

Aus dem Forschungslabor des Zentrums für  
Muskuloskeletale Chirurgie  
Charité – Universitätsmedizin Berlin  
Campus Virchow Klinikum

Eingereicht über das  
Institut für Veterinär-Anatomie  
des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

**In vivo Evaluation eines experimentellen, posterioren, dynamischen  
Stabilisationssystems am ovinen lumbalen Degenerationsmodell: eine  
immunhistochemische Studie**

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

vorgelegt von  
Eduardo Maurô  
Tierarzt aus Lima

Berlin 2010  
Journal Nr. 3477

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. vet. Leo Brunnberg  
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. med. vet. Johanna Plendl  
Zweiter Gutachter: PD Dr. med. Frank Kandziora  
Dritter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. med. vet. Achim Gruber, Ph.D.

*Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):*

spine, immunohistochemistry, degeneration, sheep, collagen, animal models

Tag der Promotion: 16.09.2011

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

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

ISBN: 978-3-86387-039-3

**Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2010**

Dissertation, Freie Universität Berlin

**D 188**

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

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

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

This document is protected by copyright law.

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

Alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© Mensch und Buch Verlag 2011

Choriner Str. 85 - 10119 Berlin

[verlag@menschundbuch.de](mailto:verlag@menschundbuch.de) – [www.menschundbuch.de](http://www.menschundbuch.de)

Meinen Eltern, Großeltern, Bruder und ganz besonders meiner wartenden Julia



**Inhaltsverzeichnis**

<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	<b>I</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>III</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>IV</b>
<b>1. Einleitung und Ziel</b> .....	<b>1</b>
<b>2. Grundlagenwissen</b> .....	<b>2</b>
2.1 Anatomische Grundlagen.....	2
2.1.1 Die Wirbelsäule .....	2
2.1.2 Die Bandscheibe .....	5
2.1.2.1 Mikroskopische Anatomie der Bandscheibe .....	6
2.1.2.2 Biochemie der Bandscheibe .....	6
2.2 Pathologie der Bandscheibe .....	10
2.2.1 Nicht-degenerative Bandscheibenerkrankungen .....	10
2.2.2 Die Degeneration der Bandscheibe .....	12
2.2.3 Proteoglykanverlust, Neoinnervation und Angiogenese im Zusammenhang .....	13
2.2.4 $\alpha$ -Smooth-Muscle-Actin und Angiogenese .....	13
2.2.5 Agrecan und Keratansulfat in der Bandscheibendegeneration .....	14
2.2.6 Erhöhung der Metalloproteinase-Konzentration .....	16
2.2.7 Protein Gene Product 9.5 und Neoinnervation .....	16
2.2.8 Veränderung der Kollagenverhältnisse .....	17
2.3 Therapiemethoden in der Humanmedizin.....	17
2.3.1 Nukleotomie .....	18
2.3.1.1 Intradiscal Elektrothermal Therapy .....	18
2.3.2 Mikrochirurgische Sequesterektomie (Mikrodiskektomie).....	18
2.3.3 Autologe Chondrozyten-Transplantation .....	19
2.3.4 Fusion/Spondylodese.....	19
2.3.5 Dynesys .....	19
2.3.6 Soft-Fixation System .....	20
2.4 Schafe als Modell für Bandscheibenstudien .....	20
<b>3. Tiere, Material und Methoden</b> .....	<b>22</b>
3.1 Untersuchte Tiere .....	22
3.2 Gruppeneinteilung.....	22
3.3 Das SoFi-Implantat .....	23
3.4 Chirurgische Eingriffe .....	25
3.4.1 Vorbereitung .....	25
3.4.2 Partielle Nukleotomie .....	26
3.4.3 Einsatz des SoFi-Systems.....	26
3.4.4 Postoperative Nachsorge und Kontrollen .....	27
3.5 Tötung und Entnahme der Wirbelsäule .....	27
3.6 Immunhistochemische Untersuchung.....	28
3.6.1 Vorbereitung der Proben .....	28
3.6.2 Immunlokalisation von $\alpha$ -SMA .....	29
3.6.3 Immunlokalisation von Keratansulfat .....	30
3.6.4 Immunlokalisation von MMP 13.....	30
3.6.5 Immunlokalisation von PGP 9.5.....	30
3.6.6 Immunlokalisation von Kollagen Typ I und Typ II .....	30
3.6.7 Immunhistochemische Markierung .....	31
3.7 Digitale Bilderfassung .....	33
3.8 Bildanalyse.....	34
3.9 Statistische Auswertung.....	36

