast ausschließlich Schädigungsmodelle am Tier zur Verfügung; die humane WS würde zwar vor allem als post mortem-Präparat ein ideales Modell zur Testung biomechanischer Kenngrößen, operativer Therapieansätze und Implantate darstellen, steht jedoch nicht in

ausreichender Menge zur Verfügung. In vitro-Versuche an humanen BS sind etabliert [35]. Aus ethischen, moralischen und administrativen Gründen können diese Untersuchungen aber nicht in vivo an humanem Gewebe bzw. Organismen durchgeführt werden [36, 37].

In diesem Zusammenhang ist die Bedeutung experimenteller in vivo-Tierversuche hervorzuheben. Selbst technisch weit entwickelte in vitro-Verfahren, wie sie beispielsweise zur Kultivierung und Stabilitätsprüfung von hyalinem Knorpel teilweise in der wissenschaftlichen Grundlagenforschung etabliert sind, kommen für eine Langzeitbeobachtung nicht in Frage, da in vitro kein dem lebenden Organismus entsprechender Stoffwechsel nachgebildet werden kann. Entscheidende Detailfragen, wie beispielsweise die Grenzflächenintegration und -stabilität zwischen Trägermaterialien und kultivierten Regeneraten lassen sich in vitro nicht beantworten. Für die Erforschung der BS-Degeneration bedeutet dies, dass wesentliche Parameter des komplexen Degenerationsprozesses wie das hypoxische Zellmilieu, die Matrixdegradierung, der Zellverlust oder die Zytokinaktivierung, welche nicht nur die BS-Degeneration sondern auch die Wechselwirkungen der eingebrachten Regenerate mit den geschädigten BS beeinflussen, in vitro nicht nachzustellen sind.

Das hier vorgestellte Tiermodell sollte somit der Prüfung unterzogen werden, als standardisiertes Schädigungsmodell an der ovinen BS eingesetzt werden zu können. Der Schädigungseffekt an der WS sollte z. B. für die Entwicklung biologischer Behandlungsmöglichkeiten bei degenerativen Erkrankungen lumbaler Bewegungssegmente, der Prüfung von Trägermaterialien auf ihre Langzeitverträglichkeit sowie der Beantwortung grundlegender Fragestellungen der Implantatintegration in die BS dienen. Hierzu war zu prüfen, ob anhand des Versuchsaufbaus prinzipiell ein Substanzdefekt in der BS zu generieren war. Besonders im Hinblick auf das mittelbare Ziel, einen BS-Vorfall zu reparieren bzw. regenerieren, sollte die hier vorgestellte mechanische Schädigung der BS überprüft werden. Unsere Arbeit untersucht eine dem Versuchstier Schaf angepasste minivalinvasive Schädigungsmethode, bei der sowohl die Induktion der BS-Schädigung als auch die Kontrolle der eingetretenen Schädigung reproduzierbar erfolgen sollten.

1.4 Anatomische Grundlagen

1.4.1 Wirbelsäule, Junghanssches Bewegungssegment

Die humane Wirbelsäule (WS) wird in einen cervikalen Abschnitt (7 Wirbel), einen thorakalen Abschnitt (12 Wirbel) und einen lumbalen Abschnitt (5 Wirbel) gegliedert. Kaudal davon wird das Kreuzbein durch 5 verschmolzene Kreuzwirbel gebildet, an die sich das Steißbein (4 verschmolzene Wirbel) anschließt [15].

Der Wirbelkörper (WK) hat die Form eines Zylinders. Dorsal des WK befindet sich der Wirbelbogen, welcher das Foramen vertebrale einfasst. Die Foramina vertebralia der benachbarten WK bilden in ihrer Gesamtheit den Wirbelkanal, in dem das RM untergebracht ist. Vom WK ausgehend liegen seitlich und dorsal Processus vertebrales (Wirbelfortsätze) vor, die der Anheftung von Bändern und Muskulatur dienen und teilweise Gelenkelemente tragen.

Zwei Processus transversi (Querfortsätze) entspringen seitlich an den Wirbelbögen. Kleine Einkerbungen an den Bogenwurzeln der benachbarten WK bilden seitlich die Zwischenwirbellöcher (Foramina intervertebralia), durch die die Nervenwurzeln segmental den Spinalkanal verlassen. Auf ihrer Vorder- und Hinterseite sind die WK durch längs verlaufende Bänder miteinander verbunden - Ligamentum longitudinale anterius et posterius [38].

Diese Bänder bestehen vor allem aus kollagenen Fasergeflechten. Auf Segmentebene und zwischen den Segmenten sind zudem kleinere Bänder angelegt, die Ligg. flava, die reichlich elastische Fasern enthalten und die Ligg. interspinalia, supraspinalia bzw. intertransversalia [38].

Die kraniale und die kaudale Fläche des WK laufen am Rand in bogenförmigen knöchernen Leisten (Randleisten) aus. Diese Randleiste ist nach Abschluss der Ossifikation durch radiär verlaufende Gefäßkanäle mit dem WK verzahnt [39].

Sie ist als ein geschlossener Ringwall aufzufassen, der beim erwachsenen Individuum durchschnittlich 1-2 mm hoch und 2-10 mm breit ist. Die Randleiste umgreift die hyalinknorpelige Abschlussplatte (kartilaginäre Endplatte) und übt somit eine protektive Funktionen für die BS aus, indem sie Druck- und Scherkräfte aufnimmt und den Nucleus pulposus (NP) entlastet [40, 41].

Die segmentale Bewegungseinheit (Abbildung 1), deren biomechanische Eigenschaften denen der gesamten WS entsprechen, ist das „Junghannsische Bewegungssegment“ [10]. Es umfasst zwei aneinandergrenzende WK, die sie verbindende BS, die segmental ansetzende Muskulatur, die Gesamtheit der Bänder, den Inhalt des Wirbelkanals und der Zwischenwirbellöcher und stellt die funktionelle Grundeinheit statischer und kinematischer Vorgänge dar [42].

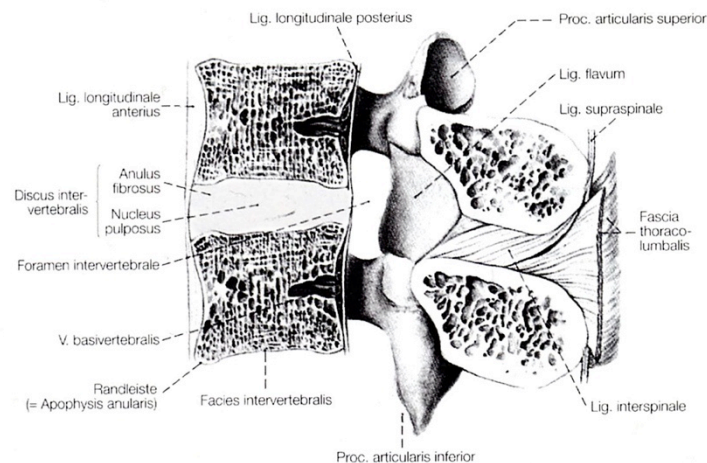


Abbildung 1: Sagittalschnitt durch ein Bewegungssegment (aus [43])

1.4.2 Bandscheibe

Die humane WS besitzt 23 BS [16, 44]. Die BS sind makroskopisch in 3 anatomische Bezirke untergliedert: peripher liegt der Faserring (Anulus fibrosus, AF), zentral befindet sich der Gallertkern (Nucleus pulposus, NP). Die kartilaginäre Endplatte (KE) stellt die kraniale und kaudale Kontaktfläche der BS auf die Grundplatten der Wirbelkörper dar [15, 45]. Lediglich in der Peripherie der BS wird der Stoffwechsel vaskulär vermittelt. Die zentralen Abschnitte der BS liegen beim Erwachsenen bis zu 20 mm distanziert zur direkten Blutversorgung [12, 45, 46]. Oxygenierung, Nutrition und Abtransport der Stoffwechselprodukte laufen dort ausschließlich über Diffusionsvorgänge entlang der KE ab [47, 48]. Diese Diffusionsvorgänge sind an einen Flüssigkeitsstrom in die und aus der BS gekoppelt.

Die Gewebeeigenschaften der BS werden wesentlich durch die Extrazellulärmatrix (EZM; Synonyma extrazelluläre Substanz, Interzellulärsbstanz) bestimmt. Sowohl die in der EZM vorhandenen Proteoglycane als auch das Kollagen selbst werden in den NP-Zellen gebildet. Im BS-Gewebe sind mehrere Subtypen des Kollagens nachzuweisen (Typ I, II, III, V, VI, IX und X).

Durch die Vernetzung der Kollagenfibrillen entstehen dreidimensionale Strukturen, die hydratisierte Proteoglycane (PG; z. B. Aggrecan, Hyaluronsäure, Chondroitin-6-Sulfat und Keratansulfat) aufnehmen [7, 8]. Die Glycosaminoglycan-Ketten (GAG-Ketten) dieser PG sind Träger negativer Ladungen und weisen damit eine hohe Wasserbindungskapazität auf, über die der osmotische Druck innerhalb der BS beeinflusst wird.

1.4.2.1 Anulus fibrosus

Der AF umschließt den zentral befindlichen NP allseits [44]. Er besteht aus mehreren Lagen lamellenförmig angeordneter Kollagenfasergeflechte. Der AF ist ventral und lateral kräftiger. In den dorsalen Abschnitten liegen weniger und auch dünnere Faserlamellen vor. Der hohe Fasergehalt ist nötig, um bei Belastung des Bewegungssegmentes und Verformung des NP Zug- und Druckkräfte aufnehmen zu können.

Die Struktur der Kollagenfasergeflechte in der Außen- und Innenzone des AF weist Unterschiede auf. Die Fasern in den Außenzonen sind in 15 - 25 Lagen geordneter, gegensinnig verlaufender Touren angelegt, wobei die sich überkreuzenden Fasersysteme die Randleisten zweier benachbarter Wirbel miteinander verbinden. In der Innenzone liegen die Fasern weniger dicht und sind willkürlicher verteilt [50]. Zwischen den Kollagenfasern kommen auch elastische Fasern vor. Diese bestehen aus Elastin (ELP - elastin like protein) und bewirken die Wiederherstellung der BS-Form nach Lastaufnahme. Die Zellen im AF besitzen spindelförmige Gestalt. In den Außenzonen des AF ähneln die Zellen Fibroblasten, zum NP hin der dortigen Zellpopulation [44].

Etwa 60-80% des Trockengewichtes des AF bestehen aus Kollagenfasern vom Typ I, die im menschlichen Körper weiterhin in Bandstrukturen, Knochen, Sehnen und der Haut vorkommen [26, 49]. Weitere Kollagenfraktionen sind Typ II (ca. 30% des Kollagens), Typ V (3%), Typ VI (10%) und Typ IX (2%). Der Anteil an wasserbindenden Proteoglykanen beträgt etwa 10% [49, 50].

1.4.2.2 Nucleus pulposus

Die Zellen im NP ähneln den Chondrozyten im Gelenkknorpel. Sie sind in eine Matrix aus Kollagenfibrillen und PG eingebettet. Der Kollagenanteil ist mit 20-30% der Trockenmasse deutlich geringer als im AF. Mit Kollagen Typ II kommt vorwiegend knorpelspezifisches

Kollagen vor. Das Kollagenfasergeflecht liegt weniger dicht, so dass der NP bei Krafteinwirkung stark verformt werden kann. Der NP weist einen hohen Gehalt (50% der Trockenmasse) an PG auf [49, 50, 51]. Der Wassergehalt liegt daher bei 80 – 90%.

PG bestehen aus einem Proteinkern und mindestens einer anhängigen Kette von Glycosaminoglycanen (GAG) [50, 52]. Das am häufigsten vorkommende PG im NP ist Aggrecan. Es bindet über Proteinbindung kovalent sulfatierte GAG-Ketten (Chondroitin- und Keratansulfat). Diese Ketten weisen negative Ladungen auf, bewirken über ihr Wasserbindungsvermögen die Regelung des osmotischen Drucks im NP und bestimmen über den Ein- und Ausstrom von Wasser das biomechanische Verhalten der BS wesentlich. Die BS kann als „Wasserkissen“ den auf sie einwirkenden Druckkräften widerstehen und diese gleichmäßig entlang der WS verteilen [26, 53].

Der Wasserstrom zum/vom NP ist zudem für den Metabolismus der BS von entscheidender Bedeutung, da das physiologisch avaskuläre Gewebe des NP über Diffusion ernährt werden muss. Mit zunehmendem Lebensalter nimmt die Zellzahl im NP ab. Dann liegen überwiegend zellfreie Bezirke vor, die nur aus amorpher Matrix bestehen [52]. Während die embryonale BS noch über eine Blutversorgung bis in die zentralen Bereiche des AF verfügt, entwickelt sich diese Vaskularisation bereits im Kleinkindalter zurück. Als mögliche Ursache für die Gefäßatrophie werden die mit der aufrechten Körperhaltung des Menschen einhergehenden Druckverhältnisse in den BS diskutiert [2].

Die Zellen im NP sind abgerundet und weisen außerdem einen höheren Anteil an Zytoplasma auf. Sie besitzen eine geringe Mitoserate, ein niedriges Regenerationspotential und sind an die ungünstigen Stoffwechselbedingungen (hypoxisches, acides Zellmilieu) adaptiert [16]. Sie exprimieren einerseits chondrozytentypische Zellmarker wie SOX-9, aggrecan und col-II [54, 55]. Andere Marker sind dagegen für NP-Zellen typisch: CD24, CA12, HIF-1, OVOS-2, PAX1 und Cytokeratin KRT19 [56, 57, 58, 59]. Die Expression letztgenannter Marker lässt unterschiedliche Hypothesen bezüglich der Herkunft dieser Zellen zu. Es wird angenommen, dass sie nach dem Rückgang der Chorda dorsalis von peripher aus der KE und dem AF immigriert sind [27]. Andere Autoren favorisieren die Theorie, dass sie der Chorda dorsalis entstammen und während der Embryonalentwicklung segmental in die späteren BS gelangen [27, 59]. In juvenilen BS sind diese Zellen noch vorhanden.

Weiler et al. [59] konnten über den immunhistochemischen Nachweis von KRT19 und weiterer Marker belegen, dass diese Zellen mit zunehmender BS-Degeneration nicht mehr im NP zu identifizieren sind.

Neben den kleinen NP-Zellen können in den BS von Neugeborenen auch Nester von größeren Notochordalzellen nachgewiesen werden, die aber offenbar während der BS-Degeneration verloren gehen und in adulten - degenerierten - BS nicht mehr nachweisbar sind [27]. Die Notochordalzellen sind mehr noch als die NP-Zellen zur Synthese von EZM befähigt. Es wird daher angenommen, dass bei Spezies, die während ihres gesamten Lebens Notochordalzellen besitzen (z. B. Nagetiere, Schweine, non-chondrodystrophe Hunde) spontane Reparaturvorgänge in den BS stattfinden [36, 60, 61]. Diese Überlegungen müssen bei der Auswahl von Tiermodellen beachtet werden.

1.4.2.3 Kartilaginäre Endplatte

Die KE erfüllt eine wichtige Funktion im Metabolismus der BS und hat engen Kontakt zu den zentralen Abschnitten des AF. Sie stellt eine im Mittel 0,6 mm (zentral maximal 1 mm) dicke Schicht zwischen den Abschlußplatten der Wirbelkörper und den BS dar. Vom äußeren AF strahlen Kollagenfasern in einem Winkel von ca. 120 Grad und vom NP in einem Winkel von ca. 90 Grad ein. Auf diese Weise besteht ein kontinuierlicher Übergang vom faserknorpeligen AF auf die kartilaginäre Endplatte [44]. Histologisch ist im Zentrum eine höhere Zellzahl als peripher festzustellen [62]. An dieser Stelle finden die Stoffwechselfvorgänge zur Ernährung des NP statt.

1.5 Biochemische Grundlagen der Bandscheibendegeneration

Die Physiologie der BS ist an die Intaktheit der EZM und deren biochemische Eigenschaften gebunden. In der gesunden BS des Jugendlichen bzw. Erwachsenen werden der Nährstofftransport und der Abtransport der Stoffwechselmetabolite fast ausschließlich über Diffusionsvorgänge, die nach dem Fickschen Prinzip ablaufen, realisiert [8, 22, 63]. Die zentralen Abschnitte des AF und der NP sind avaskulär und nicht innerviert [8, 18, 64].

Die einlaufenden Blutgefäße in die Randbereiche des AF und die KE sind als funktionelle Endgefäße der Lumbalgefäße anzusehen.

Der Blutfluss in diesen Gefäßen und die Aufrechterhaltung des für die Diffusion in die BS wichtigen Konzentrationsgefälles an Nährstoffen und Sauerstoff werden acetylcholinerg vermittelt. Der Flüssigkeitsstrom in den NP und die Nutrivorgänge unterliegen einem Tag-Nacht-Rhythmus und sind abhängig von der körperlichen Aktivität des Individuums [65].

Während der BS-Degeneration kommt es im NP zum Verlust der originären EZM auf Grund des gestörten Zellstoffwechsels (eingeschränkte Nutrition, Akkumulation von Gewebedetritus und Stoffwechselprodukten) sowie proteolytisch wirkender Enzyme wie Serinproteinasen (SP) und katabol wirkender Metalloproteinasen [19, 66, 67]. Auch der Abbau der PG und der Proteine der EZM wird durch SP, Matrix Metalloproteinasen (MMP), Aggrecanase, Zytokine (IL-1, IL-6), Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), Prostaglandine (E2), Stickstoffoxid und ADAMTS (a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs) gesteuert [12, 50, 64, 68]. In degenerativ veränderten BS sind verstärkte Aktivitäten von MMP nachweisbar [8, 64, 68], während in gesunden BS inaktivierende Marker (TIMP; tissue inhibitors of MMP) nachzuweisen sind [69, 70].

Es sind mehrere Subtypen der MMP (MMP-1, -3, -7, -8, -10, -19) bekannt; diese wirken auf Zellebene an unterschiedlichen Ansatzstellen. Die Synthese von MMP-10 wird durch Zytokin IL-1 und TNF- α stimuliert [8, 64]. MMP-10 (Stromelysin-3) wirkt nicht nur direkt proteolytisch sondern auch als Aktivator der Proenzyme der MMP-1, -7, -8, -9 und -13 [64, 71, 72]. Über Verschiebungen des pH-Wertes in ein saures Milieu wird außerdem zusätzlich die Produktion der MMP katalysiert und die Synthese von GAG negativ beeinflusst [18, 73].

Auf Zellebene sind die ersten Phasen der BS-Degeneration während der Adoleszenz durch eine noch intakte Biosynthese der EZM gekennzeichnet. Parallel beginnen die Denaturierung und Umstrukturierung des Kollagens. Dies führt zur Herabsetzung der Widerstandsfähigkeit des AF gegen die aus dem NP vermittelten Kräfte [8] und zum Verlust der Matrixmoleküle [51]. Durch die gestörte Vernetzung der Kollagenfibrillen und die zunehmende Synthese von Kollagen Typ I im NP verändern sich die biomechanischen Eigenschaften der gesamten BS [50, 74, 75]. Die Binnenstruktur des NP verliert ihre gelartige Konsistenz und verfasert. Die Abnahme des Wasserbindungsvermögens führt über eine negative Rückkopplung zur Dehydrierung des NP und zur verminderten Synthese der EZM. Dabei nehmen sowohl der Gehalt an PG als auch deren Kettenlänge ab [76, 77, 78].

Dieser Vorgang mündet i. S. eines circulus vitiosus in die rückläufige Synthese von Aggrecanen und Kollagen Typ II im NP, die weiter zunehmende Denaturierung von Kollagen Typ II und den Ersatz durch Kollagen Typ I [79, 80].

Die Degeneration verschlechtert nicht nur die biomechanische Belastbarkeit der BS, sie forciert ihrerseits auch die auf Zellebene ablaufenden Denaturierungsprozesse. Beispielsweise führt die Stimulation einer bereits degenerierten BS-Zelle mit Zytokin IL-1 zur stärkeren Synthese von MMP-13 und Aggrecanase als in einer nicht degenerierten Zelle [8].

Durch die mit zunehmendem Lebensalter stattfindende Kalzifizierung der kartilaginären Endplatte entsteht eine unregelmäßige Knochenoberfläche an den KE. Auch in der BS werden Kalksalze abgelagert [81], die damit die Diffusionsstrecke zwischen KE und NP verändern und die Nutrition der BS-Zellen beeinträchtigen [26, 49, 65]. Über den verminderten osmotischen Druck und die gestörte Gewebearchitektur verändern sich sowohl die Form als auch die Höhe der betroffenen BS und der BS benachbarter Bewegungssegmente.

In den physiologisch avaskulären BS kann im Zuge der Degeneration durch Gefäßeinsprossung ein fibrovaskuläres faserreiches Granulationsgewebe entstehen [46, 64, 82]. Daneben können auch nozizeptive Nervenfasern in den zentralen Dritteln des AF und im NP nachgewiesen werden. Zelluläre Marker hierfür sind u.a. Substanz P und nerve growth factor (NGF). Diese Marker sind bei Patienten mit chronischen RS nachgewiesen worden [64, 83]. Weitere Zellmarker sind PECAM-1 (platelet endothelial cell adhesion molecule) und BDNF (brain-derived neurotrophic factor). PECAM-1 sind Adhäsionsmoleküle auf der Oberfläche von humanen Endothelzellen, die eine interzelluläre Adhäsion zwischen benachbarten Endothelzellen ermöglichen. In nicht degenerativ veränderten BS sind diese Marker nicht nachzuweisen [83, 84, 85].

1.6 Mechanik des lumbalen Bewegungssegmentes

Innerhalb des Bewegungssegmentes wirken die BS zwischen den Wirbelkörpern ähnlich eines Kugellagers [12]. Um die BS findet eine Drehbewegung der am Bewegungssegment beteiligten WK statt. Die Summe der BS kann als komplexe gelenkige Verbindung innerhalb der WS aufgefasst werden, wobei Translationsbewegungen in der Sagittalebene möglich sind, Druck- und Scherkräfte aufgenommen und auf die Wirbelkörper verteilt werden.

Über die BS ist im Bewegungssegment eine dreidimensionale Beweglichkeit möglich, die in allen Freiheitsgraden begrenzt wird. Die FG begrenzen Torsions-, Scher- und Extensionsbewegungen. Die Bänder limitieren die Seit- und Vorwärtsflexion [43].

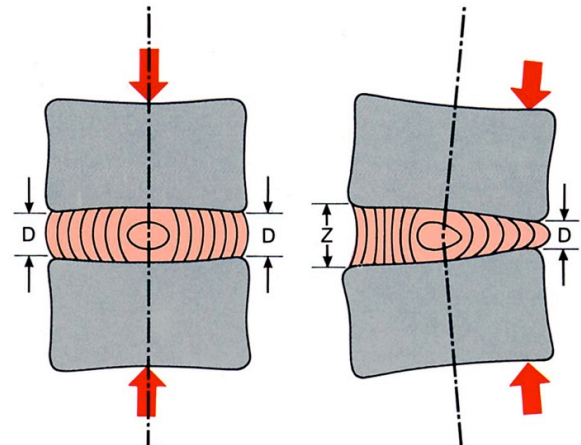
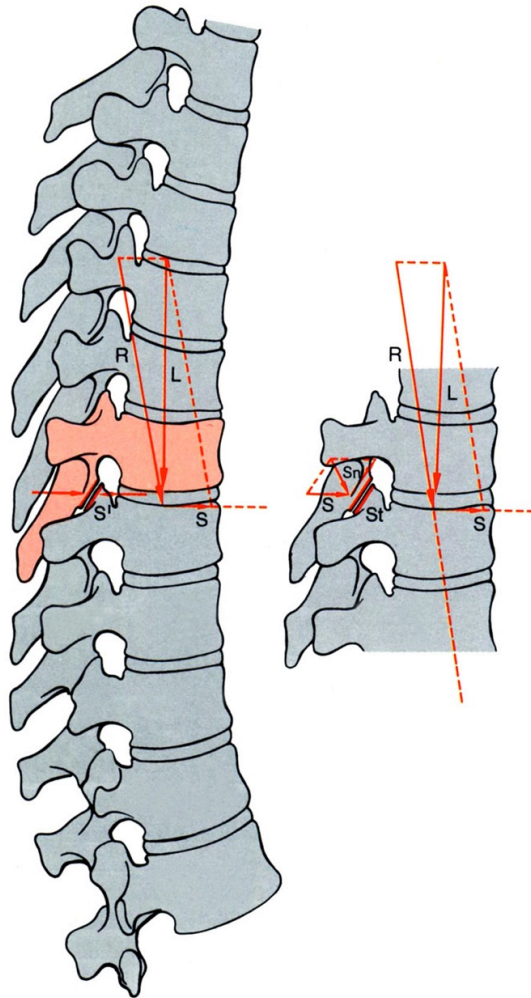


Abbildung 3 (aus [38]): Schema der Zug- und Druckbelastung der Anulusfasern bei zentrischer und exzentrischer Krafteinwirkung auf die WS (rote Pfeile)
D = Druckbelastung
Z = Zugbelastung

Abbildung 2 (aus [38]): Die Längskraft (L) führt zur Druckbelastung der BS. Diese Druckbelastung wird auf die WK übertragen. Die tangential gerichtete Scherkraft (S) beansprucht die FG auf Druck. Dieser Druckbelastung wirken Muskel- und Bandkräfte entgegen, die somit eine Ventrolisthesis der WK entlang der FG verhindern.

Die Belastung wird innerhalb eines Bewegungssegmentes im Sinne einer Dreipunktlagerung über die Wirbelkörper, die BS und die FG umgesetzt (Abbildung 2). Der aufrechte Gang des Menschen geht mit der zunehmenden Belastung - vor allem der lumbalen - BS einher. Thorakal ist die Rumpflast geringer, und die BS werden durch den knöchernen Thorax und die intercostale Muskulatur entlastet. Der intradiskale Druck beträgt im Liegen zwischen 147,09 und 245,16 N/m^2 , erhöht sich im Stehen auf 980,66 N/m^2 und beträgt im nicht angelehnten Sitzen 1470,99 N/m^2 [43, 86, 87]. Eine weitere Druckerhöhung tritt u. a. beim Husten, Heben oder Tragen, bei Arbeiten in Armvorhalte oder beim Vorbeugen des Rumpfes um mehrere 100 N/m^2 auf [88].

In einem Bewegungssegment herrscht ein Gleichgewicht zwischen den jeweils von ventral und dorsal und den axial auf die WS antagonistisch wirkenden Kräften (Körpergewicht - Muskel-Band-Kraft). Da beim Erwachsenen die Spongiosa der WK ohne Grenze in die knöchernen Randleiste übergeht, werden die Zugkräfte in der BS direkt auf die Spongiosatrabel der WK übertragen.

Die lumbalen BS besitzen eine Fläche von 14 - 24 cm² (Mittelwert 17 cm²) und ein Volumen von durchschnittlich 1,5 cm³ [89]. Über die BS werden die WK axial auf Druck beansprucht, wobei der gering kompressible NP unter der Druckeinwirkung eine Spannungsverteilung auf die über und unter ihm liegenden KE der Wirbelkörper vermittelt. Dadurch, dass sich der NP auch in der Horizontalebene (also im Zwischenwirbelraum zweier benachbarter WK) ausdehnt, wird gleichzeitig Druck auf den AF ausgeübt; bei exzentrischer Krafteinwirkung werden die Bindegewebslamellen kontralateral zusätzlich auf Zug beansprucht (Abbildung 3).

Diese Druck- und Zugkräfte werden durch den darunter und darüber liegenden Knochen aufgenommen. Die Stärke der Spongiosatrabel ist proportional der Höhe der Beanspruchung [12, 38]. Die knöchernen Randleisten können hierbei als Verstärkung der WK-Abschlussplatten aufgefasst werden.

Die kleineren Bänder auf Segmentebene bzw. zwischen den Segmenten bewirken eine Vergurtung der durch sie überspannten WK und tragen damit zur Stabilisierung der Bewegungssegmente bei. Vor allem die Ligg. supraspinalia nehmen hierbei in Flexion die höchsten Beträge der einwirkenden Last auf, gefolgt von den Ligg. flava, dem Kapsel-Band-Apparat der FG und den Ligg. intertransversalia [90].

1.7 Bildgebende Verfahren zur Beurteilung der Bandscheibendegeneration

1.7.1 Konventionelle Röntgendiagnostik, Discographie

Die Standardaufnahmen der WS in 2 Ebenen werden durch Schrägaufnahmen ergänzt, in denen die Foramina intervertebralia und die FG abgebildet werden können. Die BS selbst sind auf den Röntgenaufnahmen nicht zu erkennen, anhand der Distanz zwischen zwei benachbarten WK kann auf ihre Höhe geschlossen werden (mittlere Höhe cervical/kranial-thorakal 4-5 mm, kaudal-thorakal 6-8 mm, lumbal 10-12 mm). Die Aufnahmen sollten im Stehen durchgeführt werden, da die axiale Belastung der WS in dieser Körperhaltung die pathologischen Veränderungen in den jeweiligen Abbildungsebenen sichtbar werden lässt.

In den Übersichtsaufnahmen der WS können außerdem Differentialdiagnosen wie Osteolysen, Tumorerkrankungen oder ossäre Metastasen abgebildet werden [30]. Mit zunehmender BS-Degeneration werden die BS durch die Einlagerung von Kalksalzen u. U. auch direkt abbildbar. Die Discographie ist ein röntgengestütztes Verfahren, bei dem minimalinvasiv die Injektion eines Kontrastmittels in den NP vorgenommen wird. Die Verteilung des Kontrastmittels lässt Rückschlüsse auf Pathologien der BS zu. So kann der Austritt von Kontrastmittel aus der BS heraus eine Läsion im AF offenbaren.

1.7.2 Computertomographie

In Kombination mit der Myelo- bzw. Discographie können bereits frühe Schädigungsbefunde, die in der T2 gewichteten MRT unauffällig erscheinen, detektiert werden. Durch die Kombination der CT mit der Myelographie können knöcherne Veränderungen dargestellt werden, die als Korrelat der Spinalkanalstenose zur Kompression von Nervenwurzeln bzw. zu spinalen Kompressionssyndromen führen. Außerdem sind BS-Protrusionen und Veränderungen der Weichgewebe (Bandstrukturen, Knorpelbedeckungen) abbildbar, gerade bei Anwendung von Kontrastmitteln [91, 92]. Die Beurteilbarkeit der CT kann durch Artefaktbildung infolge einliegender Implantate verschlechtert sein. Die CT ist hingegen auch bei Patienten mit einliegenden Schrittmacheraggregaten durchführbar.

1.7.3 Magnetresonanztomographie

Als im klinischen Alltag flächendeckend zur Verfügung stehendes Verfahren werden in der Routine-Magnetresonanztomographie (MRT) die in den T2 gewichteten Aufnahmen (Spin-Spin-Relaxation) abbildbaren Signalveränderungen herangezogen, indem der Wassergehalt der BS (Helligkeit) und der Gehalt an Kollagen und dessen Struktur beurteilt werden [93].

Außerdem kann die Struktur der WK, insbesondere der Abschlussplatten, der BS selbst und des RM wiedergegeben werden [93]. Problematisch ist, dass bei Patienten, die unter RS leiden, oftmals unspezifische Veränderungen der BS festgestellt werden, wie sie auch bei Vergleichsgruppen ohne Beschwerden zu finden sind [94, 95], so dass die klinische Interpretation dieser Befunde schwierig sein kann. In der MRT abbildbare Signalveränderungen in den BS und den KE sollten daher mit klinischen pathologischen Befunden korreliert werden können.