3.9.1	Deskriptive Statistik .....	36
3.9.2	Statistische Tests.....	38
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>40</b>
4.1	$\alpha$ -Smooth-Muscle-Actin .....	40
4.2	Keratansulfat .....	44
4.3	MMP 13 .....	48
4.4	PGP 9.5 .....	58
4.5	Kollagen Typ I .....	61
4.6	Kollagen Typ II.....	70
4.7	Kollagen Typ I und Typ II in Vergleich in den Übergangszonen .....	83
4.8	Zusammenfassung der Ergebnisse der Untersuchungen.....	87
<b>5.</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>92</b>
5.1	Ovines Tiermodell .....	92
5.2	Anzahl der Tiere, chirurgische Eingriffe und Beobachtungszeiträume.....	92
5.3	Gewinnung, Aufarbeitung und Färbung der Proben.....	93
5.3.1	EDTA und Immunhistochemie.....	93
5.4	Digitale Pixelanalyse .....	94
5.5	Probengewinnung und Analysemethoden.....	95
5.6	Posteriores, dynamisches Stabilisationssystem .....	96
5.7	$\alpha$ -SMA.....	96
5.8	Keratansulfat .....	98
5.9	MMP 13 .....	98
5.10	PGP 9.5 .....	100
5.11	Kollagen Typ I .....	101
5.12	Kollagen Typ II.....	102
5.13	Vergleich von Kollagen Typ I und Typ II in den Übergangszonen.....	104
5.14	Klinische Relevanz .....	105
5.14.1	Relevanz für die Tiermedizin .....	108
5.15	Ergebnisse im Kontext des Gesamtprojektes.....	108
5.15.1	Biomechanik .....	108
5.15.2	Histologie.....	109
5.16	Schlussfolgerung.....	112
<b>6.</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>114</b>
<b>7.</b>	<b>Summary .....</b>	<b>116</b>
<b>8.</b>	<b>Literaturangaben .....</b>	<b>118</b>
<b>Anhang</b>	<b>.....</b>	<b>130</b>
<b>Danksagung</b>	<b>.....</b>	<b>152</b>
<b>Selbstständigkeitserklärung</b>	<b>.....</b>	<b>153</b>

**Abbildungsverzeichnis**

Abb. 1	Lendenwirbel eines Schafes von kranial.....	3
Abb. 2	Lendenwirbel eines Schafes von links-laterodorsal.....	4
Abb. 3	Lendenwirbel eines Schafes vom L1 bis L6.....	4
Abb. 4	Bandscheibe eines Schafes.....	5
Abb. 5	Querschnitt durch Lendenwirbelkörper L3 und L4.....	6
Abb. 6	Darstellung einer 3-Helix.....	9
Abb. 7	Eitrig-abszedierende Meningomyelitis.....	11
Abb. 8	Eitrig-abszedierende Myositis.....	11
Abb. 9	Degenerierte Bandscheibe eines Schafes nach Nukleotomie.....	12
Abb. 10	Darstellung von Aggrecan in Degeneration und Reparatur.....	15
Abb. 11	SoFi-System-Modell.....	23
Abb. 12	SoFi-System-Modell (Großdarstellung).....	23
Abb. 13	SoFi-System-Modell von anterior-dorsal.....	24
Abb. 14	Präpariertes SoFi-Implantat.....	24
Abb. 15	Fixierung eines Schafes.....	25
Abb. 16	Darstellung der makroskopischen Schnitte und ihrer Benennung.....	28
Abb. 17	Makroskopischer Schnitt von dorsal.....	29
Abb. 18	Ausrichtung der Digitalaufnahmen.....	34
Abb. 19	Schematische Darstellung der RoIs der Bandscheibe.....	35
Abb. 20	Sichtbare immunopositive Fläche in einer Bandscheibe.....	35
Abb. 21	Bandscheibe mit exophytischem Wachstum.....	36
Abb. 22	Boxplot-Darstellung der Ergebnisse aus der Gesamtflächen-Tabelle.....	37
Abb. 23	Linien-Diagramm.....	38
Abb. 24	Probe des Tieres S82 gefärbt mit Anti- $\alpha$ -SMA und interne positiv-Kontrollen....	41
Abb. 25	Probe des Tieres S70 gefärbt mit Anti-Kollagen Typ I.....	90
Abb. 26	Probe des Tieres S70 gefärbt mit Anti-Kollagen Typ II.....	90
Abb. 27	Diagramm 29.....	91
Abb. 28	Diagramm 31.....	91
Abb. 29	Digitale Analyse.....	94
Abb. 30	Fissuren- bzw Hohlräume in der Bandscheibe des Tieres S56.....	110
Abb. 31	Erkennbare Lamellarstrukturen im linken Anulus fibrosus einer Probe.....	110
Abb. 32	Linker Anulus mit totalem Verlust jeglicher erkennbarer Lamellarstruktur.....	111