Sinkende T2-Werte im NP und steigende T2-Werte im peripheren dorsalen AF weisen auf eine fortschreitende BS-Degeneration hin [96].

Zur Beurteilung der BS-Degeneration sind mehrere Klassifikationen etabliert, die valide die MRT-morphologischen Befunde in ein klinisch anwendbares System übertragen sollen.

Modic et al. [82] stellten 1988 eine Klassifikation vor, die anhand von Signalveränderungen im KM der WK-Endplatten das Ausmaß der Wirbelkörperdegeneration quantifizieren sollte [33].

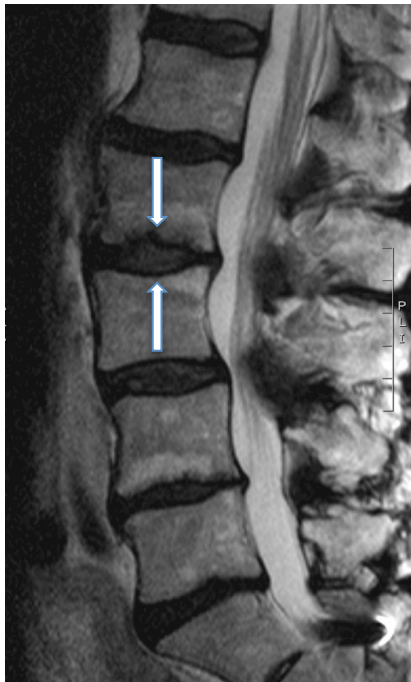


Abbildung 4: MRT der LWS, T2-Wichtung, Deck- und Grundplatten-ödem bei LWK 2/3 (Pfeile) - aktivierte Osteochondrose Modic 1

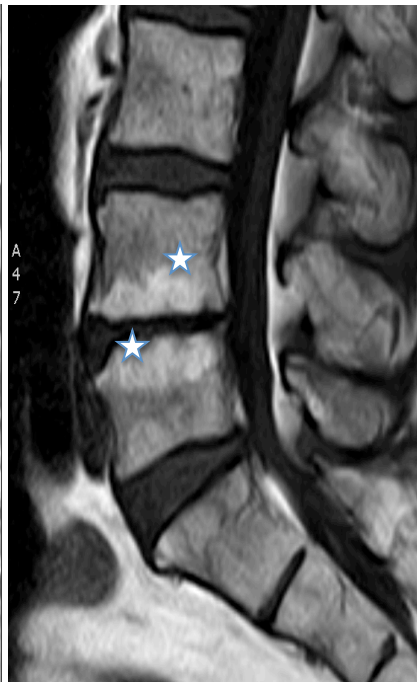


Abbildung 5: MRT der LWS, T1-Wichtung, grundplattenassoziierte fettige Degeneration bei LWK 4/5 (Sterne) - Typ Modic 2



Abbildung 6: MRT der LWS, T1-Wichtung, deck- und grundplattenparallele Sklerose bei LWK 1/2 (Kreuze) - Typ Modic 3

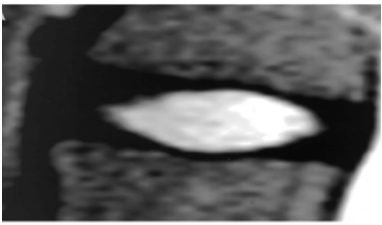
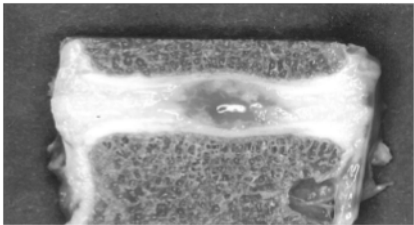
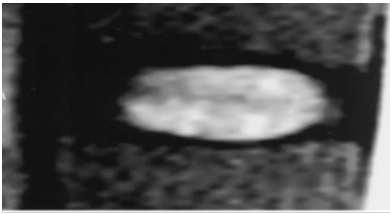
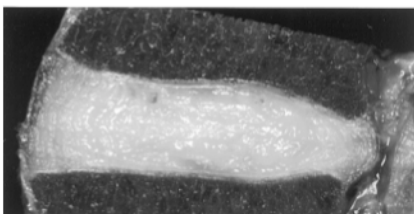
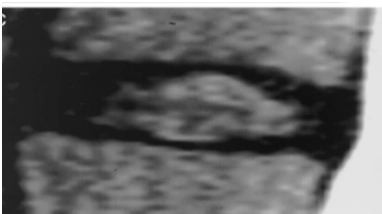
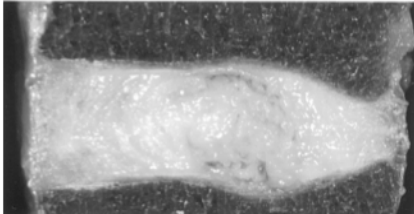
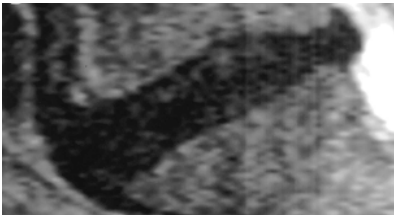
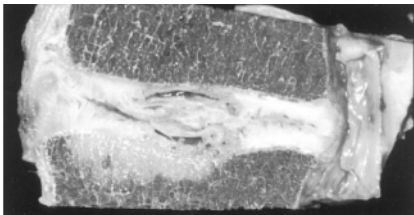
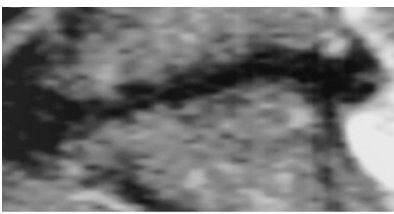
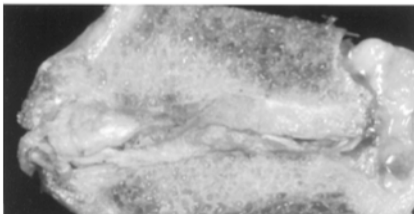
Tabelle 1: Modic-Klassifikation der Wirbelkörperdegeneration [82]

Typ I	entzündliche Veränderungen im Knochenmark (Abbildung 4)	hypointenses Signalverhalten (SV) in T1, hyperintenses SV in T2
Typ II	fettige Degeneration des Knochenmarks (Abbildung 5)	hyperintenses SV in T1, iso- oder leicht hyperintenses SV in T2
Typ III	Sklerose der Grund- und Deckplatten (Abbildung 6)	hypointenses SV in T1, hypointenses SV in T2

Weitere Klassifikationen gruppieren die BS-Degeneration anhand der morphologischen Veränderungen ihrer Komponenten NP, AF und KE. Durch Pfirrmann et al. [93] wurde 2001 ein 5stufiges Gradingssystem implementiert (Tabelle 2), welches im klinischen Alltag anhand der T2-gewichteten MRT der LWS eine Beurteilung der lumbalen Degeneration erlaubt.

Neben der BS-Struktur (homogen-heterogen) werden die BS-Höhe, die Unterscheidbarkeit von NP und AF und der intradiskale Wassergehalt (Helligkeit; Grauwerte) betrachtet.

Tabelle 2: Gegenüberstellung MR-Klassifikation und pathomorphologische Klassifikation, modifiziert nach [98]

Grad	MR-Klassifikation (MR) nach Pfirrmann [93]	Beschreibung, Besonderheiten	Histopathologische Klassifikation (HP) nach Thompson [98]
I		MR: homogene BS, klare Struktur, heller hyperintenser NP, normale Höhe HP: NP weiß, gelatinös, keine Verfaserung, keine Fissuren	
II		MR: inhomogene BS (horizontale Streifen), klare Struktur, heller hyperintenser NP, normale Höhe HP: NP etwas verfasert, Fissuren zum intakten AF	
III		MR: inhomogene graue BS, intermediäres Signal im NP, Höhe abgeflacht HP: NP komplett verfasert, Fissuren im NP und AF	
IV		MR: BS inhomogen, grau/schwarz, Höhe abgeflacht HP: BS komplett verfasert, Risse im (posterioren) AF, äußere AF-Lamellen intakt	
V		MR: BS schwarz, NP hypointens, Höhe kollabiert HP: Risse durch den kompletten AF, Austritt von NP-Gewebe nach dorsal	

Vergleichbar mit der MR-Graduierung liegt ein ebenfalls 5stufiges System zur pathomorphologischen Klassifizierung der BS-Degeneration von Thompson et al. [98] vor.

Anhand von ex vivo-Untersuchungen an Kadaver-BS werden auch in dieser Klassifizierung die strukturellen Veränderungen des NP und des AF in den Fokus der Betrachtung gestellt (Tabelle 2).

Bei Patienten nach stattgehabten BS-Operationen (z.B. wegen eines BS-Vorfalles) sollen im Falle erneut auftretender Schmerzen Rezidivprolapse von Narbengewebe unterschieden werden, um die Indikation zur Reintervention prüfen zu können. Die in der MRT fassbaren Veränderungen können als qualitativer und quantitativer Marker der BS-Degeneration angesehen werden, wobei diese Veränderungen sehr viel häufiger bei symptomatischen als asymptomatischen Menschen gefunden werden, also fast immer mit RS verbunden sind [33]. Dabei können unterschiedliche Befunde ineinander übergehen, sich aber auch wieder rückbilden. Die MRT ist somit in der Lage, anhand der Knochenmarkkonversion und der Konfiguration der BS selbst Rückschlüsse auf die Ausprägung der BS-Degeneration zu ziehen und stellt ein diagnostisches Verfahren mit hohem Aussagewert dar [82, 93].

1.8 Behandlung degenerativer Wirbelsäulenerkrankungen

1.8.1 Konservative Behandlung

Die konservative Behandlung stenosebedingter RS ist eine häufige und im Einzelfall schwierige klinische Aufgabe. Während bei der Behandlung akuter Schmerzereignisse die gezielte medizinische Symptomlinderung und die möglichst rasche Wiedereingliederung des Patienten in seinen beruflichen Alltag im Vordergrund stehen, zielt die Therapie chronischer RS mehr auf die psychosomatische, rehabilitative bzw. sozialmedizinische Ebene. Die konservative Behandlung des akuten unspezifischen RS ruht auf 2 Säulen: den medikamentösen und den nicht-medikamentösen Maßnahmen.

In der Akutphase des RS werden körperliche Schonung bzw. Entlastung der WS, Bewegungsübungen und eine begleitende medikamentöse Therapie zur Schmerzbehandlung einzeln oder in Kombination empfohlen [6, 99]. Gerade die körperliche Schonung (Bettruhe) wird in ihrem Nutzen kontrovers diskutiert [99]. Vielmehr soll eine Aktivierung des Patienten erfolgen, die aber unter Umständen nur nach einer (kurzen) initialen Ruhephase und erst durch eine adjuvante medikamentöse Schmerztherapie realisierbar wird. Klassischen nicht steroidalen Antirheumatika ist der Vorzug vor Opioidabkömmlingen zu geben [6, 100]. Die Opiodtherapie sollte zeitlich begrenzt erfolgen, um Gewöhnungseffekte zu vermeiden.

Bei Versagen der konservativen Therapie oder dem Auftreten neurologischer Symptome (Claudicatio spinalis im Falle einer Spinalkanalstenose, motorische Ausfälle der entsprechenden Kennmuskeln bei BS-Prolaps oder das Auftreten ein Conus-Cauda-Syndrom) ist die operative Therapie - u. U. notfallmäßig - indiziert [100]. Durch den Patienten angegebene RS ohne oder nur mit geringer Ausstrahlung in das Bein müssen Anlass zur weiteren diagnostischen Klärung sein.

1.8.2 Operative Behandlung

Die operative Therapie des konservativ nicht beherrschbaren RS, degenerativer aber auch spezifischer WS-Erkrankungen ruht auf vier Säulen: der spinalen Dekompression, der dynamischen Stabilisierung, der partiellen oder kompletten Entfernung der BS mit oder ohne Implantation einer BS-Prothese bzw. spinaler Fusion und minimal-invasiven Verfahren [101].

Als nach wie vor am häufigsten angewandtes operatives Verfahren behebt die spinale Fusion die degenerativ bedingte Mikroinstabilität im entsprechenden WS-Segment [106]. Mit der Implantation von kortikospongiösen Spänen oder perforierten Körben (Cage) wird der BS-Raum zwischen zwei WK überbrückt. Die Körbe können mit autologer Spongiosa befüllt und/oder mit Wachstumsfaktoren beschichtet sein [107]. Die „posterior lumbar interbody fusion“ (PLIF) stellt hierbei das am meisten angewandte Verfahren dar und wurde 1953 von Cloward vorgestellt [108]. Sie umfasst neben der ausgedehnten Dekompression des Spinalkanals zur Entlastung der Nervenwurzeln über einen dorsalen Zugang die komplette Discektomie und zieht damit die Verblockung des WS-Segmentes mittels Knochentransplantat oder mittels Cage nach sich.

Die Cages bestehen aus verschiedenen Materialien (PEEK = Polyester-Ester-Keton, PEI = Polyetherimide verstärkt mit Karbonfasern, Edelstahl oder Titan). Die Oberfläche kann mit Hydroxylapatit beschichtet sein, um die Assimilation des Cages in den Knochen zu verbessern [109]. Je nach Material und Design der Cages variieren deren biomechanische Eigenschaften und Interaktionen mit den WK-Endplatten [110]. Durch den Einsatz von Kunststoffen können die durch metallischen Abrieb bedingten Fremdkörperreaktionen reduziert werden.

Die Vorteile der zusätzlichen Instrumentierung bestehen zum einen in der Distraction des BS-Faches während der Dekompression bzw. Discektomie, zum anderen in der Kompression und damit Stabilisierung der implantierten Knochenblöcke oder Spacer. Somit kann die Pseudarthroserate gesenkt werden (5-35%), und die Nachbehandlung der Patienten kann ohne externe Stabilisierung (Korsett) frühzeitiger beginnen.

Auch durch den Einsatz von Substanzen, die das Knochenwachstum anregen (z. B. BMP 2 = bone morphogenic protein 2), kann die Pseudarthrose rate gesenkt werden [107, 111, 112].

Die Vorteile der spinalen Fusion bestehen in der raschen Linderung der RS. Mittel- und langfristig muss aber in Kauf genommen werden, dass die biomechanische Funktionalität des betreffenden Wirbelsäulenabschnittes aufgehoben bleibt. Damit gehen grundsätzlich die biomechanischen Eigenschaften der gesunden BS verloren, insbesondere die Fähigkeit, innerhalb eines Bewegungssegmentes auch unter axialer Belastung Rotationsbewegungen bzw. Beuge- und Streckbewegungen zu ermöglichen [8]. Dies hat direkte Auswirkungen auf die benachbarten Abschnitte der WS und führt dort in der Folge zu einer erhöhten biomechanischen Belastung [27, 101].

Diese Überlegungen führten zur Implementierung dynamischer Stabilisierungsverfahren bzw. dem Einsatz von BS-Ersatzmaterialien, aktuell vor allem in Form von BS-Prothesen [8, 12]. Die Vorteile gegenüber der spinalen Fusion bestehen darin, dass die Beweglichkeit des betreffenden WS-Segmentes zumindest teilweise erhalten bleibt, so dass die Mehrbelastung angrenzender Bewegungssegmente vermindert werden kann. Je nach Prothesendesign und –werkstoff können dabei vor allem die Flexionsbewegungen der WS aufrechterhalten werden [8, 105]. Nachteilig sind bei der Anwendung von Metallprothesen (z. B. Titan) mechanische Alterationen an den Kontaktflächen zwischen WK und dem Metallimplantat [12]. Anforderungen an die Implantate sind adäquate Belastbarkeit, Gewebeverträglichkeit und Langlebigkeit.

Sogenannte dynamische Stabilisierungssysteme werden angewandt, um das zu versorgende degenerierte Bewegungssegment zu stabilisieren und durch die erhaltene Beweglichkeit die negativen Effekte auf die Nachbarsegmente zu reduzieren. Damit kann das Voranschreiten der Anschlussdegeneration verlangsamt werden, da physiologische Bewegungen im Bewegungssegment weiterhin möglich sind [102]. Die BS wird in situ belassen. Die potentiell positiven Effekte sind u. a. abhängig vom Design der Implantate [103]. Es ist belegt, dass das längerfristige Outcome gegenüber der spinalen Fusion nicht besser ist [104].

1.8.3 Regenerative Behandlung, Zelltherapie

Sowohl die konservative Behandlung als auch die operativen Therapieverfahren zielen darauf ab, den RS zu lindern, sind also symptomatische Behandlungsansätze, ohne die BS-Degeneration per se zu beeinflussen. Gerade die operativen Therapieverfahren können einen erheblichen Eingriff in die Biomechanik der WS darstellen. Sie können zwar kurz- bis mittelfristig zur

Beschwerdelinderung führen, sind aber auch mit Nachteilen behaftet, die sich durch die veränderte Wirbelsäulenkinematik entwickeln [101]. Häufig müssen auf stabilisierende Wirbelsäuleneingriffe weitere Operationen folgen, um die fortschreitende Degeneration in den Nachbarsegmenten fusionierter WS-Abschnitte zu behandeln [113]. Ein weiterer Nachteil der operativen Therapieformen ist der fehlende Langzeiteffekt. Oft wird der positive schmerzlindernde Effekt einer Fusion durch die zunehmende Degeneration in den benachbarten Bewegungssegmenten aufgehoben [114].

Das Prinzip der regenerativen Therapie (rT) umfasst nicht nur die Beeinflussung der Symptome und Folgen der BS-Degeneration sondern den kausalen Therapieansatz am BS-Gewebe selbst [115]. Damit soll die biomechanische Funktion der gesunden BS erhalten oder wiederhergestellt werden. In den vergangenen Jahren wurden regenerative Therapieansätze vorgestellt, die sich in den meisten Fällen noch im Stadium der Grundlagenforschung befinden [116, 117]. Von besonderem klinischem Interesse sind Behandlungsansätze, die auf die Regeneration nach einem stattgehabten BS-Vorfall ausgerichtet sind, da nach diesem ein dauerhafter Höhenverlust der BS auftritt, der mit einer mechanischen Überbelastung des betroffenen Bewegungssegmentes verbunden ist und zu weiteren Folgeschäden auch in benachbarten Segmenten führen kann [118]. Im Fall einer Ruptur des AF treten etwa 0,5-1 cm³ degeneriertes Gewebe in den SK aus und können über Nervenwurzelkompression zu sensomotorischen Einschränkungen an den unteren Extremitäten führen. Nach operativer Sequestrektomie bildet sich über der Anulusruptur ein Narbengewebe aus, welches den AF in gewissen Grenzen wieder druckstabil verschließt. Daher sollten Regenerate erst nach einer Zeitspanne von einigen Wochen in die BS eingebracht werden, um deren Austritt aus der BS zu vermeiden.

Ansatzpunkt der rT sind die Strukturveränderungen der BS, also der Zellverlust im NP, der Verlust bzw. die verminderte Synthese der EZM, die damit verbundene Verschlechterung des Wasserbindungsverhaltens der BS und die Desorganisation des Kollagenetzwerkes. Für eine erfolgreiche rT sollen diese Veränderungen ein bestimmtes Maß nicht überschritten haben, da bereits fortgeschritten degenerierte BS-Zellen schlechter in der Lage sind, sich zu regenerieren [116]. Von besonderer Bedeutung ist, dass das degenerierte BS-Gewebe der Individuen selbst genutzt werden kann, um die Zelllinien für die rT zu entwickeln (autologe Transplantation). Das bedeutet neben hoher Biokompatibilität die Minimierung möglicher immunologischer Reaktionen (Graft-versus-Host-Reaktion).

Auch mechanische Alterationen, wie sie an den Kontaktstellen zwischen alloplastischen Implantaten und den WK-Endplatten regelmäßig beobachtet werden, können auf diese Art vermieden werden [12].

Die Induktion der Zellproliferation durch Wachstumsfaktoren ist an das Vorhandensein vitaler Chondrozyten gekoppelt [119]. Außerdem kann die Migration der Regenerate in die BS bei destrukturierter Diffusionsstrecke zum NP hin unmöglich werden [120]. Andererseits ist am ex vivo-Präparat (bovine BS) beobachtet worden, dass die Migration entsprechend induzierter Stammzellen in das BS-Gewebe durch die Präsenz inflammatorisch wirkender Marker (z. B. IGF-1, insulin like growth factor-1), wie sie typischerweise im Rahmen der Degeneration auftreten, gesteigert werden kann [121]. Ziel der rT ist die Wiederherstellung der BS-Architektur und -höhe, indem die eingebrachten gelartigen Regenerate Defekte im NP auffüllen und in die BS integriert werden. Da die Mehrbelastung benachbarter WS-Segmente anders als bei der spinalen Fusion hierbei nur gering ist, sollte dieser Therapieansatz einen Langzeiteffekt versprechen.

Schon im Jahre 1931 beschrieb der Schweizer Arzt Paul Niehans das Prinzip der „Zellulärtherapie“, indem er Probanden unterschiedliche Zelltypen injizierte, um Krankheiten zu behandeln [122]. 1974 wurden durch die Arbeitsgruppe um Friedenstein [123] erste Forschungen zur Charakterisierung von Knochenmarkszellen publiziert.

Die Zelltherapie bedient sich unterschiedlicher Zelllinien, die den Verlust von Chondrozyten, bandscheibentypischen Zellen bzw. den Verlust von EZM im NP ausgleichen sollen. Dieses Potential besitzen kultivierte Chondrozyten [114, 116, 124], originäre NP-Zellen [125, 126] und mesenchymale Stammzellen [117, 127].

Ein großer Stammzell-Pool existiert im menschlichen Embryo, in der Plazenta und in der Nabelschnur. Aus ethischen Gründen werden diese embryonalen Stammzellen für Forschungszwecke nicht genutzt. Beim adulten Menschen kommen Stammzellen v. a. im Knochenmark und im Fettgewebe vor [8, 128, 129]. Aus dem Knochenmark können hämatopoietische und mesenchymale Stammzellen isoliert und ohne ethische Bedenken genutzt werden [123, 130].

Stammzellen besitzen in vitro und in vivo eine hohe Proliferationsrate. Sie sind pluripotent, d. h., sie können sich unter geeigneten Bedingungen in unterschiedliche Zellen bzw. Gewebetypen differenzieren [131, 132, 133]. Sie können als differenzierte Zellen in parenchymatöse Organe integriert werden oder als undifferenzierte Stromazellen das lokale Zellmilieu beeinflussen [134].

Stammzellen im Fettgewebe (ASC = adipose tissue-derived stem cells), besitzen die gleiche Potenz wie mesenchymale Stammzellen und können sich in unterschiedliche Gewebe differenzieren [135].

Mit Hilfe zellulärer Marker (CD105, CD166, CD63, CD49a, CD90, CD73), die auch als Oberflächenantigene bei mesenchymalen Stammzellen präsent sind, konnten in degenerierten humanen BS Progenitorzellen nachgewiesen werden, was die Annahme stärkt, dass diese Progenitorzellen den mesenchymalen Stammzellen ähneln [136, 137]. Aus gesunden BS isolierte AF-Zellen können - ähnlich mesenchymalen Stammzellen - je nach Stimulation in unterschiedliche Zelllinien (Osteoblasten, Chondrozyten, Adipozyten, endotheliale Zellen) differenziert werden. Es scheint damit möglich, auf eine Knochenmarkspunktion zur Gewinnung von Stammzellen verzichten zu können und stattdessen das BS-Gewebe selbst zu nutzen, um die für die Regenerate erforderlichen Zellreihen zu kultivieren. Da bei vielen operativen Eingriffen an der WS ohnehin BS-Gewebe entnommen wird, scheint die Verfügbarkeit der benötigten Zellkulturen unproblematisch zu sein. Stammzellen scheinen auf Grund ihrer fehlenden antigenen Potenz entsprechende Immunreaktionen nicht zu triggern [138]. Somit könnte also auch die allogene Stammzell-Transplantation (Stammzellspender und -empfänger sind nicht identisch) möglich werden.

Unter entsprechenden Laborbedingungen (saures, hypoxisches Milieu) können Stammzellen phänotypisch NP-Zellen ähnlich werden und Marker bzw. Rezeptoren exprimieren, die eine hohe Affinität für EZM-Komponenten besitzen (CD44 - Hyaluronrezeptor, CD105, CD166) [139]. Vermittelt durch transformierten Wachstumsfaktor (TGF- β – transforming growth factor- β) oder induziert durch originäre Zellen aus dem NP selbst, können sie Eigenschaften entwickeln, die chondrozytentypisch sind [140]. In ex vivo-Versuchen war nachzuweisen, dass die Migration von Stammzellen in die BS durch Mediatoren (Zytokine), die im Zuge der BS-Degeneration ausgeschüttet werden, getriggert werden kann [141]. Am Tiermodell wurde beobachtet, dass sowohl injizierte isolierte Stammzellen [127] als auch Stammzellen in einer Matrix (z. B. Hyaluron) im BS-Gewebe vital bleiben und zum Remodeling der BS-Matrix führen können [117].

Sakai et al. [132] beschrieben die Anwendung von Stammzellen im Tiermodell, indem sie in eine Kollagenmatrix eingebettete Stammzellen in zuvor mittels Aspiration geschädigte BS von Kaninchen injizierten.

Sie konnten beobachten, dass der PG-Gehalt in den so behandelten BS anstieg. Anhand der Expression von Chondroitin-4-Sulfat, Kollagen Typ II und Keratinsulfat wurde durch die Autoren vermutet, dass sich die in die BS injizierten Stammzellen in chondrozytenähnliche Zellen bzw. Zellen, wie sie im NP vorkommen, differenziert hatten.

Auch beim Menschen wurden bereits autologe Stammzellen aus dem Knochenmark betreffender Patienten (chronischer Rückenschmerz, lumbale BS-Degeneration, intakter AF) in die BS injiziert [142]. Obwohl in dieser Studie MRT-morphologisch die BS-Höhe nicht vollständig wiederhergestellt werden konnte, war doch der Wassergehalt der BS als Marker der vitalen BS-Matrix durch die Injektion der Stammzellen signifikant angestiegen. Nachteil der Studie war allerdings die geringe Zahl eingeschlossener Probanden (n=10).

Bereits seit 20 Jahren ist die autologe Chondrozytentransplantation zur Therapie der Gonarthrose etabliert. Intraartikuläre Knorpeldefekte werden mit kultiviertem Knorpelgewebe aufgefüllt [121]. Seit 1997 können in Deutschland auch kultivierte Chondrozyten aus BS medizinisch angewandt werden. Probleme bereiten die eingeschränkte Verfügbarkeit der Chondrozyten und - anders als bei Stammzellen - die Schwierigkeit, Chondrozyten nach ihrer Entnahme kultivieren zu können. Entnahme, Aufbereitung und Applikation der kultivierten Chondrozyten erfordern Sorgfalt und bedeuten einen hohen logistischen Aufwand [124].

Zahlreiche Untersuchungen, auch degenerative BS-Schäden durch die Transplantation von Chondrozyten erfolgreich behandeln zu können, liegen vor. So beschrieben Ganey et al. [116] 2003 am Tiermodell (Hund) die Transplantation kultivierter Chondrozyten in die BS. Die 12 Wochen nach ihrer Entnahme und Kultivierung minimal invasiv wieder eingebrachten Chondrozyten blieben vital und hatten matrixtypische Komponenten produziert. Immunhistochemisch konnte nachgewiesen werden, dass der PG-Gehalt und die Kollagensynthese (Typ I und II) in der BS gestiegen waren. Die BS-Höhe als Indikator des Flüssigkeitsgehaltes im NP hatte ebenfalls zugenommen.

Gorensek et al. [114] berichteten über die Möglichkeit, aus dem Ohrknorpel adulter Kaninchen isolierte Chondrozyten erfolgreich in vitro zu kultivieren und diese nach Entfernung des NP in die BS zu injizieren. Sie wiesen nach, dass die Chondrozyten nach Tötung der Tiere 6 Monate nach der Chondrozytentransplantation einerseits vital geblieben waren, andererseits keine Immunreaktion in den BS stattgefunden hatte.

Die Chondrozyten besaßen allerdings nicht die Fähigkeit zur Elastinsynthese, so dass die Autoren schlussfolgerten, dass die Chondrozyten in der Zellkultur „entdifferenziert“ worden waren, sich also in einem „Progenitorstadium“ befanden [114].

Kleintiermodelle werden auch genutzt, um Schädigungsmuster zur nachfolgenden Prüfung therapeutischer Maßnahmen zu etablieren. Beispielhaft sei hier das Voranschreiten der BS-Degeneration infolge inadäquater Belastung der WS aufgeführt. Kroeber et al. [53] setzten die WS gesunder Kaninchen einer inadäquat hohen mechanischen Belastung aus und untersuchten nach 14 bzw. 28 Tagen den Effekt auf die BS-Höhe. Diese nahm signifikant ab. Außerdem konnte der zunehmende Strukturverlust in den Außenzonen des AF nachgewiesen werden.

Um diese am Kleintiermodell gewonnenen Ergebnisse auf den Menschen übertragen zu können, waren Studien an Großtieren notwendig, damit die Vergleichbarkeit der biometrischen und biochemischen Daten mit der humanen BS besser gegeben war. Generell gilt, dass Kleintiere nicht nur auf Grund der Absolutgröße und der Proportionen ihrer BS sondern auch wegen der Stoffwechselforgänge in den BS zur Prüfung operativer WS-Stabilisierungen, nutritiver Einflußfaktoren und Regenerationsverläufen nach mechanischer BS-Schädigung weniger geeignet sind als große Vierbeiner oder gar Primaten [36].

Der Hund ist zur Etablierung von Schädigungsmodellen häufig untersucht worden. Sowohl in Bezug auf die BS-Anatomie (BS-Durchmesser, -dicke), histologische bzw. biochemische Aspekte (GAG-Gehalt) und den Spontanverlauf der BS-Degeneration liegen Ähnlichkeiten mit dem Menschen vor [61]. Hinzu kommt, dass der Hund auf Grund seiner Domestikation und seines besonderen sozialen Status an der Seite des Menschen häufig einer Behandlung von degenerativ bedingten BS-Schäden zugeführt wird, so dass auch quantitativ eine entsprechende Datenakquise möglich werden kann. Beachtenswert ist hierbei, dass es chondrodystrophe und non-chondrodystrophe Zuchtlinien gibt, die sich in Bezug auf die Ausprägung und das Manifestionsalter zum Zeitpunkt des Nachweises degenerativer BS-Schäden und die lebenslange Anwesenheit von Notochordalzellen im NP (siehe Kapitel 1.4.2.2) unterscheiden.

Weitere Schädigungsmodelle sind für das Schwein [143], das Schaf [144] und die Ziege [145] etabliert worden.

Die Arbeitsgruppe Meisel et al. [146] stellte 2007 eine Studie vor, in welcher sie am Hundemodell den Einsatz autologer Chondrozyten untersuchten. Das aus den BS der LWS gewonnene Gewebe aus dem AF und dem NP wurde nach Kultivierung 12 Wochen nach dem Ersteingriff in die Bewegungssegmente L3/L4 eingebracht. Nach Tötung der Tiere zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der zweiten Operation erfolgte die Analyse der transplantierten WS-Segmente mittels Röntgenübersichtsaufnahmen und MRT, um die BS-Höhe vergleichend zu den präoperativ dokumentierten Werten beurteilen zu können. Die transplantierten Gewebe wurden außerdem mikroskopisch untersucht. Es sollte weiterhin unterschieden werden, ob die autotransplantierten Chondrozyten in die BS inkorporiert worden und am Remodeling der BS beteiligt waren oder ob durch induziertes ortständiges Gewebe ein Repair stattgefunden hatte. Diese Analyse konnte durch die Markierung der kultivierten Chondrozyten mittels BrdU (Bromodeoxyuridine), einem Thymidinanalogon immunhistochemisch vorgenommen werden. Die Autoren konnten nachweisen, dass die transplantierten Chondrozyten vital in das BS-Gewebe inkorporiert waren und sich an der Kollagensynthese und der Synthese der EZM beteiligten. Dabei war eine positive Korrelation zwischen der Zeitspanne Transplantation - Tötung des Tiers und dem positiven Effekt auf die BS-Höhe zu verzeichnen.

Die auf Grundlage dieser Daten aufgelegte klinische multizentrische prospektiv randomisierte EuroDisc-Studie untersuchte an 112 Probanden mit einer BS-Protrusion bei milder BS-Degeneration die autologe Chondrozytentransplantation. Die Ergebnisse wurden durch Meisel et al. [146, 147] publiziert. Eingeschlossen wurden Patienten zwischen 18 und 60 Jahren mit einem BMI < 28, die sich einer Sequestrektomie wegen eines lumbalen BS-Vorfalles zu unterziehen hatten. Die eingeschlossenen Probanden wurden nach stattgehabter microchirurgischer Sequestrektomie inklusive Dekompression der entsprechenden Nervenwurzeln in zwei Gruppen randomisiert, wobei den Patienten der Transplantatgruppe 12 Wochen nach der Sequestrektomie die autologen Chondrozyten retransplantiert wurden. Beide Studienarme wurden 12, 24, 48 und 96 Wochen nach der Zweit-OP kontrolliert. Die Kontrolle umfasste neben der klinischen Untersuchung und der Auswertung entsprechender Erhebungsbögen zur Angabe der Lebensqualität auch MRT-Aufnahmen der LWS. Obwohl MRT-morphologisch kein signifikanter Unterschied der BS-Höhe zwischen beiden Gruppen nachgewiesen werden konnte, waren doch in der Transplantatgruppe eine statistisch signifikante Zunahme der Lebensqualität (entsprechende Scores) und eine Abnahme der RS zu evaluieren.

Sowohl bei den Patienten der Transplantatgruppe (41%) als auch den Probanden der Kontrollgruppe (25%) war nach 96 Wochen eine Zunahme des Flüssigkeitsgehaltes in den BS zu ermitteln, nachdem in beiden Gruppen nach der Erst-OP zunächst eine deutliche Reduktion des intradiscalen Flüssigkeitsgehaltes gesehen worden war. Hierbei war in der Transplantatgruppe auch in benachbarten Segmenten der ehemaligen Sequestrektomiehöhe eine Zunahme des intradiscalen Flüssigkeitsgehaltes zu sehen; die Untersucher werteten dies als Korrelat der verminderten Belastung des gesamten WS-Abschnittes ausgehend vom transplantierten Bewegungssegment. Die Arbeitsgruppe schlussfolgerte anhand der Studienergebnisse, dass die autologe Chondrozytentransplantation eine sichere, in der klinischen Versorgungssituation standardisiert anwendbare Methode zur Behandlung des RS bei Patienten mit lumbalen BS-Vorfällen darstellen kann.

Bereits seit mehreren Jahren forschen Arbeitsgruppen über die Anwendung molekularer Wachstumsfaktoren, um deren Effekte auf den Stoffwechsel von Chondrozyten zu untersuchen [135, 148]. Die Arbeitsgruppe um Nishida [148] konnte den positiven Effekt der Synthese von EZM und CD44 (Oberflächenantigen von Chondrozyten für Hyaluron) in bovinen Chondrozyten durch Injektion von Osteogenetic-1 Protein (OP-1; Synonym: bone morphogenetic protein-7 - BMP-7) nachweisen.

An et al. [119] untersuchten die Wirkung von Osteogenetic-1 Protein in vivo bei adulten Kaninchen und kamen zu ähnlichen Ergebnissen. Sie fanden, dass die BS-Höhe (als Indikator des Wasserbindungsvermögens) 8 Wochen nach der Injektion von Osteogenetic-1 Protein signifikant zugenommen hatte. Auch der PG-Gehalt und der Kollagenanteil hatten sich erhöht. Diese Zunahme war im Vergleich zur Kontrollgruppe allerdings nicht signifikant und nur nach den ersten 2 Wochen zu beobachten. Der DNA-Gehalt war nur in den ersten 4 Wochen nach Injektion in der mit Wachstumsfaktoren behandelten Gruppe erhöht. Die Autoren schlussfolgerten, dass in vitro am Tiermodell durch Osteogenetic-1 Protein eine (vorübergehende) Stimulation der Synthese im NP induziert werden konnte.

Der Einsatz von rekombinantem humanem OP-1 im Tierversuch offenbarte vergleichbare Ergebnisse, nachdem zuvor mittels Chondroitinase ABC die Nucleolyse vorgenommen worden war [149]. Über den Einsatz weiterer Wachstumsfaktoren in vitro haben weitere Arbeitsgruppen berichtet. Angewendet wurden u. a. GDF-5 (growth and differentiation factor-5), TGF- β (transforming growth factor-beta), IGF-1 (insulin-like growth factor-1), BMP-2 (bone morphogenetic protein-2) und BFGF (basic fibroblast growth factor).

Die Effekte auf die EZM-Expression und die Stimulation der Chondrozyten waren unterschiedlich, teilweise aber signifikant [150].

Wang et al. [151] publizierten kürzlich eine Studie, in der sie die Wirkung von BMP-7 auf Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) untersuchten. Sie konnten nachweisen, dass die Anwendung von BMP-7 die Denaturierung der EZM-Moleküle über die Antagonisierung TNF- α vermittelter Abbaueffekte positiv beeinflussen konnte. Außerdem scheint BMP-7 auch einen antikatabolen Effekt zu besitzen, indem es seinerseits die Wirkung von ADAMTS (s. Kapitel 1.5) hemmt. Auf der Suche nach alternativen Quellen der Zelltherapie haben mehrere Arbeitsgruppen die Anwendung von NP-Zellen untersucht [125, 126]. Die Arbeitsgruppe um Iwashina [126] transplantierte humane Zellen aus dem NP in geschädigte BS am Kaninchenmodell. Die Autoren fanden sowohl eine signifikante Zunahme der BS-Höhe in der Transplantatgruppe als auch eine immunhistochemisch nachweisbar verstärkte Synthese von Kollagen Typ II und Aggrecan. Die Abgrenzbarkeit des NP und die strukturelle Trennung zwischen AF und NP waren in der Transplantatgruppe schärfer als in der Kontrollgruppe. Eine Immunreaktion hatte nicht stattgefunden. Die Autoren schlussfolgerten, dass NP-Zellen eine mögliche Quelle der Zelltherapie darstellen könnten.

Nachteil aller zellbasierten Behandlungen kann die mechanische Alteration der BS während der Applikation der Zellregenerate sein. Durch die Schädigung des AF können Zellverluste auftreten. Außerdem könnten die Transplantate in vivo Bedingungen ausgesetzt sein, die ihre Vitalität negativ beeinflussen und letzten Endes dazu führen, dass die Kollagensynthese und die Synthese von Komponenten der EZM nicht aufgenommen werden [152]. Der ausbleibende positive Effekt auf den Wassergehalt der BS kann dazu führen, dass die Transplantate in der Initialphase nach der Transplantation durch mechanische Belastungen zu Grunde gehen [153]. Diese Überlegungen führten dazu, Trägermaterialien zu entwickeln, die als Matrix für die zu transplantierten Zellen fungieren sollten.

1.8.4 Tissue engineering, Trägermaterialien

Tissue engineering (TE) kann als Verfahren bezeichnet werden, bei dem in vitro oder in vivo biokompatible Zellträgermaterialien hergestellt werden, um Gewebedefekte (z. B. Knorpel, Knochen) aufzufüllen bzw. zu ersetzen [153, 154]. Das Verfahren wurde erstmals 1991 von Cima et al. [155] vorgestellt und basiert auf der in vitro-Fertigung eines biokompatiblen Implantates zum Remodeling von Gewebedefekten.

In einen Zellträger (Matrix) applizierte Zellen sollen unter Nutzung von Signalmolekülen (Gensequenzen, Wachstumsfaktoren) Gewebeverbände organisieren, die zerstörte Gewebe auffüllen bzw. in diese integriert werden. Entscheidender Vorteil dieser Implantate ist u. a. die Möglichkeit, sie minimalinvasiv applizieren zu können, so dass neben der verminderten Belastung der Empfänger das Infektionsrisiko durch die Limitierung der Regenerateinbringung minimiert wird. Beide Faktoren sollten zur klinischen Etablierung der Methode beitragen können. Nach ihrer chemischen Struktur können diese Träger in folgende Klassen gruppiert werden:

Tabelle 3: Trägermaterialien zur Anwendung bei Tissue engineering [153]

Polymerisierte Proteine	Kohlenstoffverbindungen	Synthetische Gewebe	Kombinationspräparate
Fibrin Kollagen Gelatine Polyzucker	Polyglyolic acid Polylactic acid Hyaluronan Agarose Alginate Chitosan	Dacron Teflon Carbonfasern Polyesterurethane Polyethylmethacrylat Polybutric acid Polyethylmethacrylate Hydroxyapatite	Crosslinkage Chemical modifikations Geometrical modifikations Matrix combinations

Die biochemischen und physikalischen Anforderungen an die Trägermaterialien bzw. Matrizen sind komplex und orientieren sich an den Eigenschaften der Gewebe, in welche sie eingesetzt werden sollen. So sollen die Matrizen porös und permeabel sein, damit einerseits die zu implantierenden Zellen aufgenommen werden können, andererseits das ortständige Gewebe in der Lage ist, in die Matrix zu immigrieren und diese zu integrieren. Die Oberfläche sollte - obwohl biochemisch inert - adhäsive Eigenschaften aufweisen, um die Integration in das umliegende Gewebe zu unterstützen. Diese Eigenschaft kann durch aufgebrachte Adhäsionsmoleküle verbessert werden [156]. Physikalische Eigenschaften wie Formstabilität und Elastizität sollen denen des Empfängergewebes ähneln. Dabei sollten die Trägermoleküle nicht gewebetoxisch sein, keine Immunreaktion auslösen und den Empfängerorganismus nicht systemisch schädigen (Nephro-, Hepatotoxizität). Weiterhin sollen die Träger unkompliziert zu applizieren sein [157].

Vielversprechende Träger könnten Hydrogele (HG) sein, wie sie bei der artikulären Knorpelregeneration zu Teilen eingesetzt werden. Die mechanischen Eigenschaften von HG lassen sich prinzipiell in einem weiteren Bereich einstellen [158].

HG sind Netzwerke polymerisierter synthetischer oder natürlicher Stoffe, die zwar in Wasser quellen aber nicht wasserlöslich sind [43].

Von besonderem Interesse sind dabei solche Hydrogele, die eine ausreichend hohe mechanische Festigkeit erreichen und eine thermische Aktivierbarkeit im physiologischen Bereich besitzen. Diese Kriterien können z. B. durch HG aus Chitosan-Derivaten erfüllt werden. HG haben als injizierbare Substanzen den Vorteil, dass sie minimal invasiv anzuwenden sind und damit allein schon die Applikation in die BS weniger traumatisierend ist als viele konventionelle chirurgische Techniken.

Die möglichst geringe Traumatisierung des AF ist Voraussetzung dafür, dass die HG im NP verbleiben. Es ist bekannt, dass selbst kleine Verletzungen des AF zur Abnahme des Widerstands gegen den Quelldruck im NP führen können. Der Austritt der eingebrachten Regenerate kann die Folge sein [159, 160]. Die Konsistenz der HG ist auf Grund ihres hohen Wasserbindungsvermögens der des NP ähnlich, so dass neben den physikalischen auch deren biomechanische Eigenschaften günstig erscheinen, und sie daher als attraktive Zellträgermedien in Frage kommen. Die positiven Effekte entfalten sie dabei zum einen durch die Unterstützung des intradiscalen Wassereinstroms und den damit verbundenen Nährstofftransport in das Zentrum der BS. Zum anderen sind auch biochemische Signalkaskaden an den Wassereinstrom gekoppelt und können als „carrier“ verstanden werden [12]. Die Anwendung der HG sollte technisch gut möglich sein, da sie um Zeitpunkt der Applikation flüssig sind und sich erst nach Injektion in die BS eine mehr gelartige Konsistenz entwickelt [161].

Neben den biomechanischen Eigenschaften der Transplantate spielen mechanische Aspekte nach deren Einbringung in die BS eine große Rolle. Am Tiermodell konnten Protrusionen eingebrachter Kollagengeltransplantate beobachtet werden [162]. Voraussetzung für die klinische Anwendbarkeit der Transplantate ist also neben deren Beanspruchbarkeit auch die suffiziente in situ-Redression.

1.8.4.1 Kollagen

Als physiologische Bestandteile der BS-Matrix versprechen die kollagenbasierten Zellträger eine hohe Biokompatibilität. Das trifft auch auf die Abbauprodukte der Kollagenmatrix zu. Kollagen stellt etwa 25% der Gesamtmenge des humanen Proteingewebes dar.

Die Stabilität der Triplehelix, die die Kollagenarchitektur repräsentiert (Abbildung 7), wird durch einen hohen Gehalt an den Aminosäuren Glycin, Prolin und Hydroxyprolin erklärt [43].

Kollagengele, -netze oder -schwämme sind im Tierversuch erfolgreich als Trägermedien für allogene Chondrozyten oder MSC eingesetzt worden, während sie als zellfreie Transplantate

nicht zur Anwendung gelangen [162]. Gele bieten den Vorteil einer homogenen Zellverteilung innerhalb der Trägermatrix, während dies in Vliesen, Membranen oder Netzen nicht möglich ist. In vitro wurde mit Hilfe vernetzter Kollagen Typ I-Gele unter definierten biomechanischen Bedingungen (zyklische Belastung) die Möglichkeit untersucht, BS-Gewebe zu kultivieren. Anhand der Expression von Kollagen Typ II, Aggrecan und verschiedenen MMP wurde demonstriert, dass die Kollagengele ein geeignetes Medium zur Proliferation von BS-Zellen darstellen [163]. Mehrere Arbeitsgruppen haben die positiven Effekte der Kollagengelinjektion in die BS beschrieben. So untersuchten Halloran et al. [164] am bovinen NP den Effekt der Injektion von nicht vernetztem und von enzymatisch vernetztem Kollagen Typ II auf die Expression von Aggrecan und Hyaluron durch die NP-Zellen.

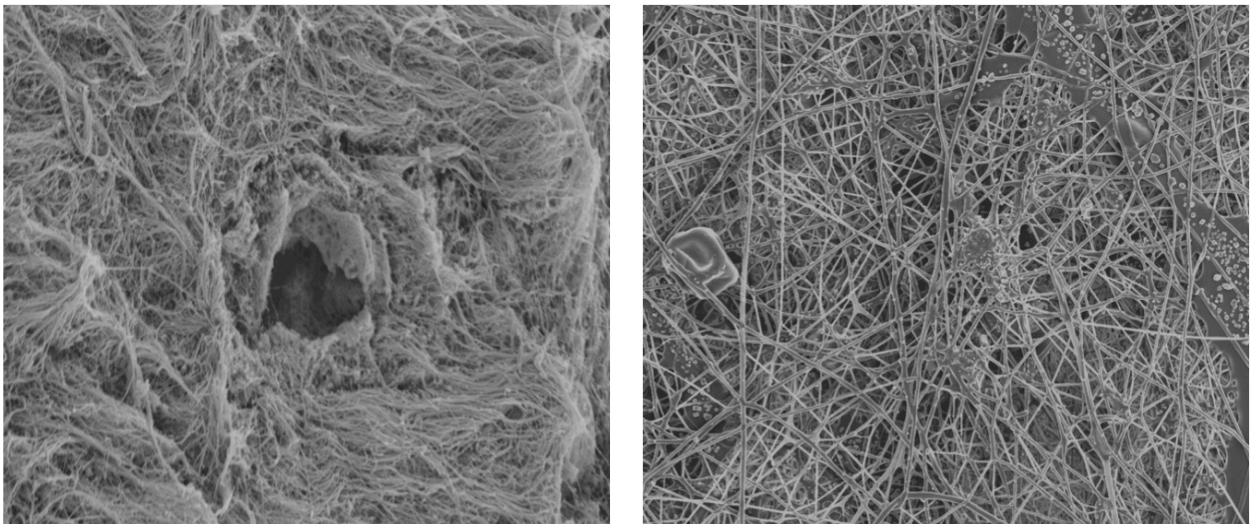


Abbildung 7: A - Kollagenmatrix aus humanem NP-Gewebe, B - gesponnene Kollagenmatrix

1.8.4.2 Gelatine

Gelatine wird durch chemisch-thermische Verarbeitung vornehmlich aus Kollagen Typ I (Knochen, Haut) unter Auflösung der Triplehelix-Struktur gewonnen. Gelatine ist wie andere Proteine aus linear verknüpften einzelnen Aminosäuren aufgebaut, wobei die Carboxygruppe einer Aminosäure mit der α -Aminogruppe der benachbarten Aminosäure eine intermolekulare Peptidbindung eingeht [165]. Ähnlich wie Kollagen ist Gelatine als mögliche Matrix für Chondrozyten und SC untersucht worden.

Hierbei waren im Tierversuch Gelatineschwämme als Matrix für Stammzellen in Form von in Knorpeldefekten eingebrachten Zylindern ohne immunologische Reaktionen anwendbar [166].

1.8.4.3 Chitosan

Chitin als Ausgangsstoff der Chitosangewinnung ist ein stickstoffhaltiges Polysaccharid und kommt als Bestandteil des Exoskeletts von Gliederfüßern sehr häufig in der Natur vor [43]. Chitosan ist das Deacetylierungsprodukt des Chitins. Durch entsprechende Behandlung steht Chitosan in unterschiedlichen Werkstoffformen zur Verfügung. Chitosan-Derivate gelten aufgrund ihrer nachgewiesenen beschleunigenden Wundheilung und der positiven Wirkung auf die Zellproliferation und Zelldifferenzierung als eines der derzeit attraktivsten Scaffold-Materialien in der regenerativen Medizin. Chitosan bietet weiterhin auf Grund seiner Biokompatibilität, der guten Verarbeitungsmöglichkeiten unter physiologischen Bedingungen und der Abbaubarkeit im Körper viele Anwendungsfelder als Implantatmaterial. Die strukturelle Ähnlichkeit des Chitosans mit den Glycosaminoglycanen der EZM, vor allem der Hyaluronsäure, macht Chitosan zu einem erfolgversprechenden Zellträgermaterial für die Geweberegeneration des NP [167].

2. Material und Methoden

2.1 Tiermodell Schaf

2.1.1 Vorversuch

Ziel unserer Arbeit war es, ein minimalinvasives Schädigungsmodell an der LWS des Schafes zu entwickeln, um eine definierte Schädigung der BS umsetzen zu können. Grundlegende Überlegung war hierbei, auf aufwändige Freilegungen der LWS zu verzichten. Zu diesem Zweck wurde über einen minimalinvasiven dorsolateralen Zugang eine partielle Nucleotomie vorgenommen.

Entgegen anderer Spezies (z. B. Katze, Nerz, Nager, non-chondrodystrophe Hunde) zeichnen sich Schafe dadurch aus, dass während ihrer skelettalen Reifung die Notochordalzellen im NP gegen chondrozytenähnliche Zellen ausgetauscht werden, also die Fähigkeit zur Spontanreparatur degenerativer BS-Schäden nicht mehr vorhanden ist [36]. Ähnliches gilt zwar auch für den chondrodystrophen Hund.

Auf Grund seiner besonderen sozialen Bedeutung in unserer Gesellschaft haben wir den Hund aus ethischen Gründen - obwohl biometrisch durchaus als Versuchstier geeignet - für unsere Studie nicht in Betracht gezogen. Die Schafe der Studie sollten über gesunde Wirbel und BS verfügen. Bei älteren Tieren hätte die Möglichkeit bestanden, dass sowohl Wirbel als auch BS durch Verletzungen bzw. bereits vorhandene degenerative Veränderungen vorgeschädigt waren.

Somit fiel die Wahl auf 2jährige, bereits skelettal ausgereifte Tiere. Beim kleinen Wiederkäuer - speziell beim Schaf - ist die Ausreifung des Skeletts nachweislich mit dem zweiten vollendeten Lebensjahr abgeschlossen (entspricht dem Schluss der Epiphysenfugen). Zu diesem Zeitpunkt konnte auch davon ausgegangen werden, dass die Notochorsalzellen im NP nicht mehr vorhanden waren. Unter Berücksichtigung aller genannten Punkte lag das geeignete Alter für unsere Versuchstiere zwischen 2 und 4 Jahren.

Um das hier beschriebene Vorgehen zu etablieren, wurde im Vorfeld der Studie einem Schafkadaver die WS entnommen und vom umgebenden Weichgewebe befreit. Auf diese Weise konnte die Anatomie des Bewegungssegmentes besonders die Lage des NP beurteilt werden. Im Schnittbild fällt die dezentrale Lage des NP innerhalb der BS auf, da die Anuluslamellen ventral kräftiger als dorsal sind (Abbildung 8 E₁ und E₂)

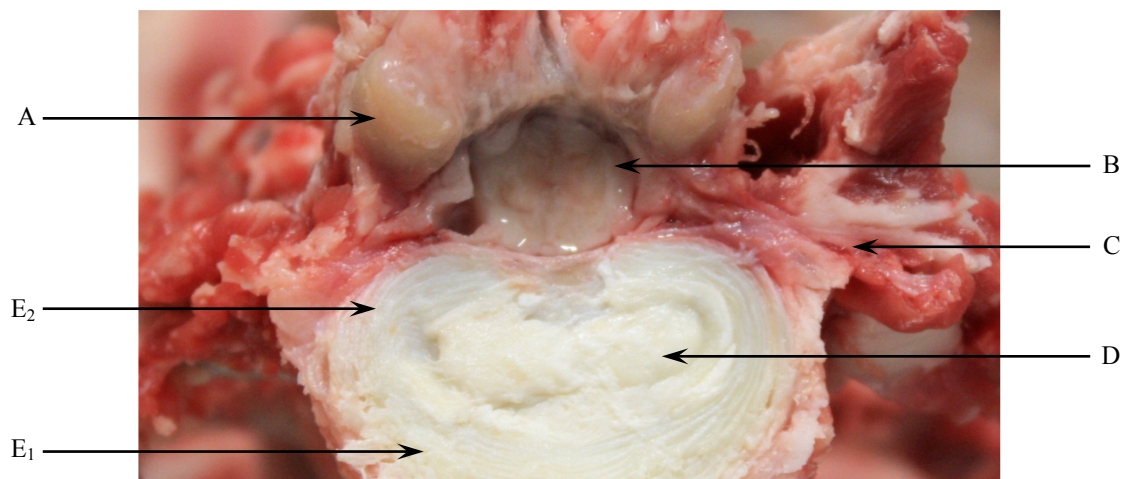


Abbildung 8: Frontalschnitt durch ein Bewegungssegment. A - Facettengelenk, B - Rückenmark, C - Processus transversus, D - Nucleus pulposus, E - Anulus fibrosus (E₁ - ventral, E₂ - dorsal)

Zum Erlernen der Punktion der BS wurden Probepunktionen trainiert, wobei auf die Einhaltung des Winkels zum Processus transversus zu achten war, um das unmittelbar dorsal des hinteren AF liegende Rückenmark nicht zu schädigen (Abbildung 8).

Es wurde deutlich, dass ein zu flacher Einstichwinkel zur Sagittalebene auf Grund der anatomischen Beziehung zum Wirbelkanal ein potentielles Verletzungsrisiko für das Rückenmark darstellte. Ein flacherer Einstichwinkel hätte dazu führen können, dass die Punktionsnadel unter dem Processus transversus in das Rückenmark gestochen werden konnte. Einblutungen und konsekutive neurologische Defizite bis hin zur Querschnittssymptomatik hätten die Folgen sein können.

Nach positivem Veto der Ethikkommission (Vorhabenummer TVV 30/11, Anlage 1) und der Tierschutzbeauftragten der Medizinischen Fakultät der Universität Leipzig wurde im Vorversuch die Schädigung auf diese Weise an 6 Tieren trainiert. Alle Versuchstiere wurden über die rechte Flanke geschädigt. Die Wirbelsäulensegmente BWK 12 bis SWK 1 konnten über diese Zugänge problemlos erreicht werden. Für die ersten Punktionsversuche wurden Hohladeln der Firma Pajunk (Sprotte® 21G x 120 mm) gewählt, wie sie auch zur Lumbalpunktion genutzt werden (Abbildung 9). Es stellte sich aber heraus, dass der generierte Defekt im AF und der Substanzdefekt im NP durch die Hohladelnpunktion nicht adäquat waren, so dass wir stattdessen die BS-Schädigung mit einer Faszange der Firma Fehling Modell NKR-1 vornahmen. Auch bei Nutzung dieses Instrumentes konnten aufwändige Freilegungen der WS und damit verbundene länger dauernde Wundverschlüsse entfallen.

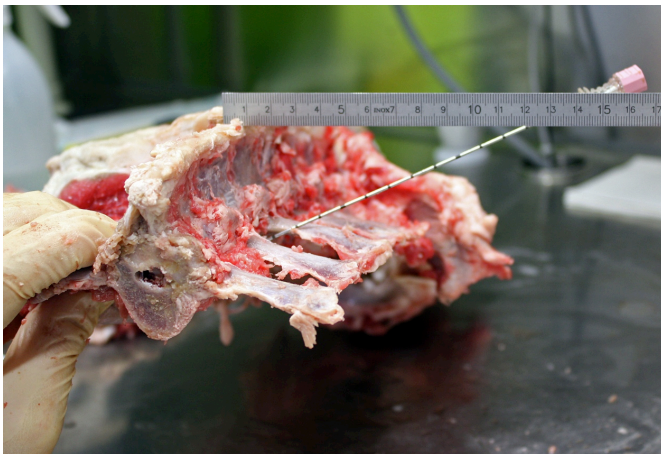


Abbildung 9: Punktionsschritt (am ex vivo-Präparat). Der Einstichpunkt liegt 12 cm von der Dornfortsatzreihe entfernt. Lage der Punktionskanüle zum Processus transversus.

Die Bestimmung der Einstichstellen der Ahle zur Eröffnung des AF und Bereitung des Korridors für die Faszange wurde mittels Kirschnerdraht unter BV-Kontrolle im dorsoventralen Strahlengang durchgeführt. Die Identifizierung der anatomischen Landmarken (Rippenbogen, Dornfortsätze, Processus transversi, Beckenschaufel) war palpatorisch beim zuvor geschorenen Versuchstier problemlos möglich und wurde auf der Haut des Schafes farbstiftmarkiert.

Der weitere instrumentelle Aufwand war gering. Auf den Einsatz umfangreicherer OP-Instrumentation (selbsthaltende Wundsperrer, Hohmannhaken, monopolare Diathermie) konnte verzichtet werden. Die Blutstillung wurde - sofern überhaupt nötig - durch kurzzeitige manuelle Kompression der Hautinzisionen durchgeführt.

2.1.2 Hauptversuch

Für unseren Hauptversuch wurden 18 2jährige weibliche Merinofleischschafe mit einem durchschnittlichen KG zum Zeitpunkt der Schädigung von 65,48 kg (52-84 kg) verwandt.

Vor dem Ersteingriff wurde in einem allgemeinen Untersuchungsgang die Narkose- bzw. Operationsfähigkeit der Tiere beurteilt. Weiterhin wurde das Skelett auf mögliche orthopädische Leiden untersucht.

Das Studiendesign sah vor, in einer ersten Operation (BS-Schädigung, Abbildung 10) eine lumbale BS pro Tier zu schädigen. Dabei erfolgte die Wahl des BS-Faches zufällig, um eine Randomisierung zwischen den einzelnen Tieren gewährleisten zu können. Eine weitere BS wurde als native Kontrolle ebenfalls randomisiert ausgewählt. Die Bewegungssegmente zwischen den beiden ausgewählten wurden nicht genutzt, da in diesen Segmenten die WS später geteilt werden sollte, um die randomisiert gewählten Segmente bearbeiten zu können.

Die Versuchstiere wurden in 2 Gruppen je 9 Tiere unterteilt, die sich dabei ausschließlich in Bezug auf die postoperative Standzeit nach der zweiten von 2 Operationen (6 Monate und 12 Monate) unterschieden. Die Schädigung der BS erfolgte bei allen Tieren auf identische Art und Weise. Während der Standzeit wurden die Tiere in die Herde des Lehr- und Versuchsgut Oberholz der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig integriert. So wurde den Schafen während der langen Versuchsdauer eine artgerechte Haltung ermöglicht. Außerdem konnte neben der artgerechten Führung (inklusive Auslauf und Weidegang) die regelmäßige tiermedizinische Kontrolle vorgenommen werden. Direkt vor und nach den Interventionen wurden die Schafe in der Chirurgischen Tierklinik der Universität Leipzig betreut.

Sechs Wochen nach der initialen Schädigungsoperation wurden die Tiere einem zweiten Eingriff unterzogen, indem von der Gegenseite der NP-Schädigung eine Discographie vorgenommen wurde. Hier wurde geprüft, ob der AF nach der partiellen Nucleotomie druckfest vernarbt war. Während des Versuchs wurden die Tiere routinemäßig tierärztlich untersucht, um mögliche perioperative Komplikationen frühzeitig erkennen und behandeln zu können.

Nach Ablauf der vorgesehenen Standzeit (6 bzw. 12 Monate) wurden die Tiere in Allgemeinanästhesie schmerzlos euthanasiert. Hiernach wurde den Kadavern die LWS entfernt, vom umliegenden Weichgewebe befreit und entsprechend präpariert, um die Bewegungssegmente makroskopisch und mittels Micro-CT untersuchen zu können.

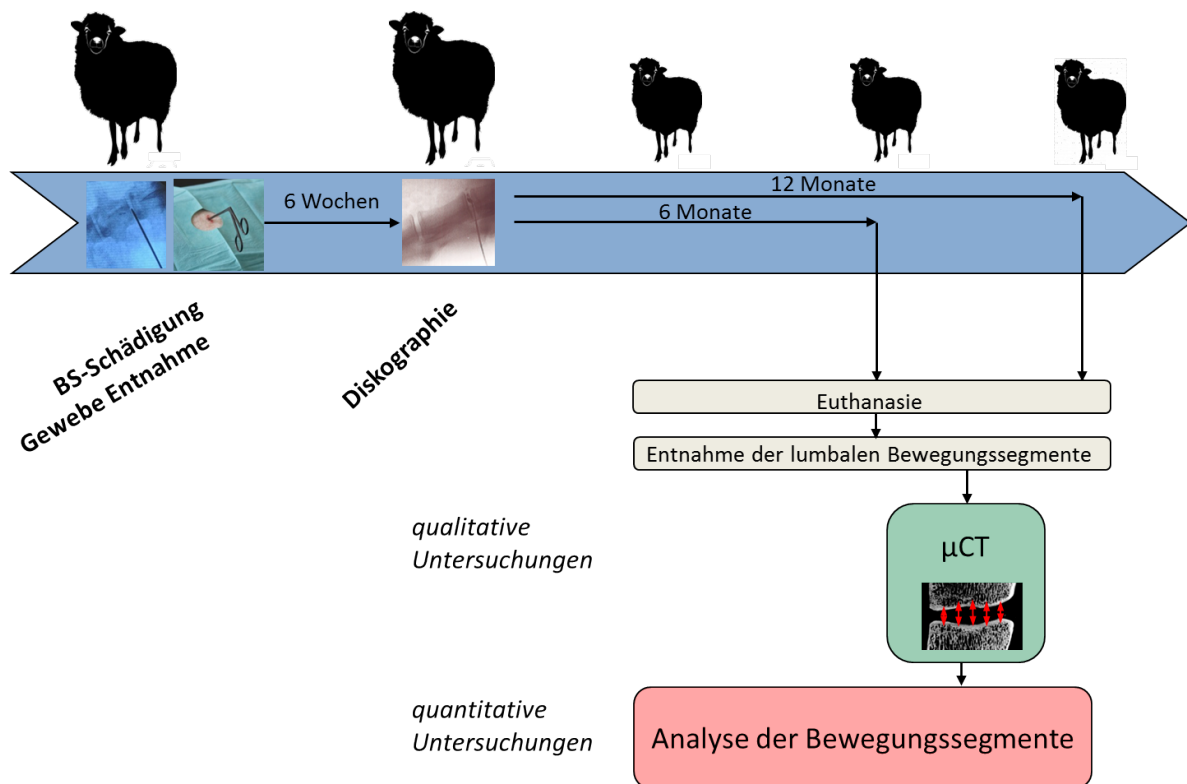


Abbildung 10: Versuchsdesign Hauptversuch

2.1.3 Medikamente und Pharmaka

2.1.3.1 Prämedikation, Narkoseeinleitung

Folgende Pharmaka zur Prämedikation bzw. Narkoseeinleitung und Aufrechterhaltung der Narkose wurden angewandt [aus 168]:

Butorphanol (Torbugesic):	0,1-0,2 mg/kg KG i.m.
Flunixin:	2 mg/kg i.v.
Diazepam:	0,2–0,5mg/kg i.v.
Atropin:	0,02mg/kg i.v.
Ketamin:	3mg/kg i.v.

2.1.3.2 Inhalationsnarkose

Die Einleitung der Narkose wurde in Brust- oder Seitenlage (oder im Sitzen) des Tieres durchgeführt. Eine Person umfasste und stabilisierte das Tier von hinten. Eine zweite Person injizierte die Medikamente und nahm die Intubation vor. Die Tubusplatzierung wurde mit Hilfe eines Laryngoskops mit einem langen geraden Spatel vorgenommen.

Nach den Empfehlungen von Hiepe [168] wurden Tuben der Größen 10-12 je nach individueller Konstitution des Tieres (Körpergewicht) verwandt. Die Aufrechterhaltung der Narkose wurde mit Isofluran im Dosisbereich 0,8 – 1,2 % vorgenommen. In einem halbgeschlossenen System galten folgende Parameter:

Beatmungsfrequenz: 16-19 Atemzüge/min

Atemzugvolumen: 15 ml/kg KG

Beatmungsdruck insp.: 18 cm H₂O

Beatmungsdruck exp.: 5 cm H₂O

Kleinere Wiederkäuer neigen im Allgemeinen zur Hypoventilation, daher wurde die mechanische Ventilation mit einem Tidalvolumen von 3-5 ml/kg Körpergewicht umgesetzt.

2.1.3.3 Postoperative Analgesie

Schafe demonstrieren als Fluchttiere nur sehr eingeschränkt fassbare Schmerzäußerungen, so dass sie fälschlicherweise oft als schmerzunempfindlich angesehen werden.

Daher wurde auf eine adäquate medikamentöse Schmerztherapie geachtet. Folgende Schmerzmittel wurden hierzu angewandt:

Butorphanol (Torbugesic): 0,1-0,2 mg/kg i.m.

Flunixin: 2 mg/kg i.m.

2.1.3.4 Euthanasie

Die schmerzlose Tötung der Tiere erfolgte in Allgemeinnarkose (Sedation i.v. mittels 0,1mg/kg Butorphanol und 0,2mg/kg Midazolam, Narkoseeinleitung i.v. mittels 4mg/kg Propofol) durch die intravenöse Verabreichung von 90mg/kg Pentobarbital. Pentobarbital gehört zur Wirkstoffgruppe der Barbiturate und bewirkt bei einer Dosierung ab 80 mg/kg (Gebrauchsinformation Narkoderm[®]) eine tödliche Kreislauf- und Atemdepression. Der Herzstillstand wurde durch kardiale Auskultation der Tiere mittels Stethoskop und das entsprechende anästhesiologische Monitoring bestätigt.

2.1.4 Geräte und Instrumente

- Narkoseturm: Firma Dräger Sulla 808
- Bildwandler (BV): Firma Philips BV 300 C-Bogen mit hochauflösendem Doppelmonitor auf Fahrwagen
- Ahle: Firma Aesculap FG 268 R-4000 K (Abbildung 11)
- Faszange: Firma Fehling NKR-1, 1,5 mm, 12 cm Länge (Abbildung 12)
- sterile Verbrauchsmaterialien Firma Lohmann-Rauscher, Hartmann

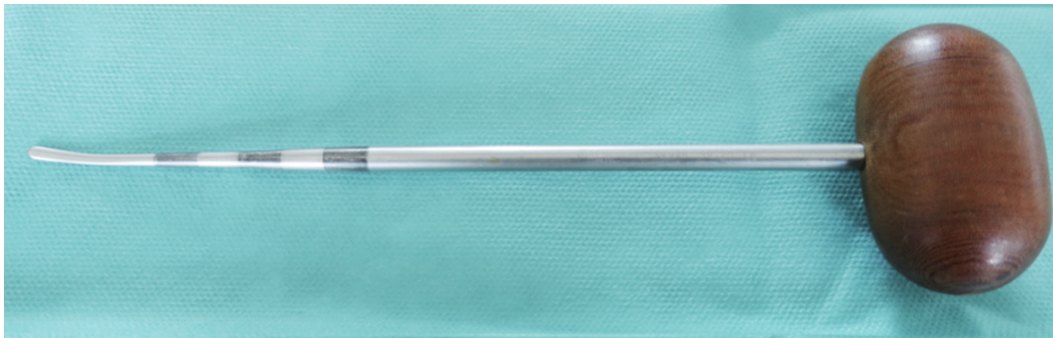


Abbildung 11: Ahle Aesculap FG 268 R-4000 K zur Eröffnung des Punktionskorridors



Abbildung 12: Faszange Fehling NKR-1, 1,5 mm x 120 mm

2.1.5 Praktische Durchführung

2.1.5.1 Operationsvorbereitung

Alle Eingriffe wurden in Allgemeinanästhesie durchgeführt. Um präoperative Nüchternheit zu erzielen, wurden die Tiere 12 Stunden vor der geplanten OP mit einem Maulkorb versorgt. Das zu operierende Tier wurde von den anderen der Versuchsgruppe isoliert und in einer präanästhesiologischen Untersuchung auf Narkosefähigkeit hin geprüft (Auffälligkeiten im Allgemeinverhalten, Puls, Atmung, innere Körpertemperatur, kardiopulmonale Auskultation, kapilläre Rückfüllungszeit, Körpergewicht, Schleimhautfarbe).

Nach Schür der linken Halsseite erfolgte die Einlage einer Braunüle in die linke Vena jugularis externa. In Abhängigkeit des Körpergewichtes wurden zur Prämedikation ein Antibiotikum intramuskulär (Veracin compositum - Penicillin/Streptomycin), Atropinum sulfuricum - Atropin und ein Analgetikum (Flunixin/Meglumine) intravenös appliziert. Weiterhin wurden Butorphanol, Midazolam und Flunixin intravenös appliziert. Nach kurzer Wartezeit wurde dann zur Narkoseeinleitung Urostamin (Ketamin) i.v. gegeben.

Nachdem eine gute Analgosedierung eingetreten war, wurde das Versuchstier noch in der Stallung intubiert (Tubusdurchmesser 10 bis 12 mm) und mittels Transportwagen in den OP verbracht. Das Tier wurde auf dem OP-Tisch in Bauchlage platziert. Die Bauchlage wurde mittels einer Vakuummatratze unterstützt, wobei während der Schädigungsoperation die rechte Flanke leicht exponiert wurde. Mit Hilfe eines Laryngoskops und Führungsdrahtes wurde eine Schlundsonde platziert, außerdem ein Qxymeter an der Lefze. Die Anästhesie wurde mit Isofluran (0,8 - 1,2%) aufrechterhalten. Während des Eingriffes erfolgte die Volumensubstitution mit Ringerlactat-Lösung. Die Schädigung der BS wurde von der rechten Seite des Tieres vorgenommen. Alle BS von BWK 12 bis SWK 1 waren in dieser Lage zugänglich. Zur Operationsvorbereitung wurden großzügig die rechte Flanke vom Ende des Rippenbogens bis zum Beckenkamm geschoren (Abbildung 13).



Abbildung 13: Versuchstier in Bauchlage auf Vakuummatratze

Das geschorene OP-Gebiet wurde mit Jodseife und Jod-Alkohol desinfiziert und nach entsprechender Einwirkzeit des Hautdesinfiziens mit sterilen selbstklebenden OP-Tüchern abgedeckt. Die beim Schaf gut tastbaren Processus spinosi, Processus transversi, der Rippenbogen und der Beckenkamm dienten als Landmarken zum Festlegen der Zugangspunkte zu den BS-Fächern (siehe Abbildung 14).

Der gesamte Eingriff wurde unter sterilen Kautelen durchgeführt (Mundschutz, Kopfschutz, sterile OP-Kittel, OP-Handschuhe, OP-Besteck, chirurgische Händedesinfektion). Das OP-Besteck umfasste ein Skalpell, eine Präparationsschere, eine Ahle (Abbildung 11) und eine Faszange der Firma Fehling (Abbildung 12). Die Hautinzisionen wurden später durch Klammernähte verschlossen.

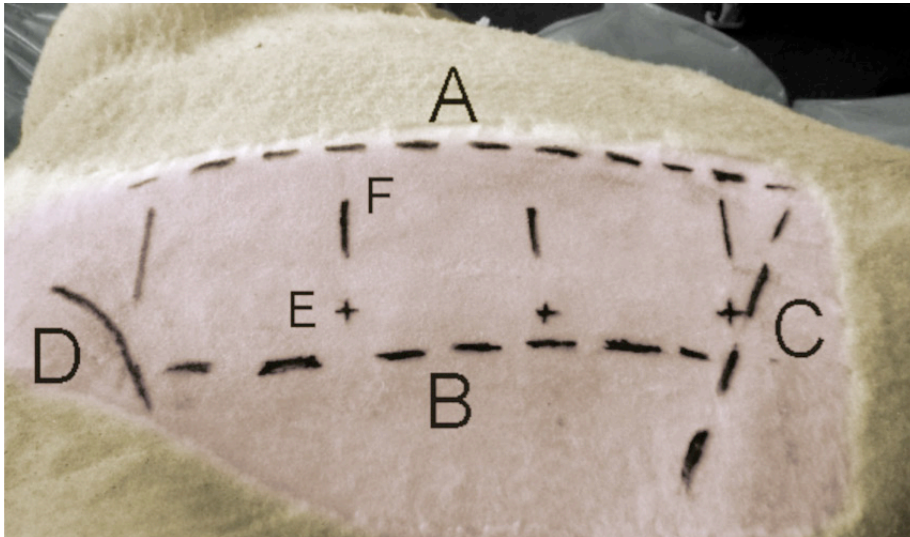


Abbildung 14: Die Orientierungspunkte sind mittels Farbstift markiert. A - Processus spinosi, B - laterale Querfortsatzlinie, C - Rippenbogen, D - Darmbeinschaukel, E - Einstichstelle zur Schädigung der BS, F - Markierung der Bewegungssegmente.

2.1.5.2 Schädigungsoperation

Unter BV-Kontrolle wurden die BS im seitlichen Strahlengang aufgesucht und die Punktionsstellen (Abbildung 14E) über eine 0,5 cm lange Miniinzision (Abbildung 15) 1 cm lateral der palpablen Querfortsatzlinie (Abbildung 14B) eröffnet.

Unter kontinuierlicher BV-Kontrolle im lateralen und dorsoventralen Strahlengang wurde mit Hilfe der Ahle der muskulokutane Korridor für die Faszange (Abbildung 16) ermittelt. Die Ahle wurde dabei bis in den AF vorgeführt (Abbildung 17A, B), so dass der exakte Eintrittspunkt der Faszange in die BS festgelegt werden konnte.



Abbildung 15: Miniinzisionen zur Punktion der Bandscheibe

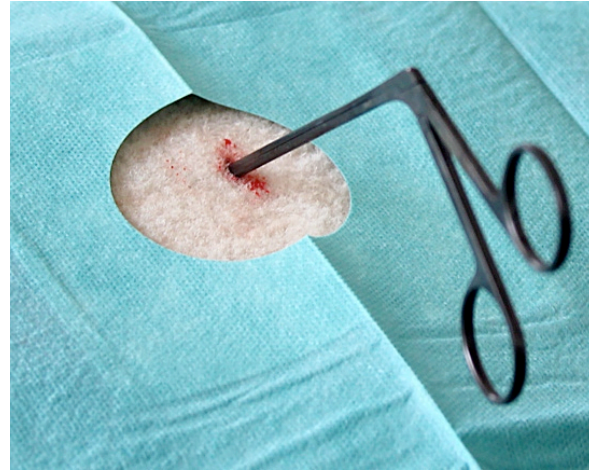


Abbildung 16: Fasszange in das Bewegungssegment vorgeführt

Unter Beibehaltung dieses Punktionskorridors (Abbildung 17A) wurde die Fasszange bis in den NP vorgeführt (Abbildung 17C, D). Nach Bildwandler-Kontrolle in 2 Ebenen wurde durch Schließen und Retraktion der Zange die mechanische Destruktion des NP vorgenommen und damit die Degeneration der BS induziert.

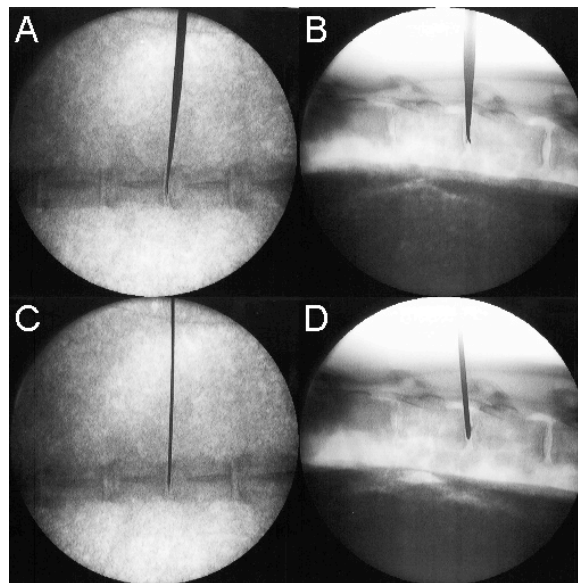


Abbildung 17: Punktionskorridor zum Bewegungssegment. Einführen der Ahle (A, B), Gewebeentnahme aus dem NP (C, D). BV-Aufnahmen, frontaler (A, C) und lateraler Strahlengang (B, D).

Die Zugangsstelle wurde desinfiziert und mittels Klammernaht verschlossen. Abschließend wurden die geklammerten Hautwunden mit Jod-Spray behandelt und mit flüssigem Klebevlies versiegelt.

Das Versuchstier erhielt noch auf dem OP-Tisch eine Torbugesic (Butorphanol)-Injektion i. m. Nach Beendigung der Isoflurananästhesie wurde die Nasenschlundsonde entfernt. Das Schaf wurde mit entblockter Manschette extubiert, sobald ein Schluckreflex zu beobachten war. Nach der Extubation wurde der Venenkatheter entfernt. Das Tier wurde dann nach Transport in die Stallung zunächst in einer getrennten Box zum Aufwachen in Bauchlage abgelegt. Vier Stunden postoperativ wurde dann nochmals eine Injektion Torbugesic (Butorphanol) i. m. wiederholt.

Während der ersten Tage nach der Operation verblieb das Tier zur intensiven Beobachtung und Betreuung in den Stallungen der Universitätstierklinik Leipzig. Die postoperative Medikation bestand in den nächsten Tagen aus Flunisolone (Flunixin-meglumin) zur Analgesie und dem Antibiotikum Veracyn compositum (Benzylpenicillin). Am 10. postoperativen Tag wurden die Hautklammern entfernt. Während der postoperativen Standzeit in der Tierklinik wurden die Versuchstiere täglich durch tiermedizinische Fachangestellte betreut und auf eventuell vorhandene pathologische Symptome untersucht.

Die routinemäßig durchgeführten tierärztlichen und pflegerischen Beurteilungen des Gesundheitszustandes des Tieres hätten Anlass zum Abbruch der Untersuchung und Ausschluss des Tieres aus dem Versuch sein können. Bei unerwarteten Symptomen der Unverträglichkeit gegenüber Medikamenten oder Operationsmaßnahmen (anhaltendes Fieber, Abmagerung, hochgradige Lahmheit ohne Besserung unter Therapie, anhaltendes Nicht-Aufstehen) und bei schwer therapierbarer Krankheit unabhängig vom Versuch sollte das Tier vorzeitig aus der Studie genommen werden. Gleiches sollte für nicht therapierbare Narkosezwischenfälle (z. B. plötzlicher Herzstillstand, im Anschluss an die Narkose ausbleibende Atmung, sofern diese nicht medikamentös beeinflusst werden konnte) gelten.

Folgende Abbruchkriterien wurden festgelegt:

- unvorhersehbare, nicht therapierbare Narkosezwischenfälle, z. B. plötzlicher Herzstillstand, ausbleibende Atmung nach Beendigung der Narkose
- hochgradige Wundinfektionen, Septikämie
- hochgradige Umfangsvermehrung des Operationsgebietes, Störung der Wärmeregulation
- Unvermögen aufzustehen, reduziertes Allgemeinbefinden, verminderte Futteraufnahme
- Diagnosestellung durch Untersuchung der Wunden (ggf. Ultraschall, Punktion der Wunden, Laborkontrollen)
- Auftreten von nervalen Ausfallserscheinungen an den hinteren Gliedmaßen

- Lahmheit 4. oder 5. Grades (Skala von 0 bis 5; 5 entspricht dem Nichtgebrauch der Gliedmaße)
- Auftreten sonstiger therapieresistenter unvorhersehbare Erkrankungen, die nicht mit dem Eingriff in Verbindung stehen und ein Leiden der Tiere nach sich ziehen, durch folgende der aufgeführten klinischen Symptome:
 - hochgradige Abmagerung
 - vermehrtes Liegen
 - hochgradig reduziertes Allgemeinbefinden
 - hochgradig veränderte Herz-Kreislaufparameter
- langanhaltender Durchfall, Exsikkose

Die Einhaltung des Schädigungsprotokoll wurde für jedes Tier ärztlich überwacht. Eine häufige narkosetypische bzw. perioperative Komplikation beim Schaf ist das Regurgitieren. Daher wurden die Tiere vor der Anästhesie 12–24 Stunden nüchtern gelassen, bei freiem Zugang zu Wasser (Nüchternheit führt zu einer milden Pansenalkalose). Dieses Vorgehen wird durch andere Arbeitsgruppen bestätigt [169].

Weiterhin wurde beim Ablegen der narkotisierten Tiere auf eine leichte Rechtsseitenlage geachtet, da völlige Nüchternheit beim Wiederkäuer nicht erreicht werden kann. In dieser Position konnte der externe Druck auf den Pansen minimiert werden. Außerdem erlaubte die angehobene Flanke eine bessere Exposition der Wirbelsäulensegmente. Das Wenden der Tiere fand nur über die ventrale Körperseite statt. Die Versuchstiere wurden zum Schutz vor Regurgitation bzw. vor Aspiration mit der Gefahr der nachfolgenden Aspirationspneumonie stets endotracheal intubiert und mit einer Nasenschlundsonde versorgt, um auch auf diese Weise die Pansenblähung zu reduzieren. Während der Narkose wurde auf den Einsatz von Lachgas verzichtet. Lachgas ist nur bei sehr hohen Durchflussraten empfohlen, da es die Pansenaufblähung verstärkt [168].

Neben der Bedienung des BV durch eine Hilfsperson war der Eingriff durch eine Person umzusetzen. Präoperativ wurde neben der körperlich-klinischen Untersuchung der Versuchstiere keine radiologische Diagnostik betrieben, um zum Zeitpunkt des Ersteingriffes zu dokumentieren, dass die in die Studie eingeschlossenen Tiere keine vorbestehenden BS-Degeneration bzw. knöchernen Veränderungen der WS aufwiesen. In der gesichteten Literatur wird zum Teil bereits präoperativ anhand von CT-Untersuchungen der Zustand der WS dokumentiert [170].

2.1.5.3 Discographie

6 Wochen nach der Schädigungsoperation wurde bei allen Tieren eine Discographie der geschädigten BS vorgenommen um nachzuweisen, dass sich der Zugangsdefekt im AF verschlossen hatte. Die DG wurde von der linken Seite des Tieres vorgenommen, also von der Gegenseite der BS-Schädigung. Hierzu wurde über Hohnadeln der Firma Pajunk (Sprotte® 21G x 120 mm) ca. 1ml Kontrastmittel in die BS injiziert. Die Dokumentation erfolgte wieder mittels Bildwandler-Aufnahmen in 2 Ebenen (Abbildung 18).

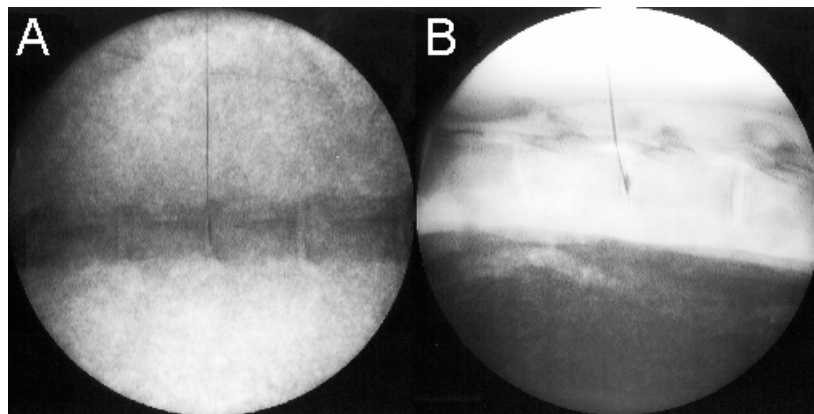


Abbildung 18: Discographie, fontaler (A), lateraler (B) Strahlengang

2.1.5.4 Entnahme der Bewegungssegmente post mortem

Nach Euthanasie der Tiere wurde den Tierkadavern die LWS entnommen und vom umgebenden Weichgewebe befreit. Die Bewegungssegmente wurden gewonnen, indem die begrenzenden WK deck- und grundplattenparallel etwa mittig mittels Säge durchtrennt wurden. Somit erhielten wir die Bewegungssegmente mit den dazugehörigen kranialen und kaudalen KE. Weiterhin wurden sowohl die Dorn- als auch Querfortsätze und das RM entfernt. Vor der weiteren Präparation wurden die Bewegungssegmente tiefgefroren.

2.2 Bildgebung

Nach Entnahme der LWS wurden die noch kompletten Bewegungssegmente im tiefgefrorenen Zustand mittels Micro-CT untersucht, um hochauflösend die BS-Struktur und die KE beurteilen zu können (Phoenix nanomex 180NF, Germany, USA). Diese Aufnahmen bilden den Primärdatensatz.

11 Einzelscans (400 ms Scandauer, 100 kV, 100 μ A) wurden akquiriert und mittels Software dreidimensional dargestellt. So konnte eine Auflösung von 25 Micrometern erreicht werden, um die lamelläre Struktur der BS wiederzugeben (Abbildung 19).

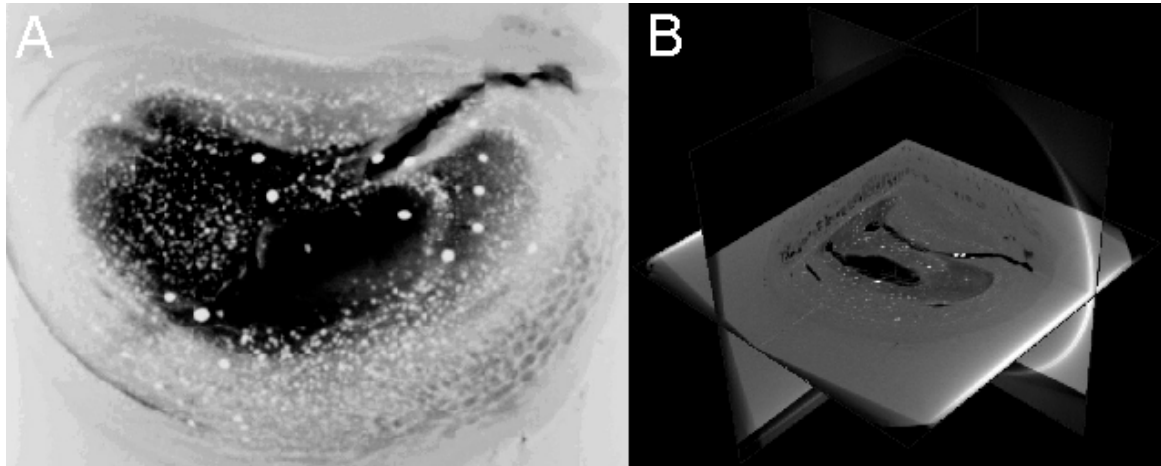


Abbildung 19: Micro-CT der Bandscheibe, A - Darstellung des Schädigungskanals, B - Darstellung der Betrachtungsebenen

2.2.1 Bestimmung der Bandscheiben-Höhen

Die Bewegungssegmente wurden in der Micro-CT bezüglich der BS-Höhe im sagittalen und coronaren Strahlengang beurteilt. Die sagittale Schnittführung erlaubte die Bestimmung der ventralen und dorsalen BS-Höhe (Abbildung 20).

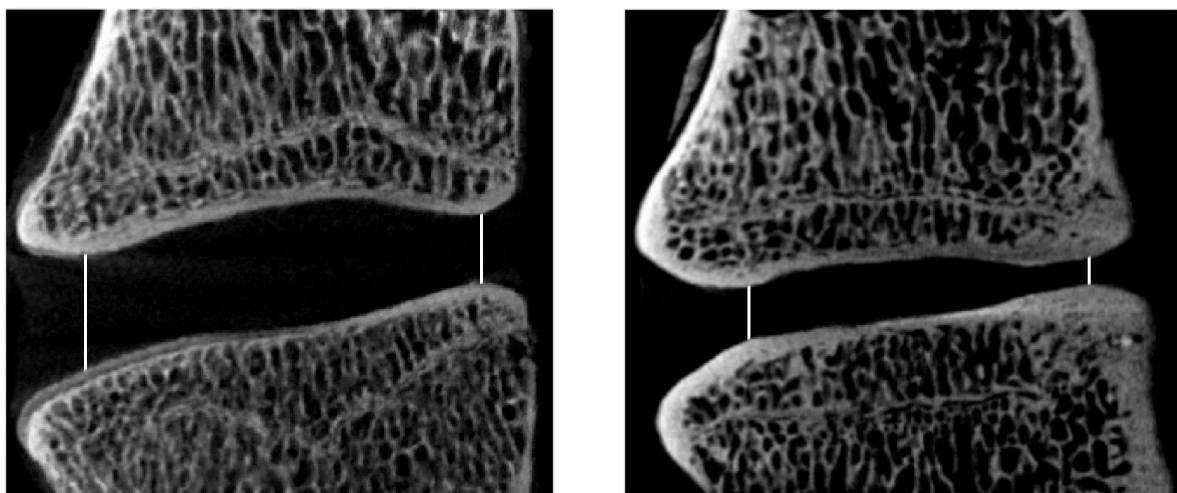


Abbildung 20: Micro-CT (sagittal) prä- und postoperativ. Die BS-Höhe wird ventral und dorsal vermessen. Beachte die Änderung der Trabekelstruktur und -dicke im anterioren und posterioren Drittel der Grund- und Deckplatte (postoperatives BS-Segment).

In der coronaren Schichtung wurde die BS-Höhe auf der rechten Seite mit der linken verglichen. Die coronare Ebene wurde genau zentral durch das Bewegungssegment und zusätzlich dezentral ventral und dorsal davon ausgewertet, um den in Grenzen unterschiedlichen Eintrittswinkel der Fassung zu berücksichtigen zu können. Die coronare Micro-CT (Abbildung 22) erlaubte daher eine seitengetrennte Beurteilung der BS-Höhe zwischen der Seite, über die das Bewegungssegment geschädigt wurde (rechts) und der nicht direkt penetrierten Seite (links).

2.2.2 Morphologische Veränderungen in den Bewegungssegmenten

Auch zur Beurteilung morphologischer Veränderungen in den Bewegungssegmenten wurden die Micro-CT-Schnitte in der sagittalen (Abbildung 21) und coronaren (Abbildung 22) Schnittebene auf mögliche Veränderungen der Grund- und Deckplatten, knöcherne Anbauten und Strukturveränderungen in der BS hin untersucht. Die coronare Analyse der CT-Schnitte erlaubte wiederum einen Vergleich zwischen der rechten und linken Seite des Bewegungssegmentes, um den Effekt der BS-Schädigung seitengetrennt beurteilen zu können.

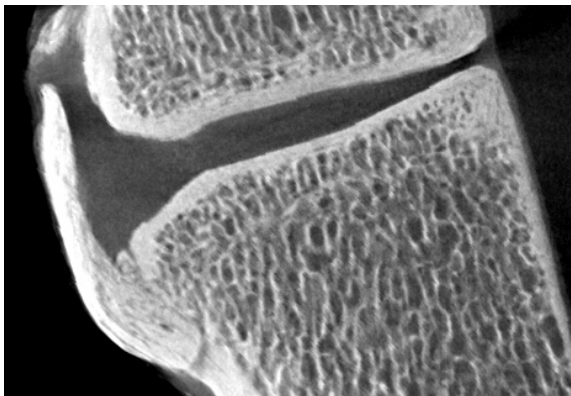


Abbildung 21: Micro-CT sagittal postoperativ.
Kräftiger Spondylophyte ventral.

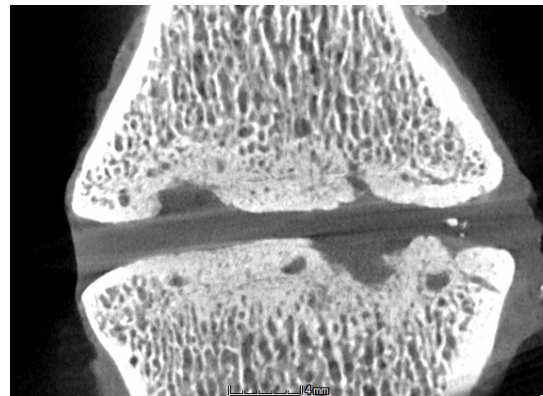


Abbildung 22: Micro-CT coronar postoperativ.
Grund- und Deckplattendefekte.

2.3 Datenanalyse, Statistik

Die graphische Darstellung der Ergebnisse und die Datenauswertung (deskriptive Statistik zur Prüfung der Datensätze auf Signifikanz) wurden mittels der Software Origin-Lab vorgenommen. Primär wurde untersucht, ob die ermittelten Daten normalverteilt waren. Hierzu wurde der Kolmogorov-Smirnoff-Test angewandt. Zur Bestimmung der Signifikanz wählten wir den Tuckey-Test, der auch bei niedrigen Fallzahlen angewandt werden kann.

Als Zielgröße unserer Studie wurde die Änderung der BS-Höhe durch den Vergleich der Ausgangshöhe vor der Schädigungsoperation mit der BS-Höhe nach der partiellen Nucleotomie festgelegt. Hierzu wurden die Höhen der BS nach der Schädigung gemessen und gegen die nativen BS im selben Versuchstier verglichen.

Quantitative Einflussvariablen waren die unterschiedlichen Standzeiten der Versuchstiere nach der Discographie, die sich 6 Wochen nach BS-Schädigung anschloß (6-Monatsgruppe = 6MG, 12-Monatsgruppe = 12MG).

Da die BS-Schädigung standardisiert nach einem festgelegten Muster erfolgte, sollte es qualitative Einflußvariablen nicht geben. Allerdings musste unterstellt werden, dass die Punktion der BS-Fächer nicht immer in einem exakt definierten Winkel durchgeführt werden konnte. Der Punktionskorridor ließ eine gewisse Winkelung des Eintrittspunktes der Schädigungsinstrumente in das Bewegungssegment zu. Um diese Streuung zu berücksichtigen, wurde die BS-Höhe in der coronaren Schnittebene sowohl zentral (mittig durch das Bewegungssegment bezogen auf die dorsoventrale Achse) als auch jeweils ventral und dorsal davon ausgemessen und statistisch ausgewertet. Die makroskopischen Veränderungen der Bewegungssegmente wurden statistisch nicht ausgewertet sondern ausschließlich beschrieben.

3. Ergebnisse

3.1 Operationszeiten, perioperative Besonderheiten

In den Tabellen 4 und 5 sind die Dauer der BS-Punktionen und perioperative Besonderheiten dargestellt. Die Punktionsdauer der Bewegungssegmente betrug im Mittel 11,2 Minuten in der 6MG und 20,6 Minuten in der 12MG einschließlich des Verschlusses der Punktionsstellen. In der 12MG war bei einem Versuchstier (Nr. 69117) das ursprünglich zugeordnete Bewegungssegment trotz mehrfacher Versuche nicht zu punktieren, so dass die zu schädigende BS ein Bewegungssegment nach kaudal versetzt werden musste.

Ein neurologisches Defizit durch die frustranen Punktionsversuche trat bei dem betreffenden Tier nicht auf. Die mehrfach wiederholte (letztlich erfolglose) Punktion des Bewegungssegmentes L1/L2 bei Versuchstier Nr. 69117 führte zu einer doppelt so hohen mittleren Operationsdauer in der 12MG im Vergleich zur 6MG.

Ähnlich negativ geht das Versuchstier Nr. 78666 der gleichen Gruppe mit einer Punktionsdauer von 31 Minuten in diese Statistik ein.

Tabelle 4: Versuchsgruppe 1 (6monatige Standzeit nach der Discographie)

Schaf Nr.	Gewicht [kg]	Discographie (Segment)	Punktionsdauer [min]	Besonderheiten während/nach der Schädigung
69295	65	L3/L4	14	keine
69294	59	L3/L4	9	keine
41162	62	L1/L2	11	DG schlecht durchführbar
20058	60	L3/L4	11	keine
20028	79	L1/L2	11	keine
78664	62	L5/L6	11	keine
78660	59	L5/L6	16	keine
69214	81	L1/L2	10	keine
78651	58	L5/L6	8	keine
mittel	65,0		11,2	
median	62		11	

Tabelle 5: Versuchsgruppe 2 (12monatige Standzeit nach der Discographie)

Schaf Nr.	Gewicht [kg]	Discographie (Segment)	Punktionsdauer [min]	Besonderheiten während/nach der Schädigung
69209	70	L1/L2	20	keine
41156	67	L1/L2	19	keine
20031	67	L3/L4	6	keine
69203	84	L3/L4	14	Segment L3/L4 schwer punktierbar
41163	72	L5/L6	13	keine
78652	52	L1/L2	24	Abbruch Erst-OP wegen Verletzung mit Skalpell, zweizeitige Fortsetzung
78666	62	L5/L6	31	Segment L1/L2 schwer punktierbar
69117	68	L3/L4	41	Segment L1/L2 nicht punktierbar, dafür Punktion L2/L3, L4/L5, L6/L7
78662	55	L1/L2	18	keine
mittel	66,3		20,6	
median	67		19	

Der minimalinvasive Schädigungsansatz war operationstechnisch wenig aufwändig und im Allgemeinen zeitsparend durchführbar. Für die Versuchstiere war das Vorgehen sicher und wenig belastend.

Die Tiere waren wenige Stunden nach dem Eingriff wieder mobil und begannen in der Regel sofort zu fressen und zu saufen. Wir haben bei keinem der 18 operierten Versuchstiere ein neurologisches Defizit nach der Operation gesehen.

Bis zur Tötung der Tiere entwickelten sich weder eine Wundinfektion noch Fieber. Peri- und postoperative Komplikationen (Darmparalyse, Ileus, Aspiration etc.), die durch vergleichsweise große Zugänge zur WS bedingt sein können, haben wir nicht beobachtet.

3.2 Bandscheibenhöhen in der sagittalen und coronaren Micro-CT

In den Tabellen 6 und 7 werden die BS-Höhen im coronaren und im sagittalen Strahlengang in der Micro-CT aufgeführt. Pro Versuchstier (Identifikation über 5stellige Nummer) wurde jeweils ein ungeschädigtes Bewegungssegment (nativ) gegen das randomisiert zugeordnet geschädigte Bewegungssegment verglichen. In der sagittalen Micro-CT wurde zentral (mittig) jeweils die BS-Höhe an der Vorderkante (ventral) und an der Hinterkante (dorsal) vermessen. Somit gingen in die Datenerhebung 2 Werte für die sagittale Messung ein.

Die Betrachtung der Bewegungssegmente in der coronaren Schnittführung bietet sich an, soll ein Vergleich der BS-Höhen getrennt nach der rechten (Schadigungsseite) und linken (nicht geschädigte) Seite innerhalb eines Segmentes vorgenommen werden. Dieser Vergleich lässt Rückschlüsse auf den Effekt der unilateral geführten partiellen Nucleotomie zu und gestattet somit die Aussage, ob die minimalinvasive BS-Schädigung über eine Seite zum Höhenverlust der kompletten BS führt.

In der coronaren Ebene wurden die BS-Höhe im Bewegungssegment wiederum jeweils genau in der Mitte der BS (zentral) bestimmt und dann nochmals 5 mm ventral und 5 mm dorsal davon, so dass pro Bewegungssegment jeweils 3 Wertepaare ausgemessen und statistisch bewertet wurden (dorsal - links/rechts, zentral - links/rechts, ventral - links/rechts). Rechts bedeutet hierbei wieder die rechte Seite der Versuchstiere, über die die partielle Nucleotomie durchgeführt wurde; links entspricht der Körperseite, über die die Discographie vorgenommen wurde.

Tabelle 6: Versuchsgruppe 1 (6monatige Standzeit), BS-Höhen coronar/sagittal, Mittelwerte und Standardabweichung grau unterlegt, alle Werte in mm

Schaf Nr. - Segment Nr.		BS-Höhe natives Segment				Schaf Nr. - Segment Nr.	BS-Höhe geschädigtes Segment			
		coronar		sagittal			coronar		sagittal	
		links	rechts	ventral	dorsal		links	rechts	ventral	dorsal
69295 - L4/L5	dorsal	3,99	3,99	3,14	1,71	69295 - L3/L4	3,99	3,42	2,28	0,84
	zentral	4,69	4,69				3,99	2,56		
	ventral	4,69	4,69				3,42	2,85		
69294 - L2/L3	dorsal	5,00	5,00	2,56	1,71	69294 - L3/L4	3,99	3,99	2,28	1,42
	zentral	5,00	4,69				3,70	3,13		
	ventral	3,70	3,70				3,13	2,85		
41162 - L2/L3	dorsal	5,54	5,23	2,56	1,71	41162 - L1/L2	5,23	4,92	1,42	0,85
	zentral	4,62	4,30				4,92	4,92		
	ventral	4,62	4,62				4,30	3,07		
20058 - L5/L6	dorsal	5,85	5,85	3,42	2,85	20058 - L3/L4	5,54	5,23	2,56	1,14
	zentral	5,54	5,54				5,54	5,23		
	ventral	5,85	5,85				3,69	3,69		
20028 - L4/L5	dorsal	5,54	5,54	3,42	2,00	20028 - L1/L2	4,61	4,61	3,13	1,42
	zentral	5,54	5,54				4,92	4,92		
	ventral	5,23	5,23				4,00	3,70		
78664 - L4/L5	dorsal	5,23	5,23	2,85	1,43	78664 - L5/L6	4,92	4,61	1,99	1,14
	zentral	5,23	5,23				4,92	4,61		
	ventral	5,23	5,23				4,30	3,69		
78660 - L2/L3	dorsal	5,54	5,54	3,14	1,42	78660 - L5/L6	4,92	4,61	2,56	2,28
	zentral	4,92	4,92				4,92	4,61		
	ventral	5,23	4,92				4,92	4,92		
69214 - L2/L3	dorsal	5,31	5,31	2,85	1,71	69214 - L1/L2	4,37	4,06	2,56	0,85
	zentral	5,00	5,00				4,37	3,69		
	ventral	4,38	4,38				3,08	2,77		
78651 - L2/L3	dorsal	4,69	4,69	2,85	1,42	78651 - L5/L6	4,27	3,70	2,28	1,14
	zentral	3,42	3,42				3,99	3,42		
	ventral	3,42	3,42				4,27	3,99		
Mittelwert	dorsal	5,18	5,15	2,97	1,77	Mittelwert	4,64	4,35	2,34	1,23
	zentral	4,88	4,81				4,58	4,12		
	ventral	4,70	4,67				3,90	3,50		
Standard- abweichung	dorsal	0,56	0,55	0,32	0,44	Standard- abweichung	0,54	0,59	0,46	0,45
	zentral	0,64	0,66				0,60	0,94		
	ventral	0,78	0,76				0,61	0,70		

Der Vergleich der 6MG mit der 12MG lässt außerdem Rückschlüsse darauf zu, in welchem Zeitraum sich nach der Schädigungsoperation die Änderung der BS-Höhe einstellt. Hier kann unterschieden werden, ob die BS-Höhe mit zunehmender Standzeit der Tiere noch weiterhin abnimmt, und ob sich pathomorphologische Zeichen der BS-Degeneration intensiver entwickeln. Diese Informationen könnten Konsequenzen für das Design des Schädigungsmodells haben, also vor allem die Standzeit der Tiere nach der partiellen Nucleotomie. Außerdem könnte durch diesen Vergleich auch ermittelt werden, ob spontane Regenerationsprozesse stattfinden.

Tabelle 7: Versuchsgruppe 2 (12monatige Standzeit), BS-Höhen coronar/sagittal, Mittelwerte und Standardabweichung grau unterlegt, alle Werte in mm

Schaf Nr. - Segment Nr.		BS-Höhe (in mm) natives Segment				Schaf Nr. - Segment Nr.	BS-Höhe (in mm) geschädigtes Segment			
		coronar		sagittal			coronar		sagittal	
		links	rechts	ventral	dorsal		links	rechts	ventral	dorsal
69209 - L4/L5	dorsal	5,31	5,31	3,14	2,00	69209 - L1/L2	3,99	3,99	2,56	1,14
	zentral	5,00	5,00				3,99	3,99		
	ventral	4,69	5,00				3,99	3,42		
41156 - L4/L5	dorsal	5,00	5,00	2,56	1,71	41165 - L1/L2	4,92	4,62	1,99	1,14
	zentral	5,00	4,69				4,30	3,08		
	ventral	3,70	3,70				3,69	3,69		
20031 - L2/L3	dorsal	4,62	4,62	2,28	1,14	20031 - L3/L4	3,70	4,61	2,56	0,85
	zentral	4,62	4,00				3,69	3,69		
	ventral	3,07	3,38				3,08	3,08		
69203 - L4/L5	dorsal	5,14	5,14	2,57	2,00	69203 - L3/L4	4,27	4,27	2,56	1,42
	zentral	4,86	4,86				3,99	3,70		
	ventral	3,43	3,43				3,13	2,85		
41163 - L6/S1	dorsal	6,25	6,25	2,85	2,00	41163 - L5/L6	5,00	5,00	2,28	1,14
	zentral	5,94	5,94				5,00	4,69		
	ventral	5,94	5,94				5,00	5,00		
78652 - L4/L5	dorsal	4,56	4,56	2,85	1,14	78652 - L1/L2	3,99	3,70	1,71	1,42
	zentral	4,56	4,28				3,70	3,42		
	ventral	4,28	4,28				3,70	3,42		
78666 - L4/L5	dorsal	4,56	4,56	2,57	1,43	78666 - L5/L6	4,28	4,28	2,00	1,42
	zentral	4,56	4,56				4,28	3,70		
	ventral	3,99	4,28				4,28	3,70		
69117 - L6/S1	dorsal	5,66	5,66	3,99	2,57	69117 - L3/L4	4,31	4,31	2,00	1,14
	zentral	5,39	5,39				4,31	3,77		
	ventral	5,66	5,66				3,77	2,96		
78662 - L2/L3	dorsal	5,63	5,49	2,85	1,71	78662 - L1/L2	5,13	4,27	2,00	1,42
	zentral	5,63	5,49				5,13	3,99		
	ventral	4,84	4,84				4,27	3,42		
Mittelwert	dorsal	5,21	5,16	2,85	1,74	Mittelwert	4,39	4,34	2,18	1,23
	zentral	5,05	4,90				4,26	3,78		
	ventral	4,50	4,53				3,87	3,50		
Standard- abweichung	dorsal	0,57	0,57	0,49	0,46	Standard- abweichung	0,50	0,37	0,31	0,20
	zentral	0,50	0,62				0,51	0,44		
	ventral	0,94	0,90				0,59	0,63		

Die native BS-Höhe betrug in der 6MG im Mittel 2,97 mm ventral und dorsal 1,77 mm (Abbildung 23a, b; jeweils hellgrüne Boxplots). Die Höhe der geschädigten BS in der 6MG betrug im Mittel 2,34 mm ventral und 1,23 mm dorsal (Abbildung 23a, b; jeweils dunkelblaue Boxplots). Damit hatte die BS-Höhe ventral um 0,63 mm ($p = 0,012$) und dorsal um 0,54 mm ($p = 0,037$) signifikant abgenommen.

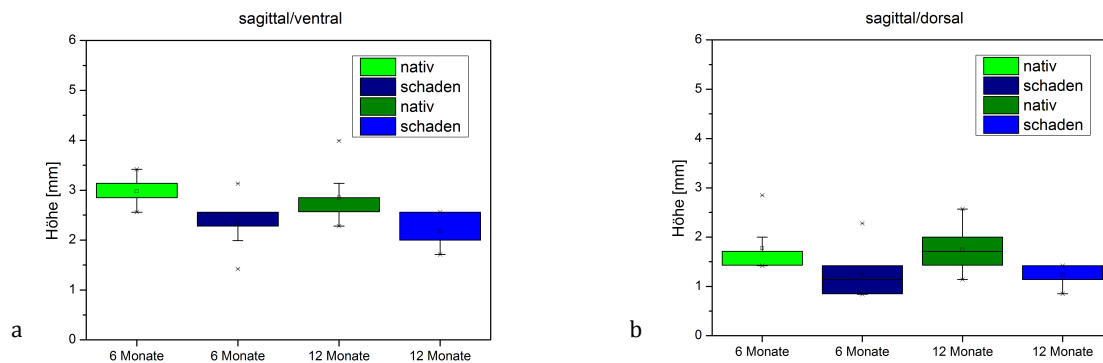


Abbildung 23: Statistische Auswertung der BS-Höhe im sagittalen Strahlengang, Trennung nach ventraler (a) und dorsaler (b) BS-Höhe.

In der 12MG wurde ebenfalls eine signifikante Abnahme der BS-Höhe sowohl ventral als auch dorsal ermittelt. Die mittlere ventrale native BS-Höhe wurde hier mit 2,85 mm, die mittlere dorsale BS-Höhe mit 1,74 mm bestimmt (Abbildung 23a, b; jeweils dunkelgrüne Boxplots). Demgegenüber betrug die mittlere Höhe der geschädigten BS ventral 2,18 mm und hatte damit um 0,67 mm abgenommen ($p = 0,008$). Die dorsal gemessene Höhe der geschädigten BS betrug mit 1,23 mm im Mittel 0,51 mm weniger als in den nativen BS ($p = 0,054$) (Abbildung 23a, b; jeweils hellblaue Boxplots).

Im Quervergleich zwischen der 6MG und der 12MG war weder bei den Nativ-BS noch den geschädigten BS eine signifikante Abnahme der BS-Höhe zu verzeichnen (native BS: 6MG ventral 2,97 mm vs. 12MG ventral 2,85 mm, $p = 0,91$; 6MG dorsal 1,77 mm vs. 12MG dorsal 1,74 mm, $p = 0,99$; geschädigte BS 6MG ventral 2,34 mm vs. 12MG ventral 2,18 mm, $p = 0,85$; 6MG dorsal 1,23 mm vs. 12MG dorsal 1,23 mm, $p = 1$) (Abbildung 23a, b).

Diese Tendenzen bestätigen sich für beide Versuchsgruppen, wenn die Änderung der BS-Höhe im coronaren Strahlengang getrennt nach der Schädigungsseite (rechts) im Vergleich mit der nicht geschädigten Seite (links) bestimmt wird, allerdings nicht für alle Messlevel.

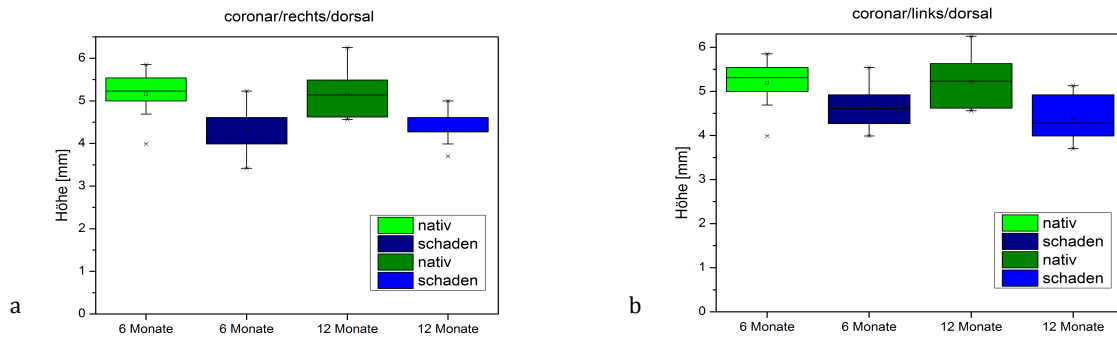


Abbildung 24: Statistische Auswertung der BS-Höhe im coronaren Strahlengang, coronar-dorsale Level, Unterscheidung rechte (a) und linke (b) Seite des Bewegungssegmentes.

Die Abnahme der BS-Höhe war auf der Schädigungsseite (rechte Seite) signifikant - in der 6MG für das dorsale Messlevel ($p = 0,015$; Abbildung 24a, dunkelblauer Boxplot) und das ventrale Messlevel ($p = 0,013$; Abbildung 26a, dunkelblauer Boxplot) nicht aber für das zentrale Messlevel ($p = 0,16$; Abbildung 25a, dunkelblauer Boxplot).

In der 6MG lässt sich in keinem der untersuchten Level links (nicht geschädigte Seite) eine signifikante Abnahme der BS-Höhe feststellen.

Hier betrug für die coronar-dorsale Messung links $p = 0,18$ (Abbildung 24b, dunkelblauer Boxplot), für die coronar zentrale Messung links $p = 0,68$ (Abbildung 25b, dunkelblauer Boxplot) und für die coronar-ventrale Messung links $p = 0,12$ (Abbildung 26b, dunkelblauer Boxplot).

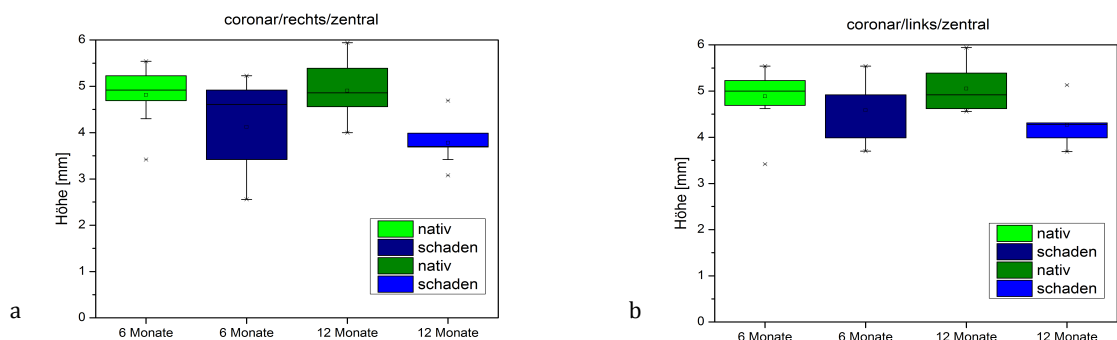


Abbildung 25: statistische Auswertung der BS-Höhe im coronaren Strahlengang, coronar-zentrale Level, Unterscheidung rechte (a) und linke (b) Seite des Bewegungssegmentes.

In der 12MG nahm die BS-Höhe dorsal rechts ($p = 0,012$) und links ($p = 0,017$; Abbildung 24a, b; jeweils hellblauer Boxplot), zentral rechts ($p = 0,008$) und links ($p = 0,028$; Abbildung 25a, b, jeweils hellblauer Boxplot) sowie ventral rechts ($p = 0,033$; Abbildung 26a, hellblauer Boxplot) signifikant ab, links ventral war eine signifikante Abnahme der BS-Höhe nicht zu ermitteln ($p = 0,30$; Abbildung 26b, hellblauer Boxplot).

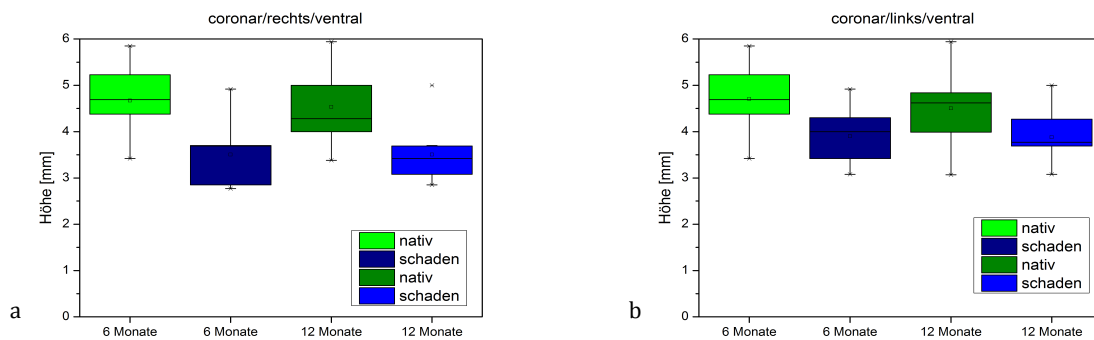


Abbildung 26: statistische Auswertung der BS-Höhe im coronaren Strahlengang, coronar-ventrale Level, Unterscheidung rechte (a) und linke (b) Seite des Bewegungssegmentes.

Zusammengefasst haben wir ermittelt, dass die Abnahme der BS-Höhe im sagittalen Strahlengang ventral und dorsal sowohl in der 6MG als auch in der 12MG signifikant war. Weiterhin war die Abnahme der BS-Höhe auf der Schädigungsseite in der 6MG bis auf das zentrale Messlevel für alle weiteren Level, in der 12MG hingegen für alle Messlevel signifikant. Auf der linken Seite war die Abnahme der BS-Höhe in der 6MG in keinem Messlevel signifikant, in der 12MG dagegen für die dorsalen und die zentralen Messlevel.

3.3 Morphologische Veränderungen in den Bewegungssegmenten

Die post mortem Untersuchung der Bewegungssegmente umfasste auch die Beurteilung der CT-Schnitte hinsichtlich des Auftretens pathomorphologischer Befunde als Marker einer eingetretenen lumbalen Degeneration. Diese konnten Spondylophytenbildung an den Bewegungssegmenten, Verkalkungen der BS sowie Unregelmäßigkeiten und Einbrüche in den Grund- und Deckplatten der zum Bewegungssegment gehörigen WK umfassen.

Verglichen wurden die Bewegungssegmente im sagittalen und im coronaren Strahlengang. In der Sagittalebene konnten somit Veränderungen an den Vorder- und Hinterkanten der Bewegungssegmente erfasst werden.

Die Betrachtung der coronaren Ebene erlaubt außerdem die Unterscheidung, ob die Veränderungen sowohl die Schädigungsseite (rechts) oder auch die nicht geschädigte Seite (links) des Bewegungssegmentes betrafen.

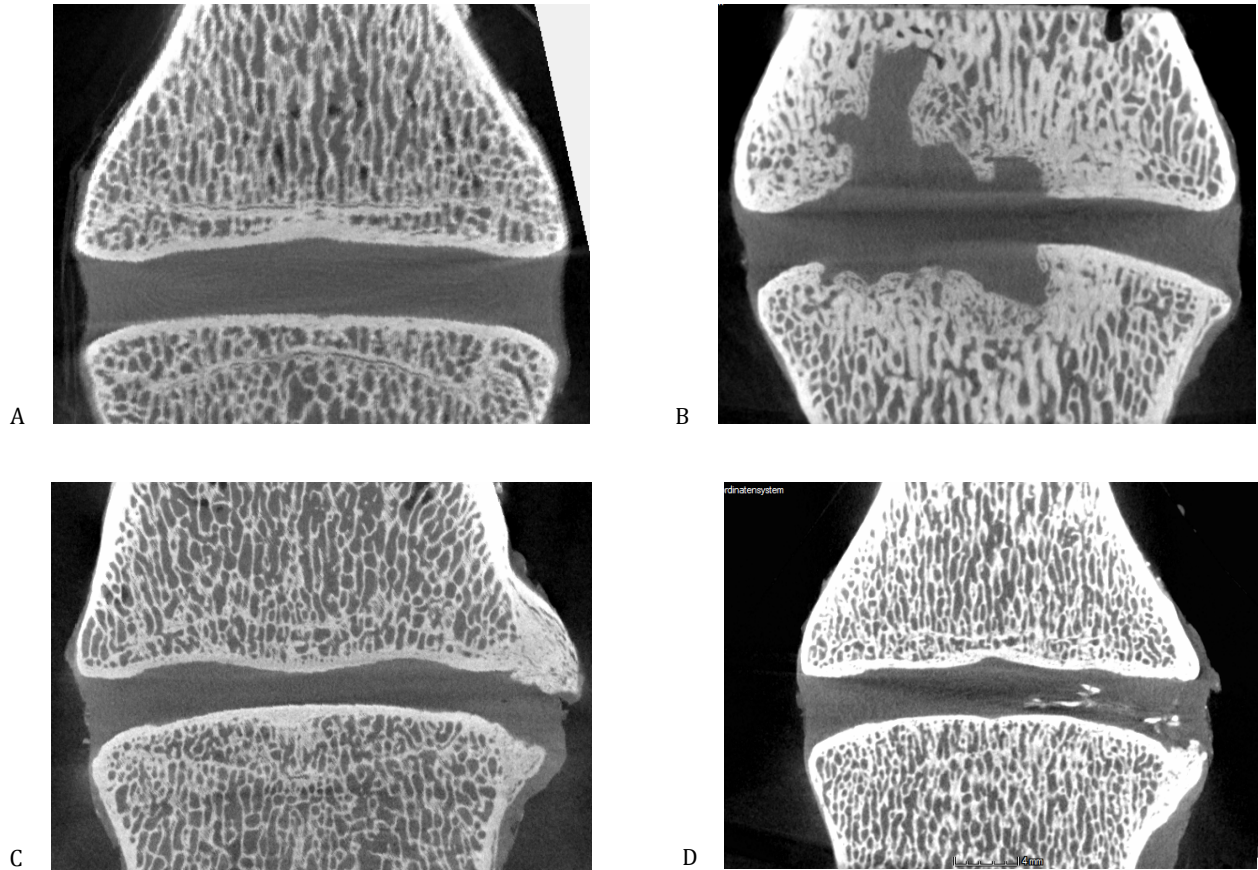


Abbildung 27 A-D: Pathomorphologische Veränderungen im coronaren Strahlengang. A - Normalbefund, B - deutliche Deck- und Grundplatteneinbrüche, C - kräftige Spondylophytenbildung im Bewegungssegment auf der rechten Seite (Schädigungsseite), D - Verkalkung im rechtslateralen Anulus fibrosus.

In Tabelle 8 sind die Ergebnisse der 6MG nach der BS-Schädigung aufgeführt. Bei der Betrachtung der nativen Bewegungssegmente in der Sagittalebene fällt auf, dass bis auf ein Untersuchungstier (Schaf Nr. 20058) derartige pathomorphologische Veränderungen nicht nachzuweisen sind. Dagegen waren in den Bewegungssegmenten, die durch die partielle Nucleotomie geschädigt worden waren, bei 6 von 9 Tieren in der sagittalen Micro-CT und bei 7 Tieren im coronaren Strahlengang zumindest leichtgradige Veränderungen zu dokumentieren.

Tabelle 8: Versuchsgruppe 1 (6monatige Standzeit), morphologische Veränderungen im Bewegungssegment

Schaf Nr.	geschädigtes Segment	morphologische Veränderungen sagittal natives Segment	morphologische Veränderungen sagittal geschädigtes Segment	morphologische Veränderungen coronar links geschädigtes Segment	morphologische Veränderungen coronar rechts geschädigtes Segment
69295	L3/L4	keine	keine	keine	kräftiger Spondylophyt
69294	L3/4	keine	GP-Einbruch L4 dorsal	keine	keine
41162	L1/2	keine	unregelmäßige Begrenzung Deckplatte zentral, und Grundplatte dorsale Drittelgrenze	keine	kräftiger Spondylophyt, unregelmäßige Deckplatte L2
20058	L3/4	Grundplatte L6 zentral unregelmäßig	Verkalkung NP dorsale Drittelgrenze Deckplatte	zentrale Inkongruenz Deckplatte L4	zentrale Inkongruenz Deckplatte L4
20028	L1/2	keine	zentraler Grund- und Deckplatteneinbruch	zentraler Grund- und Deckplatteneinbruch	Verkalkung AF, Spondylophyt L2, zentraler Einbruch Grund- und Deckplatte
78664	L5/6	keine	unregelmäßige Begrenzung Grund- und Deckplatte zentral	keine	beginnender Spondylophyt Grund- und Deckplatte
78660	L5/6	keine	keine	keine	keine
69214	L1/2	keine	Verkalkung AF ventral	Spondylophyt Deckplatte L2	Verkalkung AF
78651	L5/6	keine	keine	keine	Spondylophyt Grundplatte L5

Dabei fällt bei der coronaren Betrachtung der Bewegungssegmente weiterhin auf, dass in den geschädigten Segmenten eine Seitendifferenz zwischen der Schädigungsseite und der Gegenseite vorhanden ist. Auf der rechten Seite (Schädigungsseite) wurden bei 7 Versuchstieren pathomorphologische Befunde gesehen. Auf der linken Seite waren dagegen nur bei 3 der 9 operierten Tiere morphologische Veränderungen abbildbar.

Diese Befunde bestätigen sich qualitativ in der Versuchsgruppe 2 (Tabelle 9). Während hier im sagittalen Strahlengang in keinem der Nativsegmente pathomorphologische Veränderungen abbildbar waren, haben wir bei 4 Versuchstieren in den geschädigten BS Degenerationszeichen gefunden. In der coronaren Micro-CT der geschädigten BS waren auf der linken Seite in keinem Fall pathomorphologische Degenerationszeichen abzubilden. Hingegen wurden auf der Schädigungsseite (rechts) bei 7 von 9 Tieren derartige Degenerationsmuster festgestellt.

Tabelle 9: Versuchsgruppe 2 (12monatige Standzeit), morphologische Veränderungen im Bewegungssegment

Schaf Nr.	geschädigtes Segment	morphologische Veränderungen sagittal natives Segment	morphologische Veränderungen sagittal geschädigtes Segment	morphologische Veränderungen coronar links geschädigtes Segment	morphologische Veränderungen coronar rechts geschädigtes Segment
69209	L1/2	keine	keine	keine	Unregelmäßigkeit Deckplatte L2
41156	L1/2	keine	Verkalkung NP	keine	kräftiger Spondylophyt
20031	L3/4	keine	ventraler Spondylophyt, Vacuumphänomen dorsaler AF	keine	leichter Spondylophyt
69203	L3/4	keine	keine	keine	Spondylophyt, Verkalkung AF
41163	L5/6	keine	keine	keine	leichter Spondylophyt Grundplatte L5
78652	L1/2	keine	Spondylophyt Grund- und Deckplatte, AF-Bulge	keine	keine
78666	L5/6	keine	Einbruch Grund- und Deckplatte zentral	keine	Verkalkung AF
69117	L3/4	keine	keine	keine	Spondylophyt L4, Verkalkung AF
78662	L1/2	keine	keine	keine	keine

4. Diskussion

4.1 Bewertung des Tiermodelles

Tierversuche sind etablierte Werkzeuge der wissenschaftlichen Grundlagenforschung. Allerdings kann die Auswahl eines ungeeigneten Tiermodelles dazu führen, dass die ursprüngliche wissenschaftliche Zielsetzung verfehlt wird. In vitro-Tierversuche setzen eine klar formulierte Fragestellung, exakt definierte Zielgrößen und Vorüberlegungen bezüglich der Vergleichbarkeit der am Versuchstier gewonnenen Daten mit dem menschlichen Organismus voraus [171].

Zahlreiche Beschreibungen von in vivo-Tierversuchen bzw. Schädigungsmodellen zur Erforschung der BS-Degeneration, der Prüfung von Implantaten und Entwicklung zellbasierter regenerativer Methoden liegen vor [35, 36, 172, 173]. Diese Modelle sind an unterschiedlichen Klein- und Großtierarten beschrieben worden (u. a. Maus, Katze, Kaninchen, Ratte, Schaf, Hund, Ziege). Da auch innerhalb einer Spezies verschiedene Schädigungsansätze verfolgt werden, muss die Dateninterpretation sorgfältig vorgenommen werden.

Alle Modelle basieren prinzipiell auf der Schädigung der BS oder der KE durch mechanische Alteration, die direkte Schädigung der BS-Architektur, die Injektion chemischer Substanzen in die BS mit der Folge einer Nucleolyse [174, 175], die Induktion degenerativer Prozesse durch unphysiologische Belastungen der WS und die Beobachtung und Beschreibung spontan verlaufender Degenerationsprozesse. Die artefiziellen Schädigungen der BS bzw. der KE zielen darauf ab, die im Laufe der Degeneration entstehenden Strukturveränderungen in einem gerafften Zeitfenster zu imitieren. Die Anforderungen an ein solches Tiermodell sind komplex. Geeignete Tiermodelle sollten zum einen Ähnlichkeit mit der menschlichen WS aufweisen und in ihrer Durchführbarkeit bzw. ihrem Schädigungsansatz reproduzierbar sein. Der zeitliche Aspekt des Versuchsaufbaus soll zudem wenig störanfällig und reliabel sein.

Bereits die Wahl eines Tiermodells sollte unter Beachtung der zu bearbeitenden Fragestellung erfolgen [171]. Kleintiermodelle können vorzugsweise herangezogen werden, wenn die Prüfung regenerativer Therapieansätze auf Zellebene vorgenommen werden soll. Anhand der Untersuchungen kann beispielsweise überprüft werden, ob sich eine gewünschte Zelldifferenzierung durch den Einsatz von Wachstumsfaktoren oder Stammzellen realisieren lässt [176].

Tabelle 15: Beispiele publizierter Kleintiermodelle

	Untersuchungstier	Schädigungsmuster/Ansatz/Zugang	Jahr
Ando et al. ¹⁷⁴	Kaninchen	Chondroitinase ABC	1995
Kroeber et al. ⁵³	Kaninchen	Bandscheibenkompression	2002
Guehring et al. ¹⁷⁷	Kaninchen	intradiscale Druckmessung	2005

Dagegen sind Kleintiermodelle weniger gut geeignet, wenn BS direkt mechanisch geschädigt werden sollen. Sowohl die absolute Größe der BS als auch Variationen innerhalb einer Spezies machen Vergleiche mit der humanen BS schwierig [178].

Großtiermodelle sind an mehreren Spezies, z. B. Hund, Pavian, Schwein, Hirschkalb, Ziege, Schaf u. a. beschrieben worden [170, 175, 179]. Etablierte WS-Modelle an Primaten, die auf Grund ihres aufrechten bipedalen Ganges dem Menschen sehr ähnliche biomechanische Belastungsmuster der BS aufweisen, existieren bisher kaum, da sie sehr kostenintensiv sind und ethisch schwer vertretbar erscheinen [35, 179]. Gleiches gilt - zumindest in Deutschland - für Schädigungsmodelle am Hund, der für den Menschen wegen seiner besonderen Bedeutung über

den Status eines normalen Haustieres hinaus zwar häufig tierärztlichen Untersuchungen und teils auch komplexeren medizinischen Behandlungen zugeführt wird, als Versuchstier in der Grundlagenforschung in Deutschland jedoch nicht etabliert ist.

Bei Großtieren ähneln auf Grund des Durchmessers bzw. der Höhe der BS die Stoffwechselfvorgänge im BS-Gewebe und dessen biomechanische Belastungen denen des Menschen [180, 181, 182].

Vor allem der Nährstofftransport und die Entsorgung der Stoffwechselprodukte zwischen KE, AF und NP sind wegen der anatomischen Ähnlichkeiten besser zu vergleichen als bei Kleintieren. So weisen z. B. Ziegen, Primaten und Mini-Schweine in den lumbalen Abschnitten ihrer Wirbelsäule BS-Höhen von 5-7 mm auf, die damit den Abmessungen den lumbalen BS des Menschen ähneln. Bei den meisten Großtieren ist der sagittale Durchmesser der KE entlang der WS von cervical nach lumbal konstant, während er beim Menschen zunimmt. Auch beim Schaf und beim Kalb liegen im Vergleich zum Menschen große Ähnlichkeiten vor [36, 183].

Das Schaf ist auf Grund seiner anatomischen, morphologischen und verhaltensbiologischen Eigenschaften ein häufig genutztes Tier zur Durchführung experimenteller in vitro- und in vivo-Studien (Tabelle 16) und in einer Vielzahl von Publikationen als Versuchstier für präklinische Studien empfohlen worden [147, 170, 184, 185].

Diese umfassen die Entwicklung regenerativer und medikamentöser Therapien und die Testung neuer Implantate. Um physiologische Reifungsprozesse während der Versuchsdurchführung ausschließen zu können, sollte das Tier skelettal ausgereift sein [35].

Tabelle 16: Beispiele publizierter Tiermodelle (Schaf)

	Zugang/Schädigungsmuster/Ansatz	Jahr
Osti et al. ¹⁸⁹	anterolaterale Anulusinzision	1990
Melrose et al. ¹⁹⁰	anterolaterale Anulusschädigung (Schnitt)	1997
Fazzalari et al. ¹⁴⁴	Anulusschädigung (Nadel)	2001
Thompson et al. ¹⁹¹	anterior, anterolateral, zirkumferentielle Anulusschädigung	2004
Guder et al. ¹⁷⁰	anterolateraler Zugang, partielle Nucleotomie	2009
Oehme et al. ¹⁶⁹	lateraler Zugang, Anulusschädigung	2012
Vadalà et al. ¹⁵⁹	transpedikulärer Zugang, partielle Nucleotomie	2013

Schafe sind sehr soziale Tiere, die ihr gesamtes Leben im Herdenverbund verbringen. Es gibt in Bezug auf den Herdenverbund aber deutliche Rassenunterschiede: Merinoschafe haben eine starke Herdenverbundenheit, die z. B. beim ostfriesischen Milchschaaf nicht derartig ausgeprägt ist. Alle Tiere fressen gleichzeitig, danach werden Ruhephasen eingehalten, in denen das Wiederkäuen stattfinden kann. Horntragende Tiere haben eine größere Individualdistanz als hornlose Rassen. Innerhalb des Verbundes kann die sichere Einzeltiererkennung nur durch Ohrmarken oder die anderweitige Kennzeichnung der Tiere - mittels Farbkodierung - erfolgen.

Schafe weisen rassenspezifisch deutliche morphologische Variationen auf. Die Körperlänge der Tiere differiert je nach Rasse zwischen 1 und 2 m, die Schulterhöhe beträgt zwischen 60 und 120 cm. Männliche Schafe sind in der Regel deutlich größer als Weibchen und besitzen ein Körpergewicht bis 200 kg, sind also nicht uneingeschränkt und vor allem gefahrlos zu nutzen. Dagegen sind weibliche Schafe trotz ihrer Körpergröße meist sehr zahm und gut händelbar [186].

Schafe zeichnen sich durch ein relativ einfaches Handling aus und unterscheiden sich hierin von einer Vielzahl anderer Tierarten vergleichbarer Größe (Hund, Schwein, Ziege, Kalb etc.). Fremdaggressives Verhalten wird bei weiblichen Schafen sehr selten beobachtet. Diese Tatsache vereinfacht die Zuführung der Tiere zu den Operation bzw. Untersuchungen und die Nachbetreuung der operierten Tiere außerordentlich. Durch die fehlende Fremdaggression der Tiere können potentiell negative postoperative Einflussgrößen (Verletzungsgefahr der Versuchstiere untereinander durch unkontrolliertes Verhalten etc.), die sogar zum Ausschluss aus der Studie oder zum Verlust von Versuchstieren führen können, minimiert werden. Da Schafe am Oberkiefer keine Zähne sondern Dentalplatten besitzen, war auch die Verletzungsgefahr der Versuchstiere untereinander sowie des Pflege- und OP-Personals verringert.

Der physiologische Bewegungsdrang der Tiere ist für die postinterventionelle Remobilisierung und die Vermeidung perioperativer Komplikationen (Pneumonie, Decubitus, embolische Komplikationen) von großem Vorteil und führte nebenbei zu einer entsprechenden Belastung der geschädigten Bewegungssegmente (bzw. je nach Studiendesign auch zur Beanspruchung eingebrachter Implantate bzw. Regenerate). Ein weiterer positiver Fakt ist die vergleichsweise einfache Verfügbarkeit der Tiere und die Möglichkeit, die Probanden zwischen den Versuchsanwendungen problemlos und vergleichsweise wenig aufwändig in einem Herdenverbund halten zu können. Die übliche Haltung der Schafe in mehr oder weniger großen Herden und die auf den Herdenverbund ausgerichtete Logistik gestalten die Integration der

Versuchstiere im Normalfall sehr unproblematisch. Rivalitätskämpfe finden nicht statt; somit droht auch ein möglicher Verlust von Versuchstieren durch Verletzungen nicht.

Das Normalgewicht eines ausgewachsenen, weiblichen Merinoschafes ist zumindest näherungsweise mit dem Durchschnittsgewicht eines erwachsenen Menschen vergleichbar (50-70 kg). Das Körpergewicht unserer Versuchstiere lag im Mittel bei 65,46 kg. Das Alter der Tiere wurde derart gewählt, dass durch die abgeschlossene Skelettreife physiologische Reparationsprozesse am Stammskelett möglichst ausgeschlossen waren, denn bei juvenilen, nicht ausgewachsenen Tieren kann es durchaus zu spontanen Heilungen induzierter Gewebeschädigungen kommen, was zu falsch-positiven Untersuchungsergebnissen hätte führen können. Andererseits sollten bei den Probanden nicht bereits degenerativ veränderte BS vorhanden sein [186].

Die WS des Schafes ist aus 7 cervicalen, 12–14 thorakalen und 6–7 lumbalen Wirbeln aufgebaut [186]. Die ovinen Lendenwirbel sind durch etwa 5-7 mm dicke BS verbunden und weisen Ähnlichkeiten mit der humanen LWS in Bezug auf Größe und Bewegungsmöglichkeiten auf. Auch die Struktur der ovinen BS, ihr Kollagen- und Wassergehalt und die Ausrichtung der Kollagenstruktur in den einzelnen BS-Regionen ähneln der des Menschen [187, 188].

Der Wassergehalt in den äußeren Lagen des AF beträgt 74% und steigt hin zum NP auf 86% an. Der Kollagengehalt fällt von 30% in den Außenzonen des AF auf 20% in den vorderen und lateralen inneren Abschnitten. Im dorsalen AF beträgt er 16%.

Wilke et al. [183] stellten 1997 eine Studie vor, die histomorphometrische und anatomische Gemeinsamkeiten und Unterschiede zwischen der humanen und der ovinen WS untersuchte. Hierzu wurden Versuchstiere ausgewählt, deren WS aus 7 cervicalen, 14 thorakalen und 7 lumbalen WK aufgebaut war. Die Höhen der lumbalen BS waren bei den untersuchten Tieren im Mittel 5 mm geringer als beim Menschen (10-11 mm). In den zervikalen Abschnitten hingegen bestand ein umgekehrtes Höhenverhältnis (Schaf 5-7 mm, Mensch 3-5 mm).

Ein weiterer Unterschied war die Höhe der WK in den zervikalen und lumbalen Abschnitten. Hier wurden im Vergleich Mensch - Schaf gegenläufige Werte ermittelt.

Die gleiche Arbeitsgruppe [182] untersuchte anhand biomechanischer Zielgrößen (Bewegungsumfang, sogen. neutrale Zone und Steifigkeit) ovine Bewegungssegmente unter definierten Belastungen und unterzog diese Daten einem Vergleich mit Publikationen über analoge Untersuchungen an humanen WS [192].

Die Übereinstimmungen der Daten gelten auch unserer Arbeitsgruppe als Beleg dafür, dass sich die ovine WS als Modell der humanen WS in der Grundlagenforschung eignet.

Insbesondere ist aber neben der Wahl des Versuchstieres offenbar auch von Bedeutung, welche WS-Abschnitte geschädigt werden. Es ist bekannt, dass die BS-Degeneration zwar sämtliche Bewegungssegmente der WS betreffen kann, jedoch mit einer gewissen Betonung in den lumbalen Abschnitten auftritt. Hier muss ursächlich u. a. die größere Dicke der lumbalen BS angenommen werden, so dass sich schädigende Einflüsse auf die zentralen Abschnitte des NP lumbal am stärksten auswirken [22, 180].

4.2 Bewertung des Versuchsaufbaus

An der ovinen WS sind verschiedene Schädigungsmodelle beschrieben worden (Tabelle 16) [144, 169, 170, 190, 191]. Auf Grund anatomischer Besonderheiten wie der Verknöcherung oder Kalzifizierung des hinteren Längsbandes, der Kalzifizierung des dorsalen AF und der Ausdehnung des RM in die sakralen Abschnitte der WS kann der dorsale bzw. dorsolaterale Zugang zur ovinen Wirbelsäule relativ schwierig sein und wird bisher in der Literatur auch selten angegeben [169, 193, 194]. Auch die dezentrale dorsale Lage des NP innerhalb der BS lässt dorsolaterale Zugangswege potentiell komplikationsbehafteter erscheinen als ventrale bzw. anteriore. Vor allem mögliche Verletzungen des Rückenmarks und konsekutive sensomotorische Ausfälle bei den Versuchstieren müssen eher den dorsalen Zugängen angerechnet werden.

Standardzugänge zu den BS sind daher meist der anteriore und der anterolaterale Zugang [170, 189, 193, 194], wobei diese Zugangswege wiederum mit einem potentiellen Risiko der Nerven-, Gefäß- bzw. Darmverletzung verbunden sind. Im Umkehrschluss bedeutet dies, dass eine zeit- und ressourcenaufwändige Präparation nötig sein kann, um o. g. Verletzungen zu vermeiden. Durch diese Verletzungen kann es schon während des Eingriffes aber auch postoperativ zum Verlust von Versuchstieren kommen. Je nach Zugangsgröße können postoperativ Narbenhernien entstehen. Zudem können ausgedehnte retro- bzw. intraperitoneale Präparationen für die Versuchstiere eine nicht unerhebliche intra- und postoperative Belastung darstellen (Blutverlust, Wundheilungsstörungen, Wundinfektionen, Darmparalyse/Ileus) und mit einer Zunahme der perioperativen Morbidität bzw. Mortalität einhergehen. Nicht zuletzt können die Verschlüsse und Nachsorgemaßnahmen ausgedehnter Operationszugänge mit einem hohen apparativen Aufwand verbunden sowie personal- und zeitintensiv sein.

Die gesichteten Schädigungsmuster an der ovinen BS sind mit vergleichsweise ausgedehnten Freilegungen der LWS verbunden. Guder et al. [170] erarbeiteten 2009 ein Schädigungsmodell am Schaf, bei welchem sie über einen 10 cm langen anterolateralen retroperitonealen Zugang zum Wirbelsäulensegment LWK3-LWK4 auf die zuvor drahtmarkierte BS zugingen und den NP partiell entfernten. Die Versuchstiere wurden randomisiert in 2 Gruppen eingeteilt, die nach der stattgehabten Nucleotomie nach 12 bzw. 48 Wochen Standzeit euthanasiert wurden. Die Tiere wurden sowohl vor der Schädigung als auch danach zu definierten Zeitpunkten übersichtsradiographisch, mittels MRT und CT untersucht. Dabei wurden neben der Dokumentation makroskopischer Veränderungen die mikroskopische Untersuchung der BS und histomorphometrische Untersuchungen vorgenommen. Die Autoren konnten belegen, dass in der Versuchsgruppe mit der längeren Standzeit nach der partiellen Nucleotomie die MRT-morphologisch nachzuweisende BS-Degeneration in Form von Signalveränderungen in den Grund- und Deckplatten der angrenzenden Wirbelkörper als auch im AF und NP selbst zugenommen hatten. Die Daten wurden nach den Scoringsystemen von Modic [82] und Thompson [97] bewertet. Außerdem war es zur deutlichen Störung der Binnenstruktur der BS gekommen. Trotz des relativ großen operativen Zuganges zur LWS beobachtete die Arbeitsgruppe eine Wundinfektion nicht. Drei Versuchstiere verstarben wegen narkoseassoziierter Zwischenfälle. Die Autoren schlussfolgerten, dass anhand der radiologischen und histologischen Veränderungen des beschriebenen Schädigungsmodells eine reliable Beschreibung der durch die Nucleotomie induzierten Degeneration an der ovinen BS und den angrenzenden Abschlussplatten und ein valider Vergleich mit an humanen BS beobachteten Veränderungen nach mikrochirurgischer Nucleotomie möglich war.

Die Arbeitsgruppe um Oehme [169] beschrieb 2012 einen minimalinvasiven lateralen Zugang zur lumbalen WS des Schafs, der technisch einfach und unter Minimierung des Verletzungsrisikos der präspinal verlaufenden Leitungsbahnen bei 95 Tieren durchgeführt wurde. In einer ersten Operation wurden die WK LWK1 bis LWK6 dargestellt und geschädigt. 3 Monate später wurden kultivierte Regenerate über die Gegenseite in die BS injiziert. Die Autoren nahmen an 175 Segmenten Manipulationen vor und beobachteten weder eine Wundinfektion noch andere Majorkomplikationen (signifikante Blutung, Gefäß- oder Nervenverletzung, postoperativer Ileus, Narbenhernien etc.). Die Eingriffsdauer pro Versuchstier wurde mit etwas weniger als 60 Minuten angegeben.

Einen transpedikulären Zugang zur BS stellte die Arbeitsgruppe Vadalà et al. [159] vor. Hierbei wurde die Überlegung zu Grunde gelegt, dass eine transanuläre Schädigung des NP zwingend einen Defekt im AF hervorruft. Die BS wurden daher über einen Korridor durch den Processus transversus und die KE punktiert. Nach Gewebeentnahme aus dem NP bzw. Injektion eines Hydrogels etc. wurde der Zugangskanal in der KE mittels eines zylindrischen elastischen PU-Spacers versiegelt („endplate repair“), um postinterventionell ein Einbrechen des NP („Schmorlsches Knötchen“) in die Wirbelkörpergrundplatten zu verhindern.

Auf diese Weise wurden bei 12 Versuchstieren jeweils die Bewegungssegmente LWK1-2 bis LWK4-5 punktiert. Die mittlere Operationszeit betrug 92 Minuten, wobei eine Lernkurve innerhalb des Versuchsverlaufs zu verzeichnen war. Die intraoperative Komplikationsrate lag bei 4,15% und umfasste zwei Liquorlecks. Postoperativ wurde neben einer Spondylodiszitis eine artefizielle Wirbelkörperfraktur gesehen, die in eine Spondylarthritis mündete.

Zur Frage, ob eine Punktion der KE einen negativen Effekt auf den BS-Metabolismus durch Alteration der Diffusionsstrecke zwischen NP und KE entwickelt könnte, liegen bisher keine Erkenntnisse vor. Es kann aber abgenommen werden, dass durch eine Schädigung der Endplatte bzw. deren Folgen (Kalzifizierung, Fibrosierung) die BS-Degeneration forciert wird. In unserem Versuch wurde durch die Discographie dargestellt, dass sich der AF nach der Schädigung der BS innerhalb von 6 Wochen verschlossen hatte.

Unser Schädigungsmodell wurde im Spannungsfeld zwischen möglichst geringem apparativem Aufwand einerseits, minimalinvasivem Zugehen auf das Bewegungssegment und prinzipieller Machbarkeit der Methode andererseits entwickelt. Die Vorteile der minimalinvasiven Vorgehensweise sollten nicht dazu führen, dass die Reproduzierbarkeit der Schädigung per se nicht gegeben war.

Wir entwickelten ein minimalinvasives Schädigungsmodell an der ovinen BS im Sinne einer partiellen Nucleotomie über kurzstreckige dorsolaterale Zugänge (Stichinzisionen auf der Körperoberfläche der Versuchstiere) zu den BS der LWS, der klinischen Situation eines dorsolateralen Bandscheibenvorfalles entsprechend. Da minimalinvasiv die anterolateralen Korridore nicht zur Verfügung standen, haben wir von vornherein den dorsolateralen Zugang favorisiert.

Durch die siebengliedrige LWS des Schafes war es möglich, im Versuch zwischen 3 BS pro Versuchstier eine BS randomisiert zur Schädigung zu nutzen und eine Nativprobe ebenfalls randomisiert zuzuordnen. So fungierte das Versuchstier selbst als individuelle Kontrolle, die Anzahl der Tiere für den Vor- und den Hauptversuch konnte damit gering gehalten werden.

Auf eine direkte zeit- und ressourcenaufwändige Freilegung der Bewegungssegmente wurde verzichtet. Interventionspflichtige Nachblutungen bzw. Wundhämatome beobachteten wir nicht. Auch wurden weder Wundinfektionen noch Spondylodiszitiden festgestellt. Die Stichinzisionen wurden verklammert, Faszien- bzw. subkutane Nähte waren nicht nötig. Narbenhernien wurden postoperativ nicht gesehen. Auf Grund der limitierten Zugänge waren zusätzliche lokale Infiltrationsanästhesien zur unterstützenden Analgesie nicht nötig.

Die Induktion der Segmentdegeneration über ein Schädigungsmuster mit geringem apparativem und zeitlichem Aufwand ermöglichte, mehrere Bewegungssegmente pro Tier in einer Sitzung zu schädigen und mehrere Versuchstiere an einem Tag zu operieren. Vergleichbar wenig invasive Schädigungsmodelle sind nicht publiziert. Die sichere Anwendung der Schädigungstechnik erforderte im Vorfeld des Hauptversuchs aber eine relativ aufwändige Vorbereitung, da den Operateuren die knöchernen Anatomie der WS während der BS-Schädigung nicht direkt zugänglich war. So musste zum Erlernen der gedeckten perkutanen Schädigung der BS präoperativ zunächst das genaue Studium der ovinen WS-Konfiguration, speziell der lateralen Konfiguration der Wirbelkörper mit einem kurzen aber flächigen Processus transversus erfolgen (vgl. Kapitel 2.1.1).

Im sich anschließenden Vorversuch wurde die Schädigung der BS zunächst mit Lumbalpunktionsnadeln der Firma Pajunk (Sprotte® 21G x 120 mm) vorgenommen, wobei wir erkannt haben, dass die auf diese Weise gewonnene Gewebeprobe aus dem NP nicht ausreichend groß war, um die notwendige Degeneration der BS zu induzieren. Außerdem konnte offenbar durch die feine Punktionsnadel der AF nicht in dem Maße geschädigt werden, dass in den darauffolgenden Micro-CT-Untersuchungen der gewünschte degenerative Effekt nachweisbar gewesen wäre.

Somit wurde das Schädigungsdesign während des Vorversuchs geändert. Die Schädigung wurde unter Beibehaltung des minimalinvasiven Zuganges zum Bewegungssegment in der beschriebenen Art und Weise durchgeführt, indem der Punktionskorridor über einen Kirschnerdraht zunächst korrekt zum BS-Fach hin gewinkelt wurde. Unter Beibehaltung dieses Winkels wurde dann der Korridor für die Faszien durch Verschieben einer Punktionsahle vorbereitet. Wichtig war in diesem Zusammenhang, dass der Anulus vollständig penetriert wurde. In der Literatur ist vielfach beschrieben worden, dass oberflächliche Anulusläsionen oftmals folgenlos vernarben und somit nicht zu einer BS-Degeneration führen [195].

Andererseits sind Schädigungsmodelle publiziert, bei denen nur durch eine Anulusincision eine nachweisbare Segmentdegeneration induziert werden konnte [189].

Selbst vollständig penetrierende Verletzungen des AF können sich druckstabil verschließen, haben also keine negativen Auswirkungen auf den weiteren Versuchsablauf. Dies haben wir anhand der Discographie 6 Wochen nach der partiellen Nucleotomie bestätigen können.

4.3 Zu den Ergebnissen

4.3.1 Bewertung der Bandscheibenhöhe

Die BS-Höhe ist als Indikator des Wasserbindungsvermögens bzw. Wassergehaltes und damit der Vitalität der BS anerkannt [146, 147]. Der Flüssigkeitsstrom in die BS zur Nutrition der Zellen im NP und der zentrifugale Flüssigkeitsautausch zum Abtransport der Stoffwechselmetabolite sind häufig untersuchte und gut dokumentierte Grundlagen des BS-Stoffwechsels [22, 63].

Die EZM-Synthese ist an diesen Flüssigkeitsstrom gebunden. In der gesunden BS überwiegt die Matrixsynthese den Matrixabbau. Die Abnahme der BS-Höhe im Zuge der BS-Degeneration wird einerseits als Folge des Strukturverlustes innerhalb der BS bewertet. Mit diesem Strukturverlust gehen andererseits der verstärkte Matrixverlust und die Denaturierung des Kollagens einher [79, 80], die über eine negative Rückkopplung das Wasserbindungsvermögen der BS verschlechtern [119, 126] und die Widerstandsfähigkeit des AF herabsetzen [8].

Im Tiermodell konnte belegt werden, dass beispielsweise eine inadäquat hohe Belastung der BS [53] aber auch mechanische Schädigungen des AF über die Reduktion der BS-Höhe zur Segmentdegeneration führen [162].

Unser Versuch wurde auf den Effekt der BS-Schädigung in Bezug auf die Abnahme der BS-Höhe im Vergleich der Nativ-BS mit der durch Nucleotomie geschädigten BS fokussiert. In der gesichteten Literatur sind mögliche Schädigungseffekte teilweise auch histologisch nach Anfärbung der BS und Dokumentation von Delamination (Riß- und Spaltenbildung in der BS), möglicher Angioneogenese, Kalzifizierung und der Bestimmung der Trabekelarchitektur und -stärke an den WK-Endplatten [170] vorgenommen worden. Hier muss bemerkt werden, dass es allein durch die Präparation der Gewebeproben zur lichtmikroskopischen Beurteilung zu entsprechenden Struktursschäden im BS-Gewebe kommen kann, die als Störung der BS-Struktur i. S. von Delaminationseffekten (fehl-)interpretiert werden könnten. Um diesbezüglich

Fehlinterpretationen zu vermeiden, wären dann aufwändige histologische und elektronenmikroskopische Untersuchungen notwendig.

Die im sagittalen Micro-CT dokumentierte Reduktion der BS-Höhe war bezogen auf die geschädigten BS in beiden Versuchsgruppen signifikant. In der 6MG betrug die mittlere Abnahme der BS-Höhe ventral 0,63 mm ($p = 0,012$) und dorsal 0,54 mm ($p = 0,037$).

Die weitere Abnahme der BS-Höhe in der 12MG ist vor diesem Hintergrund eine erwartete Tendenz. Hier betrug die mittlere Abnahme der BS-Höhe ventral 0,67 mm ($p = 0,008$) und - nicht signifikant - dorsal 0,51 mm ($p = 0,054$).

Erwartungsgemäß war es aber beim Vergleich der Nativ-BS innerhalb der Versuchsgruppen nicht zu einer signifikanten Änderung der BS-Höhe gekommen. Dies lässt die Beurteilung zu, dass es während unseres Versuchs, der immerhin innerhalb der 12MG etwas mehr als ein Jahr dauerte, nicht zu einer Spontandegeneration der Bewegungssegmente gekommen war, die die BS-Degeneration durch unseren Schädigungsansatz verstärkt haben könnte.

Die coronare Betrachtung der Bewegungssegmente bestätigt in der 12MG für sämtliche Messlevel (zentral ± 5 mm) und in der 6MG für die Messlevel jeweils 5 mm ventral und dorsal des BS-Zentrums auf der Schädigungsseite eine signifikante Abnahme der BS-Höhe. Es kann angenommen werden, dass die von dorsal geführte Schädigung der BS zunächst auf der Schädigungsseite die Abnahme der dorsalen BS-Höhe forciert, ehe über die gestörten Nutrivorgänge im NP bzw. den weiteren Matrixabbau und die Kollagen denaturierung dieser Effekt auch auf die ventralen Abschnitte der BS „übergreift“. Allerdings fand sich in der 6MG für das zentrale Messlevel eine solche Signifikanz nicht.

Betrachtet man hingegen die linke Seite der untersuchten Bewegungssegmente, waren in der 6MG in keinem der Messlevel signifikante Höhenminderungen der BS nachweisbar, was den Schluß erlaubt, dass unser unilaterales Vorgehen innerhalb der ersten 24 Wochen nach der Schädigung nicht zu einer bilateralen Segmentdegeneration geführt hatte. In der 12MG war eine signifikante bilaterale Abnahme der BS-Höhe für die dorsalen und die zentralen Messlevel zu registrieren.

Diese Ergebnisse prädestinieren das hier vorgestellte Schädigungsmodell somit eher für Untersuchungen regenerativer bzw. systemischer Behandlungsansätze (Hydrogel-, Regeneratinjektionen in die BS) als für die Prüfung beispielsweise von Fixateur interne-Systemen oder BS-Prothesen.

Obwohl die Änderung der BS-Höhe durch unser Schädigungsmodell wie oben beschrieben signifikant war, kann diskutiert werden, die Bewertung der eingetretenen Degeneration auf die Beurteilung weiterer Parameter auszuweiten. Dies könnte vor allem Bedeutung gewinnen, wenn anhand des Schädigungsansatzes Effekte operativer Therapiemassnahmen studiert werden sollen. Unsere Ergebnisse weisen indes das hier vorgestellte Schädigungsmodell als geeigneten Ansatz zur Prüfung regeneratbasierter Therapiemodelle aus.

4.3.2 Bewertung der CT-morphologischen Veränderungen in den Bewegungssegmenten

Zusätzlich zur Bewertung der BS-Höhe wurde anhand der Micro-CT das Vorhandensein degenerativer Veränderungen an den Bewegungssegmenten (Spondylophyten, Alterationen an den Wirbelkörperendplatten) geprüft. Die Untersuchungen wurden im sagittalen und coronaren Strahlengang vorgenommen. Die Bewertung der BS im sagittalen Strahlengang erlaubte neben der Beurteilung der BS-Höhe auch die Dokumentation ventraler und dorsaler Spondylophytenbildungen.

Während in der 6MG nur bei einem Tier (11,1%) in den Nativegmenten sagittal pathomorphologische Veränderungen dargestellt wurden, war dies bei 6 Tieren (66,6%) in den geschädigten Segmenten der Fall. Diese Verteilung bestätigte sich in der 12MG. In dieser Gruppe wurden bei keinem Tier in den Nativegmenten Änderungen gesehen, dem gegenüber waren bei 4 Tieren (44,4%) in den geschädigten Segmenten pathomorphologische Veränderungen abbildbar. Die Wertung dieser Zahlen lässt den Schluss zu, dass sich durch unseren Schädigungsansatz infolge der verminderten Pufferfunktion der BS eine zunehmende Instabilität in den Bewegungssegmenten entwickelt hatte, die ihrerseits dann zur Spondylophytenbildung führte.

Hierbei ermöglicht die bilaterale Betrachtung der Bewegungssegmente außerdem eine quantitative Bewertung unseres Schädigungsansatzes. Betrachtet man dezidiert die geschädigten Bewegungssegmente in der coronaren Rekonstruktionsebene wird ein Seitenvergleich rechts (Schädigungsseite)/links (ungeschädigte Seite) möglich. In der 6MG sind bei 3 der 9 Versuchstiere (33,3%) auf der ungeschädigten Seite, jedoch bei 7 Tieren (77,7%) auf der Schädigungsseite pathomorphologische Veränderungen nachzuweisen. In der 12MG wurden bei keinem der Tiere in den linken Abschnitten der Bewegungssegmente entsprechende Degenerationen gesehen; auf der Schädigungsseite dagegen bei 7 von 9 Versuchstieren (77,7%). Wir schlussfolgern daraus, dass sich bei einer unilateralen Schädigung der BS auf der nicht geschädigten Seite zwar qualitativ ähnliche Effekte wie auf der Schädigungsseite entwickeln

können, diese Effekte auf der Schädigungsseite jedoch häufiger und früher auftreten und deutlicher ausgeprägt sind. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass infolge der seitendifferent abnehmenden BS-Höhe (vergleiche Kapitel 3.2 und 4.3.1) die KE auf der Schädigungsseite stärker alteriert wird als auf der Gegenseite. Auf der Schädigungsseite scheinen sich sowohl die Instabilität als auch die gestörte Nutrition der BS an der Schnittstelle zur KE gravierender auszuwirken. Somit muss unterstellt werden, dass die gestörte Kinematik im geschädigten Bewegungssegment über die unphysiologische Kraftverteilung die KE seitendifferent alteriert und dadurch die Spondylophytenbildung nach sich zieht. Diese Einschätzung wird in der Literatur bestätigt [196].

4.3.3 Bewertung der OP-Zeiten

In der Literatur finden sich unabhängig von der Beschreibung des Schädigungsmodelles kaum Angaben zu den Operationszeiten. Die Vergleichbarkeit der absoluten Operationsdauern ist außerdem auf Grund differenter Schädigungsansätze und der unterschiedlichen Anzahl geschädigter BS nur bedingt möglich [159]. Die Arbeitsgruppe Oehme et al. [169] gibt eine durchschnittliche Versuchsdauer von 60 Minuten für den lateralen Zugang zu den Segmenten BWK 12 - LWK 1 bis LWK 6 an. Diese Zeitangabe bezieht sich ausschließlich auf die Präparation der WS.

Die Dauer der hier vorgestellten Schädigung betrug im Mittel 15,9 (11,2-20,6) Minuten. In Einzelfällen wurde die Eingriffsdauer beispielsweise durch die erschwerte Punktierbarkeit eines BS-Faches deutlich verlängert. Bei einem Tier war die Penetration des ursprünglich geplanten BS-Faches (LWK 1 - LWK 2) nicht möglich, so dass wir gezwungen waren, die Belegung der BS-Fächer ein Bewegungssegment nach kaudal zu versetzen. Die bei diesem Tier wiederholt frustriert durchgeführten Punktionsversuche führten nicht zu einem sensomotorischen Defizit; das Tier konnte wie geplant in die Datenerhebung eingeschlossen werden. Die Eingriffszeiten waren in der 12MG (Versuchsgruppe 2) mit einem Median für die Punktion von 19 Minuten (Mittelwert 20,6 Minuten) der BS am längsten. In dieser Gruppe war bei einem Schaf (Nr. 69117) die Punktion des Bewegungssegmentes LWK 1 - LWK 2 nicht möglich, so dass bei diesem Tier allein die Dauer der Punktion das Doppelte des Mittelwertes in dieser Gruppe betrug (41 Minuten). Eine weitere mögliche Erklärung ist die relativ kleine Anzahl der Versuchstiere und die Tatsache, dass auf Grund logistischer Belange pro Serie an einem Tag maximal 6 Tiere operiert werden konnten, so dass der Effekt einer Lernkurve nicht so ausgeprägt war.

4.4 Ausblick

Das Versuchsdesign wurde entwickelt, um ein prospektiv randomisiertes und mit einer integrierten Kontrolle durchzuführendes Schädigungsmodell zu etablieren. Dabei können histologische und ggf. mechanische Untersuchungen der behandelten BS und der angrenzenden, zur Stabilität und Funktionalität der Wirbelsäule zugehörigen Elemente wie die begrenzenden WK und die Facettengelenke im Mittelpunkt der Untersuchungen stehen. Grundlegender Studienansatz könnte hier die Wiederherstellung von degradiertem Bandscheibenkerngewebe in den lumbalen BS der Versuchstiere sein.

Die sich entwickelnde Schädigung der BS, wie sie in der humanen BS durch einen BS-Vorfall entstehen würde, könnte über ein hydrogelbasiertes Zellimplantatsystem bezüglich der mechanischen Langzeitstabilität sowie der Gewebeintegrität in der BS überprüft werden. Diese Injektate zeichnen sich im Besonderen dadurch aus, dass sich erst bei Körpertemperatur eine mechanisch stabile Gelphase ausbildet. Dabei wäre die minimalinvasive Applikationsmöglichkeit der Hydrogele als Matrix der Regenerate von großem Vorteil und könnte es ermöglichen, die Hydrogele ähnlich des hier vorgestellten Zuganges in das BS-Fach zu injizieren. Wegen der geringen Belastung der Versuchstiere durch die Schädigung könnte wiederum eine Nativkontrolle in einem Tier etabliert werden, so dass eine mögliche verringerte Regenerationsfähigkeit des Tieres erkannt werden könnte.

4.5 Zusammenfassung

Das vorgestellte Projekt beschreibt die mögliche Induktion der BS-Degeneration durch die minimalinvasive mechanische Schädigung der ovinen BS. Hierzu wurde ein Versuchsdesign (minimalinvasives Zugehen auf die BS ohne ausgedehnte Präparation des paraspinalen Weichgewebes, Schädigung des AF über einen dorsolateralen Zugang) entwickelt, mit welchem das Schädigungsmuster hinsichtlich der Wechselwirkungen auf radiologischer Ebene (Mikro-Computertomographie der Bewegungssegmente) und morphologischer Ebene (Sichtprüfungen der Bewegungssegmente in der Mikro-CT) evaluiert wurde. Das Eintreten eines Schädigungseffektes setzte die vollständige Penetration des AF voraus.

Es wurde nachgewiesen, dass durch die gedeckte Vorgehensweise reproduzierbar eine BS-Schädigung möglich war. Die Beurteilung des Schädigungseffektes durch die Bestimmung der BS-Höhe stellte hierzu einen geeigneten Marker dar. Die induzierte Reduktion der BS-Höhe als

Marker degenerativer Veränderungen in den auf solche Art geschädigten Bewegungssegmenten war wie oben beschrieben signifikant.

Das Vorgehen war für die Versuchstiere wenig belastend, ressourcenschonend und schnell durchzuführen, erforderte jedoch eine umfangreiche Vorausplanung der Schädigungs-OP i. S. eines Vorversuchs.

Thesen

1. Die perkutane minivalinvasive Schädigung der Bandscheibe kann reproduzierbar zu einer Bandscheibendegeneration führen, sofern unabhängig von der Länge des Zugangskorridors der Anulus fibrosus komplett penetriert werden kann.
2. Die Bandscheibenhöhe ist ein geeigneter Marker der Bandscheibendegeneration.
3. Bei einer unilateralen Schädigung der Bandscheibe entwickelt sich die induzierte Degeneration auf der Schädigungsseite deutlicher als auf der nicht geschädigten Seite der Bandscheibe.
4. Die hervorgerufene Degeneration der Bandscheibe nimmt quantitativ mit zunehmender Standzeit der Tiere nach der Schädigungsoperation zu.
5. Die ovine Wirbelsäule ist ein valides Modell zur Testung von Behandlungsverfahren degenerativer Wirbelsäulenveränderungen.

5. Literaturverzeichnis

1. Cheung KM, Karppinen J, Chan D, Ho DW, Song YQ, Sham P, Cheah KS, Leong JC, Luk KD. Prevalence and pattern of lumbar magnetic resonance imaging changes in a population study of one thousand forty-three individuals. *Spine* 2009; 34: 934-40.
2. Krämer J. Bandscheibenbedingte Erkrankungen. Georg Thieme Verlag Stuttgart, 1997.
3. Klauber J, Geraedts M, Friedrich J, Wasem J. Krankenhaus-Report 2013 Mengendynamik: mehr Menge, mehr Nutzen? Schattauer Verlag, Stuttgart, 2013.
4. Katz JN. Lumbar disc disorders and low-back pain: socioeconomic factors and consequences. *The Journal of Bone & Joint Surgery* 2006; 88: 21-24.
5. Luo X, Pietrobon R, Sun SX, Liu GG, Hey L. Estimates and patterns of direct health care expenditures among individuals with back pain in the United States. *Spine* 2004; 29: 79-86.
6. Bundesärztekammer (BÄK), Kassenärztliche Bundesvereinigung (KBV) Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF). Nationale VersorgungsLeitlinie Kreuzschmerz – Kurzfassung. Version 4. 2010 zuletzt verändert: August 2013.
7. Siemionov K, An H, Masuda K, Andersson G, Cs-Szabo G. The Effects of Age, Gender, Ethnicity, and Spinal Level on the Rate of Intervertebral Disc Degeneration. A review of 1712 Intervertebral Discs. *Spine* 2011; 36: 1333-9.
8. Hughes SPF, Freemont AJ, Hukins DWL, Roberts S. The pathogenesis of degeneration of the intervertebral disc and emerging therapies in the management of back pain. *J Bone Joint Surg* 2012; 94: 1298-304.
9. Szpalski M, Gunzburg R. Lumbar spinal stenosis in the elderly: an overview. *Eur Spine J* 2003; 12: 170-5.
10. Junghanns H, Schmorl G. Die gesunde und die kranke Wirbelsäule in Röntgenbild und Klinik. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1968.
11. O'Sullivan P. Diagnosis and classification of chronic low back pain disorders: maladaptive movement and motor control impairments as underlying mechanism. *Manual Ther* 2005; 10: 242-55.
12. Whatley BR, Wen X. Intervertebral disc (IVD): Structure, degeneration, repair and regeneration. *Materials Science and Engineering C* 2012; 32: 61-77.
13. Adams MA, Roughley PJ. What is intervertebral disc degeneration, and what causes it? *Spine* 2006; 31: 2151–61.

14. Roughley P, Hoemann C, DesRosiers E, Mwale F, Antoniou J, Alini M. The potential of chitosan-based gels containing intervertebral disc cells for nucleus pulposus supplementation. *Biomaterials* 2006; 27: 388-96.
15. Coventry MB, Ghormley RK, Kernohan JW. The intervertebral disc: its microscopic anatomy and pathology. Part I. Anatomy, development and physiology. *J Bone Joint Surg. Am* 1945; 27: 105-12.
16. Silva-Correia J, Correia SI, Oliveira JM, Reis RL. Tissue engineering strategies applied in the regeneration of the human intervertebral disk. *Biotech Adv* 2013; 31: 1514-31.
17. Battié MC, Videman T. Lumbar disc degeneration: epidemiology and genetics. *J Bone Joint Surg. Am* 2006; 88: 3-9.
18. Rodriguez AG, Rodriguez-Soto AE, Burghardt AJ, Berven S, Majumdar S, Lotz JC. Morphology of the human vertebral endplate. *J Orthop Res* 2012; 30: 280-7.
19. Pope MH, Wilder DG, Magnusson ML. A review of studies on seated whole body vibration and low back pain. *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers. Part H, Journal of engineering in medicine* 1999; 213: 435-46.
20. Panjabi MM, Andersson GB, Jorneus L, Hult E, Mattsson L. In vivo measurements of spinal column vibrations. *J Bone Joint Surg. Am* 1986; 68: 695-702.
21. Diamant B, Karlsson J, Nachemson A. Correlation between lactate levels and pH in discs of patients with lumbar rhizopathies. *Experientia* 1968; 24: 1195-96.
22. Bibby SRS, Urban JPG. Effect of nutrient deprivation on the viability of intervertebral disc cells. *Eur Spine J* 2004; 13: 695–701.
23. Holm S, Maroudas A, Urban JP, Selstam G, Nachemson A: Nutrition of the intervertebral disc: solute transport and metabolism. *Connect Tissue Res* 1981; 8: 101-19.
24. Le Maitre CL, Hoyland JA, Freemont AJ. Catabolic cytokine expression in degenerate and herniated human intervertebral discs: IL-1 beta and TNFalpha expression profile. *Arthritis Res Ther* 2007; 9: 1-11.
25. Alpantaki K, Katonis P, Hadjipavlou AG, Spandidos DA, Sourvinos G. Herpes virus infection can cause intervertebral disc degeneration. *J Bone Joint Surg* 2011; 93:1253-58.
26. Buckwalter JA. Aging and degeneration of the human intervertebral disc. *Spine* 1995; 20: 1307-14.
27. Zhao C-Q, Wang L-M, Jiang L-S, Dai L-Y. The cell biology of intervertebral disc aging and degeneration. *Ageing Res Rev* 2007; 6: 247–61.
28. Freemont AJ. The cellular pathobiology of the degenerate intervertebral disc and discogenic back pain. *Rheumatology* 2009; 48: 5-10.

29. Kretschmer H. Bandscheibenleiden: Diagnose und Therapie. Springer Verlag Berlin Heidelberg, 1989.
30. Thomé C, Börm W, Meyer F. Die degenerative lumbale Spinalkanalstenose. Deutsches Ärzteblatt 2008; 105: 373–9.
31. Porter RW. Spinal stenosis and neurogenic claudication. Spine 1996; 21: 2046–52.
32. AWMF-Leitlinie: Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Neurochirurgie. Lumbale Spinalkanalstenose 2005. (<http://www.uni-duesseldorf.de/awmf/ll-na/008-022.htm>)
33. Ivanov I, Milenković Z, Stefanović I, Babić M. Lumbar spinal stenosis. Symptomatology and methods of treatment. Srpski Arhiv za Celokupno Lekarstvo 1998; 126: 450-6.
34. Saito J, Ohtori S, Kishida S, Nakamura J, Takeshita M, Shigemura T, Takazawa M, Eguchi Y, Inoue G, Orita S, Takaso M, Ochiai N, Kuniyoshi K, Aoki Y, Ishikawa T, Arai G, Miyagi M, Kamoda H, Suzuki M, Sakuma Y, Oikawa Y, Kubota G, Inage K, Sainoh T, Yamauchi K, Toyone T, Takahashi K. Difficulty of diagnosing the origin of lower leg pain in patients with both lumbar spinal stenosis and hip joint osteoarthritis. Spine 2012; 37: 2089-93.
35. Masuda K, Lotz JC. New challenges for intervertebral disc treatment using regenerative medicine. Tissue eng 2010; 16: 147-58.
36. Alini M, Eisenstein SM, Ito K, Little C, Kettler A, Masuda K, Melrose J, Ralphs J, Stokes I, Wilke HJ. Are animal models useful for studying human disc disorders/degeneration? Eur Spine J 2008; 17: 2-19.
37. Sheng SR, Wang XY, Xu HZ, Zhu GQ, Zhou YF. Anatomy of large animal spines and its comparison to the human spine: a systematic review. Eur Spine J 2010; 19: 46-56.
38. Töndury G, Tillmann B. Rumpf. In: Leonhardt H, Tillmann B, Töndury G, Zilles K: Anatomie des Menschen Rauber A, Kopsch F. Band 1. Bewegungsapparat. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1987: 179-233.
39. Von Lanz T, Wachsmuth W. Praktische Anatomie, 2. Band, 7. Teil: Rücken. Hrsg. Rickenbacher, Theiler, Siegfried, Landolt, Scheier, Wagenhäuser. Springer Berlin, Heidelberg, New York, 1982.
40. Broberg KB. On the mechanical behaviour of intervertebral discs. Spine 1983; 8: 151-65.
41. Niedner F. Zur Kenntnis der normalen und pathologischen Anatomie der Wirbelkörperendleiste. Fortschr Rhöntgenstr 1932; 46: 628-62.

42. Abouhossein A, Weisse B, Ferguson SJ. A multibody modelling approach to determine load sharing between passive elements of the lumbar spine. *Comput Methods Biomech Biomed Engin* 2011; 14: 527-37.
43. Wintermantel E, Ha SW. *Medizintechnik mit biokompatiblen Werkstoffen und Verfahren*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York, 2002.
44. Shankar H, Scarlett JA, Abram SE. Anatomy and pathophysiology of intervertebral disc disease. *Tech Reg Anaesth Pain Manag* 2009; 13: 67-75.
45. Pooni JS, Hukins DW, Harris PF, Hilton RC, Davies KE. Comparison of the structure of human intervertebral discs in the cervical, thoracic and lumbar regions of the spine. *Surg Radiol Anat* 1986; 8: 175-82.
46. Moore RJ. The vertebral endplate: disc degeneration, disc regeneration. *Spine* 2006; 15: 333-37.
47. Yao H, Gu WY. Physical signals and solute transport in human intervertebral disc during compressive stress relaxation: 3D finite element analysis. *Biorheology* 2006; 43: 323-35.
48. Yao H, Justiz MA, Flagler D, Gu WY. Effects of swelling pressure and hydraulic permeability on dynamic compressive behavior of lumbar annulus fibrosus. *Ann biom eng* 2002; 30: 1234-41.
49. Maroudas A, Stockwell RA, Nachemson A, Urban J. Factors involved in the nutrition of the human lumbar intervertebral disc: cellularity and diffusion of glucose in vitro. *J Anat* 1975; 120: 113-30.
50. Cassinelli E, Kang J. Current understanding of lumbar disc degeneration. *Operative Techniques in Orthopaedics* 2000; 10: 254-62.
51. Trout JJ, Buckwalter JA, Moore KC. Ultrastructure of the human intervertebral disc: II. Cells of the nucleus pulposus. *Anat Rec* 1982; 204: 307-14.
52. Welsch U. *Lehrbuch Histologie*. In: Sobotta *Zytologie, Histologie, Mikroskopische Anatomie*. Elsevier GmbH München, Urban & Fischer Verlag, 1. Auflage, 2003.
53. Kroeber MW, Unglaub F, Wang H, Schmid C, Thomsen M, Nerlich A, Richter W. New in vivo animal model to create intervertebral disc degeneration and to investigate the effects of therapeutic strategies to stimulate disc regeneration. *Spine* 2002; 27: 2684-90.
54. Sive JI, Baird P, Jeziorski M, Watkins A, Hoyland JA, Freemont AJ. Expression of chondrocyte markers by cells of normal and degenerate intervertebral discs. *Mol Pathol* 2002; 55: 91-97.

55. Lefebvre V, Huang W, Harley VR, Goodfellow PN, de Crombrughe B. SOX9 is a potent activator of the chondrocyte-specific enhancer of the pro alpha 1 (II) collagen gen. *Moll Cell Biol* 1997; 17: 2336-46.
56. Fujita N, Miyamoto T, Imai J-i, Hosogane N, Suzuki T, Yagi M, et al. CD24 is expressed specifically in the nucleus pulposus of intervertebral discs. *Biochem Bioph Res Co* 2005; 338: 1890–6.
57. Minogue BM, Richardson SM, Zeef LAH, Freemont AJ, Hoyland JA. Characterization of the human nucleus pulposus cell phenotype and evaluation of novel marker gene expression to define adult stem cell differentiation. *Arthritis Rheum* 2010; 62: 3695-705.
58. Rutges J, Creemers LB, Dhert W, Milz S, Sakai D, Mochida J, et al. Variations in gene and protein expression in human nucleus pulposus in comparison with annulus fibrosus and cartilage cells: potential associations with aging and degeneration. *Osteoarthr Cartilage* 2010a 18: 416–23.
59. Weiler C, Nerlich A, Schaaf R, Bachmeier B, Wuertz K, Boos N. Immunohistochemical identification of notochordal markers in cells in the aging human lumbar intervertebral disc. *Eur Spine J* 2010; 19: 1761–70.
60. Cappello R, Bird JL, Pfeiffer D, Bayliss MT, Dudhia J. Notochordal cell produce and assemble extracellular matrix in a distinct manner, which may be responsible for the maintenance of healthy nucleus pulposus. *Spine* 2006; 31: 873-82.
61. Bergknut N. Intervertebral disc degeneration in Dogs. Doctoral Thesis No. 2010:91. Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science. Universiteit Utrecht.
62. Humzah MD, Soames RW. Human intervertebral disc: structure and function. *Anat Rec* 1998; 220: 337-56.
63. Fick A. Ueber Diffusion. *Poggendorffs Annalen der Physik und Chemie* 1855; 94: 59-86.
64. Richardson SM, Doyle P, Minogue BM, Gnanalingham K, Hoyland JA. Increased expression of matrix metalloproteinase-10, nerve growth factor and substance P in the painful degenerate intervertebral disc. *Arthritis Res Ther* 2009; 11: R126.
65. Malko JA, Hutton WC, Fajman WA. An in vivo MRI study of the changes in volume (and fluid content) of the lumbar intervertebral disc after overnight bed rest and during an 8-hour walking protocol. *J Spinal Disord Tech* 2002; 15: 157-63.
66. Battié MC, Videman T, Gibbons LE, Fisher LD, Manninen H, Gill K: Determinants of lumbar disc degeneration. *Spine* 1995; 20: 2601-12.

67. Battié MC, Videman T, Gibbons LE, Manninen H, Gill K, Pope M, Kaprio J. Occupational driving and lumbar disc degeneration: a case-control study. *Lancet* 2002; 360: 1369-74.
68. Kang JD, Georgescu HI, McIntyre-Larkin L, Stefanovic-Racic M, Donaldson WF, Evans CH. Herniated lumbar intervertebral discs spontaneously produce matrix metalloproteinases, nitric oxide, interleukin-6, and prostaglandin E2. *Spine* 1996; 21: 271-7.
69. Le Maitre CL, Freemont AJ, Hoyland JA. Localization of degradative enzymes and their inhibitors in the degenerate human intervertebral disc. *J Pathol* 2004; 204: 47-54.
70. Roberts S, Caterson B, Menage J, Evans EH, Jaffray DC, Eisenstein SM. Matrix metalloproteinases and aggrecanase: their role in disorders of the human intervertebral disc. *Spine* 2000; 25: 3005-13.
71. Milner JM, Elliott SF, Cawston TE. Activation of procollagenases is a key control point in cartilage collagen degradation: interaction of serine and metalloproteinase pathways. *Arthritis Rheum* 2001; 44: 2084-96.
72. Murphy G, Cockett MI, Stephens PE, Smith BJ, Docherty AJ. Stromelysin is an activator of procollagenase. A study with natural and recombinant enzymes. *Biochem J* 1987; 248: 265-8.
73. Razaq MS. The effect of extracellular pH on cartilage tissue metabolism and turnover. Oxford: University of Oxford 2002.
74. Ruan DK, Xin H, Zhang C, Wang C, Xu C, Li C, He Q. Experimental intervertebral disc regeneration with tissue-engineered composite in a canine model. *Tissue Eng. Part A* 2010; 16: 2381-89.
75. Iatridis JC, Weidenbaum M, Setton LA, Mow VC. Is the nucleus pulposus a solid or a fluid? Mechanical behaviors of the nucleus pulposus of the human intervertebral disc. *Spine* 1996; 21: 1174-84.
76. Buckwalter JA, Roughley PJ, Rosenberg LC. Age-related changes in cartilage proteoglycans: quantitative electron microscopic studies. *Microsc Res Tech* 1994; 28: 398-408.
77. Buckwalter JA, Woo SL, Goldberg VM, Hadley EC, Booth F, Oegema TR, Eyre DR. Soft-tissue aging and musculoskeletal function. *J Bone Joint Surg Am.* 1993; 75:1533-48.
78. Ohshima H, Urban JP, Bergel DH. Effect of static load on matrix synthesis rates in the intervertebral disc measured in vitro by a new perfusion technique. *J Ortho Res* 1995; 13: 22-9.

79. Antoniou J, Steffen T, Nelson F, Winterbottom N, Hollander AP, Poole RA, Aebi M, Alini M. The human lumbar intervertebral disc: evidence for changes in the biosynthesis and denaturation of the extracellular matrix with growth, maturation, ageing and degeneration. *The Journal of clinical investigation* 1998; 98: 996-1003.
80. Antoniou J, Steffen T, Nelson F, Winterbottom N, Hollander AP, Poole RA, Aebi M, Alini M. The human lumbar intervertebral disc: evidence for changes in the biosynthesis and denaturation of the extracellular matrix with growth, maturation, ageing, and degeneration. *J Clin Invest* 1996; 98: 996-1003.
81. Rutges JPHJ, Duit RA, Kummer JA, Oner FC, van Rijen MH, Verbout AJ, et al. Hypertrophic differentiation and calcification during intervertebral disc degeneration. *Osteoarthr Cartilage* 2010b; 18: 1487–95.
82. Modic MT, Steinberg PM, Ross JS, Masaryk TJ, Carter JR. Degenerative disc disease: assessment of changes in vertebral body marrow with MR imaging. *Radiology* 1988; 166: 193-9.
83. Brown MF, Hukkanen MV, Mc Carthy ID. Sensory and sympathetic innervation of the vertebral endplate in patients with degenerative disc disease. *J Bone Joint Surg* 1997; 79-B: 147-53.
84. Le Maitre C, Freemont AJ, Hoyland JA. The role of interleukin-1 in the pathogenesis of human intervertebral disc degeneration. *Arthr Res Ther* 2005; 7: 732-75.
85. Asthon IK, Roberts S, Jaffray DC, Polak JM, Eisenstein SM. Neuropeptides in the human intervertebral disc. *J Orthop Res* 1994; 12: 186-92.
86. Nachemson, A. The load on lumbar disks in different positions of the body. *Clin Orthop Relat Res* 1966; 45: 107-22.
87. Wilke HJ, Neef P, Caimi M, Hoogland T, Claes LE. New in vivo measurements of pressure in the intervertebral disc in daily life. *Spine* 1999; 24: 755-62.
88. Nachemson A, Morris JM. In vivo measurements of intradiscal pressure. Discometry, a method for the determination of pressure in the lower lumbar discs. *J Bone Joint Surg* 1964; 46: 1077-92.
89. Reuber M, Schultz A, Denis F, Spencer D. Bulging of lumbar intervertebral disc. *J Biomech Eng* 1982; 104: 187-92.
90. Gudavalli MR, Triano JJ. An analytical model of lumbar motion segment in flexion. *Journal of Manipulative Physiol Ther* 1999; 22: 201-8.
91. Rovira M, Romero F, Ibarra B, Torrent O. Prolapsed lumbar disk: value of CT in diagnosis. *Am J Neuroradiol* 1983; 4: 593-4.

92. Hodge JC, Ghelman B, Schneider R, Rappoport LH, O'Leary PF, Cammisa FP Jr. Recurrent disk versus scar in the postoperative patient: the role of computed tomography (CT)/diskography and CT/myelography. *J Spinal Disord* 1994; 7: 470-7.
93. Pfirrmann CW, Metzdorf A, Zanetti M, Hodler J, Boos N. Magnetic resonance classification of lumbar intervertebral disc degeneration. *Spine* 2001; 26: 1873-78.
94. Carragee E, Alamin T, Cheng I, Franklin T, van den Haak E, Hurwitz E. Are first-time episodes of serious LBP associated with new MRI findings? *Spine J* 2006; 6: 624-35.
95. Jensen MC, Brant-Zawadzki MN, Obuchowski N, Modic MT, Malkasian D, Ross JS. Magnetic resonance imaging of the lumbar spine in people without back pain. *New Eng J Med* 1994; 331: 69-73.
96. Watanabe A, Benneker LM, Boesch C, Watanabe T, Obata T, Anderson SE. Classification of intervertebral disk degeneration with axial T2 mapping. *AJR* 2007; 189: 936-42.
97. Thompson JP, Pearce RH, Schechter MT, Adams ME, Tsang IK, Bishop PB. Preliminary evaluation of a scheme for grading the gross morphology of human intervertebral disc. *Spine* 1990; 15: 411-5.
98. Boos N, Weissbach S, Rohrbach H, Weiler C, Spratt KF, Nerlich A. Classification of age-related changes in lumbar intervertebral discs. *Spine* 2002; 27: 2631-44.
99. Koes BW, van Tulder M, Ostelo R. Clinical guidelines for the management of low back pain in primary care: an international comparison. *Spine* 2001; 26: 2504-13.
100. Graziotti PJ, Goucke CR. The use of oral opioids in patients with chronic non-cancer pain. Management strategies. *The Medical Journal of Australia* 1997; 167: 30-4.
101. Don AS, Carragee E. A brief overview of evidence-informed management of chronic low back pain with surgery. *Spine J* 2008; 8: 258-65.
102. Hanley EN, Phillips ED, Kostulik JP. Who should be fused? In: Frymoyer JW: *The adult spine: Principles and practice*. Lippincott Williams and Wilkins, 1991, 1873-917.
103. Meyers K, Tauber M, Sudin Y, Fleischer S, Arnin U, Girardi F, et al. Use of instrumented pedicle screws to evaluate load sharing in posterior dynamic stabilization systems. *Spine J* 2008; 8: 926-32.
104. Zucherman JF, Hsu KY, Hartjen CA, Mehalic TF, Implicito DA, Martin MJ, et al: A multicenter, prospective, randomized trial evaluating the X STOP interspinous process decompression system for the treatment of neurogenic intermittent claudication: two-year follow-up results. *Spine* 2006; 30: 1351-8.
105. Mahomed A, Moghadas PM, Shepherd DE. Effect of axial load on the flexural properties of an elastomeric total disc replacement. *Spine* 2012; 37: 908-12.

106. Schizas C, Kulik G, Kosmopoulos V. Disc degeneration: current surgical options. *Eur Cells Mater* 2010; 20: 306-15.
107. Haid RW Jr., Branch CL Jr., Alexander JT, Burkus JK. Posterior lumbar interbody fusion using recombinant human bone morphogenetic protein type 2 with cylindrical interbody cages. *Spine J* 2004; 4: 527-38.
108. Cloward RB. The treatment of ruptured lumbar intervertebral discs by vertebral body fusion. I. Indications, operative technique, after care. *J Neurosurg* 1953; 10: 154-68.
109. Schimmel JJ, Poeschmann MS, Horsting PP, Schonfeld DH, van Limbeek J, Pavlov PW. PEEK cages in lumbar fusion: mid-term clinical outcome and radiological fusion. *J Spinal Disord Techn* 2012. <http://dx.doi.org/10.1097/BSD.0b013e31826eaf74>. [ahead of print].
110. Gloria A, Manto L, De Santis R, Ambrosio L. Biomechanical behavior of a novel composite intervertebral body fusion device. *J Appl Biomater Biomech* 2008; 6: 163–9.
111. Meisel HJ, Schnoring M, Hohaus C, Minkus Y, Beier A, Ganey T, et al. Posterior lumbar interbody fusion using rhBMP-2. *Eur Spine J* 2008; 17: 1735-44.
112. Boden SD, Kangckha PJ, Sandhu H, Heller JG. Use of recombinant human bone morphogenetic protein-2 to achieve posterolateral lumbar spine fusion in humans: a prospective, randomized clinical pilot trial: 2002 Volvo Award in clinical studies. *Spine* 2002; 27: 2662-73.
113. Gillet P. The fate of the adjacent motion segments after lumbar fusion. *J Spinal Disord Techn* 2003; 16: 338-45.
114. Gorenssek M, Joksimovic C, Kregar-Velikonja N et al. Nucleus pulposus repair with cultured autologous elastic cartilage derived chondrocytes. *Cell Mol Biol Lett* 2004; 9: 363-73.
115. Freemont J, LeMaitre C, Watkins A, Hoyland JA. Degeneration of intervertebral discs: current understanding of cellular and molecular events, and implications for novel therapies. *Mol Med* 2001; 3: 1-10.
116. Ganey T, Libera J, Moos V et al. Disc chondrocyte transplantation in a canine model: a treatment for degenerated or damaged intervertebral disc. *Spine* 2003; 28: 2609-20.
117. Crevensten C, Walsh AJL, Ananthakrishnan D et al. Intervertebral disc cell therapy for regeneration: mesenchymal stem cell implantation in rat intervertebral discs. *Ann Biomed Eng* 2004; 32: 430–4.

118. Geisler FH, Blumenthal SL, Guyer RD, McAfee PC, Regan JJ, Johnson JP, Mullin B: Neurological complications of lumbar artificial disc replacement and comparison of clinical results with those related to lumbar arthrodesis in the literature: results of a multicenter, prospective, randomized investigational device exemption study of Charité intervertebral disc. Invited submission from the Joint Section Meeting on Disorders of the Spine and Peripheral Nerves, March 2004. *J Neurosurg, Spine* 2004; 1: 143-54.
119. An HS, Takegami K, Kamada H, Nguyen CM, Thonar EJ, Singh K, Andersson GB, Masuda K. Intradiscal administration of osteogenic protein-1 increases intervertebral disc height and proteoglycan content in the nucleus pulposus in normal adolescent rabbits. *Spine* 2005; 30: 25-31.
120. Roughley PJ. Biology of intervertebral disc aging and degeneration: involvement of the extracellular matrix. *Spine* 2004; 29: 2691-9.
121. Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, Ohlsson C, Isaksson O, Peterson L. Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *New Eng J Med* 1994; 331: 889-95.
122. Wolff E. Vor 50 Jahren: Paul Niehans bringt den Begriff „Zellulärtherapie“ in die Öffentlichkeit. *Schweizerische Ärztezeitung* 2002; 83: 1726–7.
123. Friedenstein AJ, Petrakova KV, Kurolesova AI, Frolova GP. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation* 1968; 6: 230–47.
124. Ganey T, Meisel HJ. A potential role for cell-based therapeutics in the treatment of intervertebral disc herniation. *Eur Spine J* 2002; 11: 206–14.
125. Okuma M, Mochida J, Nishimura K, Sakabe K, Seiki K. Reinsertion of stimulated nucleus pulposus cells retards intervertebral disc degeneration: an in vitro and in vivo experimental study. *J Orthop Res* 2000; 18: 988-97.
126. Iwashina T, Mochida J, Sakai D, Yamamoto Y, Miyazaki T, Ando K, Hotta T. Feasibility of using a human nucleus pulposus cell line as a cell source in cell transplantation therapy for intervertebral disc degeneration. *Spine* 2006; 31: 1177-86.
127. Sobajima S, Vadalà G, Shimer A, Kim JS, Gilbertson LG, Kang JD. Feasibility of a stem cell therapy for intervertebral disc degeneration. *Spine J* 2008; 8: 888-96.
128. Leung VY, Chan D, Cheung KM. Regeneration of intervertebral disc by mesenchymal stem cells: potentials, limitations, and future direction. *Eur Spine J* 2006; 15: 406-13.

129. Gimble J, Guilak F. Adipose-derived adult stem cells: isolation, characterization, and differentiation potential. *Cytotherapy* 2003; 5: 362–9.
130. Friedenstein A. Stromal-hematopoietic interrelationships: Maximov's ideas and modern models. *Haematology and Blood Transfusion* 1989; 32: 159–67.
131. Feng G, Yang X, Shang H, Marks IW, Shen FH, Katz A, et al. Multipotential differentiation of human annulus fibrosus cells: an in vitro study. *J Bone Joint Surg. Am.* 2010; 92: 675-85.
132. Sakai D. Stem cell regeneration of the intervertebral disk. *Orthop Clin North Am* 2011; 42: 555-62.
133. Pountos I, Jones E, Tzioupis C et al. Growing bone and cartilage: the role of mesenchymal stem cells. *J Bone Joint Surg. Br* 2006; 88: 421–6.
134. Tögel F, Lange C, Zander AR, Westenfelder C. Regenerative Medizin mit adulten Stammzellen aus dem Knochenmark. *DÄ* 2007; 104: 1663-70.
135. Gronthos S, Franklin DM, Leddy HA, Robey PG, Storms RW, Gimble JM. Surface protein characterization of human adipose tissue-derived stromal cells. *J Cell Physiol* 2001; 189: 54-63.
136. Risbud MV, Guttapalli A, Tsai TT, Lee JY, Danielson KG, Vaccaro AR, et al. Evidence for skeletal progenitor cells in the degenerate human intervertebral disc. *Spine* 2007; 32: 2537-44.
137. Blanco JF, Graciani IF, Sanchez-Guijo FM, Muntion S, Hernandez-Campo P, Santamaria C, et al. Isolation and characterization of mesenchymal stromal cells from human degenerated nucleus pulposus: comparison with bone marrow mesenchymal stromal cells from the same subjects. *Spine* 2010; 35: 2259-65.
138. Ryan JM, Barry FP, Murphy JM et al. Mesenchymal stem cells avoid allogeneic rejection. *J Inflamm London* 2005; 2: 8.
139. Risbud MV, Albert TJ, Guttapalli A, Vresilovic EJ, Hillibrand AS, Vaccaro AR, Shapiro IM. Differentiation of mesenchymal stem cells towards a nucleus pulposus-like phenotype in vitro: implications for cell-based transplantation therapy. *Spine* 2004; 29: 2627-32.
140. Steck E, Bertram H, Abel R, Chen B, Winter A, Richter W. Induction of intervertebral disc-like cells from adult mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 2005; 23: 403–11.
141. Illien-Jünger S, Pattappa G, Peroglio M, Benneker LM, Stoddart MJ, Sakai D, Mochida J, Grad S, Alini M. Homing of mesenchymal stem cells in induced degenerative intervertebral discs in a whole organ culture system. *Spine* 2012; 37: 1865-73.

142. Orozco L, Soler R, Morera C, Alberca M, Sanchez A, Garcia-Sancho J. Intervertebral disc repair by autologous mesenchymal bone marrow cells: a pilot study. *Transplantation* 2011; 92: 822-8.
143. Kaigle AM, Holm SH, Hansson TH. 1997 Volvo Award winner in biomechanical studies. Kinematic behavior of the porcine lumbar spine: a chronic lesion model. *Spine* 1997; 22: 2796–806.
144. Fazzalari NL, Costi JJ, Hearn TC, Fraser RD, Vernon-Roberts B, Hutchinson J, Manthey BA, Parkinson IH, Sinclair C. Mechanical and pathologic consequences of induced concentric anular tears in an ovine model. *Spine* 2001; 26: 2575-81.
145. Zhang Y, Drapeau S, An HS, Markova D, Lenart BA, Anderson DG: Histological features of the degenerating intervertebral disc in a goat disc-injury model. *Spine* 2011; 36: 1519-27.
146. Meisel HJ, Siodla V, Ganey T, Minkus Y, Hutton WC, Alasevic OJ. Clinical experience in cell-based therapeutics: disc chondrocyte transplantation A treatment for degenerated or damaged intervertebral disc. *Biomol Eng* 2007; 24: 5-21.
147. Meisel HJ, Ganey T, Hutton WC, Libera J, Minkus Y, Alasevic O. Clinical experience in cell-based therapeutics: intervention and outcome. *Eur Spine J* 2006; 15: 397-405.
148. Nishida Y, Knudson CB, Kuettner KE, Knudson W. Osteogenic protein-1 promotes the synthesis and retention of extracellular matrix within bovine articular cartilage and chondrocyte cultures. *Osteoarthritis and Cartilage* 2000; 8: 127-36.
149. Imai Y, Okuma M, An HS, Nakagawa K, Yamada M, Muehleman C, Thonar E, Masuda K. Restoration of disc height loss by recombinant human osteogenic protein-1 injection into intervertebral discs undergoing degeneration induced by an intradiscal injection of chondroitinase ABC. *Spine* 2007; 32: 1197-205.
150. Masuda K, Imai Y, Okuma M, Muehleman C, Nakagawa K, Akeda K, Thonar E, Andersson G, An HS. Osteogenic protein-1 injection into a degenerated disc induces the restoration of disc height and structural changes in the rabbit anular puncture model. *Spine* 2006; 31: 742-54.
151. Wang Z, Hutton WC, Yoon ST. Bone morphogenetic protein-7 antagonizes tumor necrosis factor- α -induced activation of nuclear factor κ B and up-regulation of the ADAMTS, leading to decreased degradation of disc matrix macromolecules aggrecan and collagen II. *Spine J* 2014; 14: 505-12.

152. Bertram H, Kroeber M, Wang H, Unglaub F, Guehring T, Carstens C, Richter W. Matrix-assisted cell transfer for intervertebral disc cell therapy. *Biochem Biophys Res Comm* 2005; 331: 1185-92.
153. Hunziker EB. Articular cartilage repair: basic science and clinical progress. A review of the current status and prospects. *Osteoarthritis and Cartilage* 2001; 10: 432-63.
154. Schäfer D, Seidel J, Martin I, Jundt G, Heberer M, Grozinsky A, Vunjak-Novakovic G, Freed L. Engineering and characterization of functional osteochondral replacement tissue. *Der Orthopäde* 2004; 33: 721-6.
155. Cima LG, Vacanti JP, Vacanti C, Ingber D, Mooney D, Langer R. Tissue engineering by cell transplantation using degradable polymer substrates. *J Biomech Eng* 1991; 113: 143-51.
156. Streeter HB, Rees DA. Fibroblast adhesion to RGDS shows novel features compared with fibronectin. *J Cell Biol* 1987; 105: 507-15.
157. Hunziker EB: Biologic repair of articular cartilage - Defect models in experimental animals and matrix requirements. *Clin Orthop Relat Res* 1999; 367: 135-46.
158. Gong JP: Friction and lubrication of Hydrogels -its richness and complexity. *Soft Matter* 2006; 2: 2544-52.
159. Vadalà G, De Strobel F, Bernardini M, Denaro L, D'Avella D, Denaro V. The transpedicular approach for the study of intervertebral disc regeneration strategies: in vivo characterization. *Eur Spine J* 2013; 22: 972-8.
160. Vadalà G, Sowa G, Hubert M, Gilbertson LG, Denaro V, Kang JD. Mesenchymal stem cells injection in degenerated intervertebral disc: cell leakage may induce osteophyte formation. *J Tissue Eng Regen Med* 2012; 5: 348-55.
161. Sakai D, Mochida J, Iwashina T, Hiyama A, Omi H, Imai M, Nakai T, Ando K, Hotta T. Regenerative effects of transplanting mesenchymal stem cells embedded in atelocollagen to the degenerated intervertebral disc. *Biomaterials* 2006; 27: 335-45.
162. Wilke HJ, Heuer F, Neidlinger-Wilke C, Claes L. Is a collagen scaffold for a tissue engineered nucleus replacement capable of restoring disc height and stability in an animal model? *Eur Spine J* 2006; 15: 433-8.
163. Neidlinger-Wilke C, Würtz K, Liedert A, Schmidt C, Börm W, Ignatius A, Wilke HJ, Claes L. A three-dimensional collagen matrix as a suitable culture system for the comparison of cyclic strain and hydrostatic pressure effects on intervertebral disc cells. *J Neurosurg. Spine* 2005; 2: 457-65.

164. Halloran DO, Grad S, Stoddart M, Dockery P, Alini M, Pandit AS. An injectable cross-linked scaffold for nucleus pulposus regeneration. *Biomater* 2008; 29: 438-47.
165. Babel W. Gelatine - ein vielseitiges Biopolymer. *Chemie in unserer Zeit* 1996; 30: 86-95.
166. Ponticiello MS, Schinagl RM, Kadiyala S, Barry FP. Gelatin-based resorbable sponge as a carrier matrix for human mesenchymal stem cells in cartilage regeneration therapy. *J Biomed Mater Res* 2000; 52: 246–55.
167. Ganey T, Hutton WC, Moseley T, Hedrick M, Meisel HJ. Intervertebral disc repair using adipose tissue-derived stem and regenerative cells: experiments in a canine model. *Spine* 2009; 34: 2297-304.
168. Hiepe Th. Lehrbuch der Schafkrankheiten. Sonderausgabe der 4. Auflage, Verlag Paul Parey. 2009.
169. Oehme D, Goldschlager T, Rosenfeld J, Danks A, Ghosh P, Gibbon A, Jenkin G. Lateral surgical approach to lumbar intervertebral discs in an ovine model. *Scientific World Journal* 2012; doi:10.1100/2012/873726.
170. Guder E, Hill S, Kandziora F, Schnake KJ. Die partielle Nukleotomie der ovinen Bandscheibe als in-vivo-Modell für die Bandscheibendegeneration. *Zeitschrift für Orthopädie und Unfallchirurgie* 2009; 147: 52-8.
171. Wilke HJ. Animal models for spinal research. *Eur Spine J* 2008; 17: 1.
172. Young-Joon K. A Minimally Invasive Rabbit Model of Progressive and Reproducible Disc Degeneration Confirmed by Radiology, Gene Expression, and Histology. *J Korean Neurosurg Soc* 2013; 53: 323–30.
173. Lotz JC. Animal models of intervertebral disc degeneration: lessons learned. *Spine* 2004; 23: 2742-50.
174. Ando T, Kato F, Mimatsu K, Iwata H. Effects of chondroitinase ABC on degenerative intervertebral discs. *Clin Orthop Relat Res* 1995; 318: 214–21.
175. Hoogendoorn RJ, Helder MN, Kroeze RJ, Bank RA, Smit TH, Wuisman PI. Reproducible long-term disc degeneration in a large animal model. *Spine* 2008; 33: 949-54.
176. Sakai D, Mochida J, Yamamoto Y et al. Transplantation of mesenchymal stem cells embedded in Atelocollagen gel to the intervertebral disc: a potential therapeutic model for disc degeneration. *Biomaterials* 2003; 24: 3531–41.

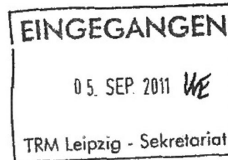
177. Guehring T, Unglaub F, Lorenz H, Omlor G, Wilke HJ, Kroeber MW. Intradiscal pressure measurements in normal discs, compressed discs and compressed discs treated with axial posterior disc distraction: an experimental study on the rabbit lumbar spine model. *Eur Spine J* 2005; 15: 597-604.
178. Elliott DM, Sarver JJ. Young investigator award winner: validation of the mouse and rat disc as mechanical models of the human lumbar disc. *Spine* 2004; 29: 713-22.
179. Nuckley DJ, Kramer PA, Del Rosario A, Fabro N, Baran S, Ching RP. Intervertebral disc degeneration in a naturally occurring primate model: radiographic and biomechanical evidence. *J Orthop Res* 2008; 26: 1283-8.
180. Urban JP, Smith S, Fairbank JC. Nutrition of the intervertebral disc. *Spine* 2004; 29: 2700-9.
181. Beckstein JC, Sen S, Schaer TP, Vresilovic EJ, Elliott DM. Comparison of animal discs used in disc research to human lumbar disc: axial compression mechanics and glycosaminoglycan content. *Spine* 2008; 33: E 166-73.
182. Wilke HJ, Kettler A, Claes LE. Are sheep spines a valid biomechanical model for human spines? *Spine* 1997; 22: 2365-74.
183. Wilke HJ, Kettler A, Wenger KH, Claes LE. Anatomy of the sheep spine and its comparison to the human spine. *Anat Rec* 1997; 247: 542-55.
184. Little J, Pearcy M, Tevelen G, Evans J, Pettet G, Adam C. The mechanical response of the ovine lumbar annulus fibrosus to uniaxial, biaxial and shear loads. *J Mech Behav Biomed Mater* 2010; 3: 146-57.
185. Wilke HJ, Jungkunz B, Wenger K, Claes L. Spinal segment range of motion as a function of in vitro test conditions: Effects of exposure period, accumulated cycles, angular-deformation rate and moisture condition. *Anat Rec* 1998; 251: 15-9.
186. Nickel R, Schummer A, Seiferle E. *Lehrbuch der Anatomie der Haustiere I*. Verlag Paul Parey, Berlin und Hamburg, 1984.
187. Magged M, Berner D, Jülke H, Hohaus C, Brehm W, Gerlach K. Is sheep lumbar spine a suitable alternative model for human spinal researches? Morphometrical comparison study. *Lab Anim Res* 2013; 29: 183-9.
188. Reid JE, Meakin JR, Robins SP, Skakle JM, Hukins DW. Sheep lumbar intervertebral discs as models for human discs. *Clinic Biomech* 2002; 17: 312-4.
189. Osti OL, Vernon-Roberts B, Fraser RD. 1990 Volvo Award in experimental studies. Annulus tears and intervertebral disc degeneration. An experimental study using an animal model. *Spine* 1990; 15: 762-7.

190. Melrose J, Ghosh P, Taylor TKF, Vernon-Roberts B, Latham J, Moore R. Elevated synthesis of biglycan and decorin in an ovine annular lesion model of experimental disc degeneration. *Eur Spine J* 1997; 6: 376-84.
191. Thompson RE, Pearcy MJ, Barker TM. The mechanical effects of intervertebral disc lesions. *Clin Biomechanics* 2004; 19: 448–55.
192. Panjabi M, Dvorak J, Duranceau J, Yamamoto I, Gerber M, Rauschnig W, Bueff HU. Three-dimensional movements of the upper cervical spine. *Spine* 1988; 13: 1129-34.
193. Melrose J, Shu C, Young C, Ho R, Smith MM, Young AA, Smith SS, Gooden B, Dart A, Podadera J, Appleyard RC, Little CB. Mechanical destabilization induced by controlled annular incision of the intervertebral disc dysregulates metalloproteinase expression and induces disc degeneration. *Spine* 2012; 37: 18-25.
194. Baramki HG, Papin P, Steffen T. A surgical approach to the ventral aspect of the lumbar vertebrae in the sheep model. *Surg Radiol Anat* 2000; 22: 25-7.
195. Lappalainen A, Kääpä E, Lamminen A, Laitinen OM, Grönblad M. The diagnostic value of contrast-enhanced magnetic resonance imaging in the detection of experimentally induced anular tears in sheep. *Spine* 2002; 27: 2806-10.
196. Kurowski P, Kubo A. The relationship of degeneration of the intervertebral disc to mechanical loading conditions on lumbar vertebrae. *Spine* 1986; 11: 726-31.

6. Anlagen

6.1 Votum der Ethikkommission

LANDESDIREKTION
LEIPZIG



LANDESDIREKTION LEIPZIG
Postfach 10 13 64 | 04013 Leipzig

Universität Leipzig
TRM Leipzig
Frau Dr. Henriette Jülke
Philipp-Rosenthal-Straße 55
04103 Leipzig

Ihr/-e Ansprechpartner/-in
Vera Koch

Durchwahl
Telefon 0341 977-2440
Telefax 0341 977-1199

Vera.Koch@
ldi.sachsen.de*

nachrichtlich per E-Mail: Frau Dr. Hirrlinger,
Herr Dr. Möbius,
zuständige Tierschutzbeauftragte

Ihre Nachricht vom

Geschäftszeichen
(bitte bei Antwort angeben)
24-9168.11/14/30

Leipzig,
1. September 2011

Antrag auf Genehmigung eines Versuchsvorhabens gemäß § 8 Tierschutzgesetz

hier: TVV 30/11

Ihr Antrag vom 31. Mai 2011

Ihre Änderungsanzeige vom 18. August 2011

Sehr geehrte Frau Dr. Jülke,

zu dem von Ihnen mit o. g. Schreiben beantragten Tierversuchsvorhaben

Bandscheibenreparatur durch dreidimensional einstellbare, injizierbare Nano -Trägermaterialien und regenerationsfähige Zellen - TVV 30/11

ergeht vorbehaltlich des jederzeitigen Widerrufs folgender

Bescheid

1. Der Antrag (Reg.-Nr.: TVV 30/11) wird genehmigt.
2. Die Genehmigung ist gültig ab sofort bis zum **15. September 2014**
3. Ort der Durchführung Veterinärmedizinische Fakultät
der Universität Leipzig
Chirurgische Tierklinik
An den Tierkliniken 21
04109 Leipzig
4. Orte der Tierhaltung: a.) Veterinärmedizinische Fakultät
der Universität Leipzig
Chirurgische Tierklinik

Hausanschrift:
Landesdirektion Leipzig
Braustraße 2
04107 Leipzig

www.sachsen.de

Öffnungszeiten:
Mo.-Do.: 7.30-17.00 Uhr
Fr.: 7.30-15.00 Uhr

Bankverbindung:
Ostsächsische Sparkasse
Dresden
Konto-Nr. 315 301 137 0
BLZ 850 503 00
IBAN DE 82 8505 0300 3153
0113 70
BIC OSDD DE 81

Verkehrsmittel:
Zu erreichen mit der Buslinie 89

Für Besucher mit Behinderungen
befindet sich ein gekennzeichnete-
r Parkplatz in der Braustraße

*Kein Zugang für elektronisch signierte
sowie für verschlüsselte elektronische
Dokumente

Seite 1 von 4

An den Tierkliniken 21
04109 Leipzig

b.) Schäferei Otto Schölz
Pissen Nr. 17
06237 Leuna

5. genehmigte Tierzahl: 27 Schafe

6. Leiter und stellvertretender Leiter des Versuchsvorhabens:
Frau Dr. med. vet. Henriette Jülke
Herr Prof. Dr. med. Walter Brehm

6. Die im Antrag unter 7.1 genannten Personen für die Durchführung
des Versuchsvorhabens werden wie folgt bestätigt:
Frau Dr. med. vet. Henriette Jülke
Herr Dr. med. Felix Göhre
Herr Constantin Puy
Herr Sebastian Köhler

7. Diese Genehmigung ist an folgende Nebenbestimmungen gebunden:

a. Auflage:

Zur intensiven postoperativen Überwachung des Gesundheitsstatus verbleiben die Tiere nach dem letzten Eingriff – hier: 2. Operation: Einsatz der Füllmaterialien – für mindestens 10 Tage in der Chirurgischen Tierklinik und werden anschließend nach Verbringen in die Schäferei Otto Schölz mindestens einmal wöchentlich bis zum Versuchsende auf ihren Gesundheitsstatus hin untersucht. Die Versuchsaufzeichnung erfolgt hierbei unter Verwendung der mit Antrag eingereichten Anlage 2.

Für die Einhaltung der Vorschriften des § 9 Abs. 1 und Abs. 2 Tierschutzgesetz (TierSchG) sowie der hier erteilten Auflagen ist der auf Seite 1 dieser Genehmigung bezeichnete Leiter des Versuchsvorhabens oder die auf Seite 1 dieser Genehmigung bezeichnete Vertretung verantwortlich. Jeder beabsichtigte Wechsel des Leiters oder der Vertretung ist uns zuvor unverzüglich schriftlich anzuzeigen.

Diese Genehmigung gilt nur für die Art, Durchführung und Dauer der Eingriffe oder Behandlungen im Umfang des von Ihnen beantragten Tierversuchsvorhabens. Diese Genehmigung wird widerrufen, wenn die Voraussetzungen nach § 8 Abs. 3 TierSchG nicht mehr gegeben sind und dem Mangel nicht innerhalb einer von uns gesetzten Frist abgeholfen wird; sie kann widerrufen werden, wenn ihre Beschränkungen oder eine der Bedingungen und Auflagen nicht eingehalten werden.

8. Der Bescheid ergeht gebührenfrei.

Gründe

I. Sachverhalt

Die Landesdirektion Leipzig erhielt Ihren Antrag auf Genehmigung des o.g. Vorhabens am 09. Juni 2011. Die Stellungnahme des Tierschutzbeauftragten ging ebenfalls am 09. Juni 2011 in der Landesdirektion ein. Die Tierschutzkommission hat am 15. August 2011 über den Antrag beraten. Die Auflage unter Punkt 7 a. wurde erteilt, um eine regelmäßige postoperative Überwachung des Gesundheitszustandes zu gewährleisten. Vorbehaltlich der Einhaltung der Nebenbestimmungen wird Ihrem Antrag zugestimmt.

II. Rechtsgrundlage

Die Landesdirektion Leipzig ist sachlich und örtlich zuständig. Die örtliche Zuständigkeit ergibt sich aus § 3 Abs. 1 Verwaltungsverfahrensgesetz (VwVfG) in der Fassung vom 23. Januar 2003 (BGBl. I S. 102) in der geltenden Fassung, die sachliche Zuständigkeit aus § 3 des Sächsischen Ausführungsgesetzes zum Tierschutzgesetz und zu weiteren tierschutzrechtlichen Vorschriften (SächsAGTierSchG) vom 06. Januar 2004 (SächsGVBl. S. 1) in der geltenden Fassung i. V. m. § 1 Nr. 2 Buchstabe a der Verordnung des Sächsischen Staatsministeriums für Soziales über Zuständigkeiten zur Ausführung tierschutzrechtlicher Vorschriften (Zuständigkeitsverordnung Tierschutz – TierschZVO) vom 03. Februar 2005 (SächsGVBl. S. 18).

Die Genehmigung zur Durchführung wird nach § 8 Abs. 1, 2 Tierschutzgesetz (TierSchG) in der geltenden Fassung der Bekanntmachung vom 18. Mai 2006 (BGBl. I S. 1206, 1313) in der geltenden Fassung, erteilt.

Die Befristung der Genehmigung erfolgt gemäß § 8 Abs. 5 TierSchG i. V. m. Nr. 6.4.3 der Allgemeinen Verwaltungsvorschrift zur Durchführung des Tierschutzgesetzes (AVV TierSchG) vom 09. Februar 2000 (BAnz. Nr. 36a S. 1). Die Feststellung des Leiters und seines Stellvertreters für das Versuchsvorhaben beruhen auf § 8 Abs. 4 TierSchG, die Bestätigung der für die Durchführung genannten Personen auf § 9 Abs. 1 TierSchG.

Die Nebenbestimmungen habe ich nach pflichtgemäßem Ermessen festgesetzt, um die Einhaltung der Voraussetzungen der §§ 1, 8, 8a und 9 TierSchG sicherzustellen. Es handelt sich hierbei um Nebenbestimmungen im Sinne von § 36 Abs. 1 und 2 des Verwaltungsverfahrensgesetzes (VwVfG) in der Fassung der Bekanntmachung vom 23.01.2003 (BGBl. I S. 102) i. V. m. § 1 Verwaltungsverfahrensgesetz des Freistaates Sachsen (SächsVwVfG) in der Fassung der Bekanntmachung vom 10. September 2003 (SächsGVBl. Jg. 2003, Bl.-Nr. 15, S. 614) in den jeweils geltenden Fassungen.

III. Kostenentscheidung

Die Gebührenfreiheit ergibt sich aus § 4 Abs. 1 Nr. 4 des Verwaltungskostengesetzes des Freistaates Sachsen (SächsVwKG) i. d. F. der Bekanntmachung vom 17. September 2003 (SächsGVBl. Nr. 16/2003 S. 698) in der geltenden Fassung.

Rechtsbehelfsbelehrung

Gegen diesen Bescheid kann innerhalb eines Monats nach Bekanntgabe Widerspruch erhoben werden. Der Widerspruch ist schriftlich oder zur Niederschrift bei der Landesdirektion Leipzig
Braustraße 2
04107 Leipzig
einzulegen.

6.2 Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Ingo Wiesner, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Die minimalinvasive dorsolaterale Schädigung der ovinen Bandscheibe als Schädigungsmodell degenerativer Wirbelsäulenveränderungen“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Halle (Saale), den 10.03.2017

Ingo Wiesner

6.3 Danksagung

Für die Unterstützung bei der Erstellung der Arbeit möchte ich mich bei Herrn Dr. med. Felix Göhre und Herrn Dr. Ing. Stefan Schwan herzlich bedanken. Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. h. c. Dr. Hans Jörg Meisel für die Initiierung der Arbeit, die fachliche Beratung und die kritische Diskussion.

Ingo Wiesner

6.4 Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.