**Abkürzungsverzeichnis**

$\alpha$ -SMA	-	$\alpha$ -Smooth-Muscle-Actin
AB	-	Avidin-Biotin
Abb.	-	Abbildung
ADAMTS1	-	A disintegrin and metalloproteinase with a thrombospondin 1
ADCT	-	Autologous Disc Chondrocyte Transplantation
A.f.	-	Anulus fibrosus
AP	-	Alkalische Phosphatase
Aqua dest.	-	Destilliertes Wasser
°C	-	Grad Celsius
cm	-	Zentimeter
CS	-	Chondroitinsulfat
CT	-	Computertomographie
DNA	-	Desoxyribonukleinsäure
Dynesys	-	Dynamic Neutralisation System
EDTA	-	Ethylendiamintetraessigsäure
EKG	-	Elektrokardiogramm
G	-	Globuläre Protein-Domäne
IDET	-	Intradiscal Electrothermal Therapy
IGD	-	Interglobuläre Domäne
i.m.	-	Intramuskulär
i.v.	-	Intravenös
kDa	-	Kilodalton
kg	-	Kilogramm
KS	-	Keratansulfat
L	-	Lendenwirbel Nummer
Lig.	-	Ligamentum
Ligg.	-	Ligamenta
LP	-	Linker Protein
M.	-	Musculus
ml	-	Milliliter
Mm.	-	Musculi
mm	-	Millimeter
mm <sup>2</sup>	-	Quadratmillimeter
$\mu$ m	-	Mikrometer
MMP	-	Matrixmetalloproteinase
mRNA	-	messenger-Ribonukleinsäure
MRT	-	Magnetresonanztomographie
N	-	Anzahl der Proben
N.p.	-	Nucleus pulposus
PBS	-	Phosphate buffered saline
PCU	-	Polycarbonateurethan
PET	-	Polyethylenterephthalat
PGP 9.5	-	Protein Gene Product 9.5
pH	-	Pondus hydrogenii
PLDD	-	Percutaneous Laser Disc Decompression
Proc.	-	Processus
Q	-	Quotient
ROM	-	Range of motion
S	-	Schaf Nummer

## Abkürzungsverzeichnis

---

SoFi	-	Soft Fixation-System
TIMP	-	Tissue inhibitor of metalloproteinase
UCH-L1	-	Ubiquitin-Carboxyl-Terminal-Hydrolase-L1
ZNS	-	Zentrales Nervensystem



## 1. Einleitung und Ziel

Rückenschmerzen sind Beschwerden, unter denen große Teile der Bevölkerung von Industrieländern leiden. Die Prävalenz von Rückenschmerzen in der Bevölkerung liegt laut verschiedener statistischer Studien zwischen 12% und 35% und verursacht somit nicht nur Beschwerden für die Betroffenen und ihr Umfeld, sondern auch wichtige wirtschaftliche Verluste durch Arbeitsunfähigkeit oder medizinische Behandlungen (Maniadakis 2000; van Tulder und Mitarbeiter 1995).

Rückenschmerzen treten häufig in Verbindung mit Bandscheibendegeneration auf, obwohl die Degeneration auch ohne Symptome verlaufen kann (Urban und Roberts 2003). Bandscheibenprolaps oder -hernien sind eine mögliche Folge einer Bandscheibendegeneration. Heutzutage werden verschiedene Methoden angewendet, um die Schmerzen so gering wie möglich zu halten und die mechanischen Eigenschaften und Funktionen der Wirbelsäule möglichst aufrecht zu erhalten. Eine dieser Methoden versucht, durch das Anbringen eines posterioren, dynamischen Implantates die betroffene Bandscheibe zu entlasten und gleichzeitig eine gewisse Beweglichkeit zu bewahren, indem eine Mischung aus harten und weichen Materialien an die Pedikel mittels Pedikelschrauben befestigt wird. Das Implantat, das schon an zahlreichen Patienten getestet wurde, heißt Dynamic Neutralisation System (Dynesys) (Ricart und Serwier 2008). Die Firma SYNTHES® (Solothurn, Schweiz) entwickelte ein experimentelles Implantat mit dem gleichen Prinzip, das im Weiteren Soft Fixation (SoFi) genannt wird.

In der vorliegenden Studie wurde bei vierzig Schafen eine Stichinzision der Bandscheibe durchgeführt und damit eine Bandscheibendegeneration eingeleitet. Zudem wurde der Hälfte der Tiere das Implantat SoFi eingesetzt. Ziel dieser Studie war es, ein Vergleich zwischen der Gruppe mit Implantat und der Gruppe ohne Implantat durchzuführen, um die Effektivität des Implantats SoFi als Therapie zu überprüfen. Dafür wurden verschiedene Makromoleküle die als Indikatoren für die Bandscheibendegeneration dienen, mittels immunohistochemischer Methoden markiert und mit einem Pixel-Erkennungs-Programm die immunopositive Fläche bei jedem einzelnen Tier gemessen. Zu diesem Zweck wurden zehn Tiere mit Implantat und zehn ohne Implantat nach zwölf Wochen und die restlichen Tiere nach einem Jahr euthanasiert und die betroffenen Segmente (Lendenwirbel L3 und L4) herauspräpariert und untersucht. Aus der Größe der immunopositiven Fläche wurde geschlossen, bei welcher Gruppe von Tieren ein höherer Degenerationsgrad angenommen werden kann. Für die Interpretation der gewonnenen Werte wurden Informationen aus der Literatur herangezogen (Urban und Roberts 2003; Melrose und Mitarbeiter 1992). Die Hypothese der Studie besagte, dass das experimentelle, posteriore, dynamische Implantat in der Lage ist, die durch die partielle Nukleotomie zugefügte Degeneration zu stoppen, oder sogar umzukehren.

## 2. Grundlagenwissen

### 2.1 Anatomische Grundlagen

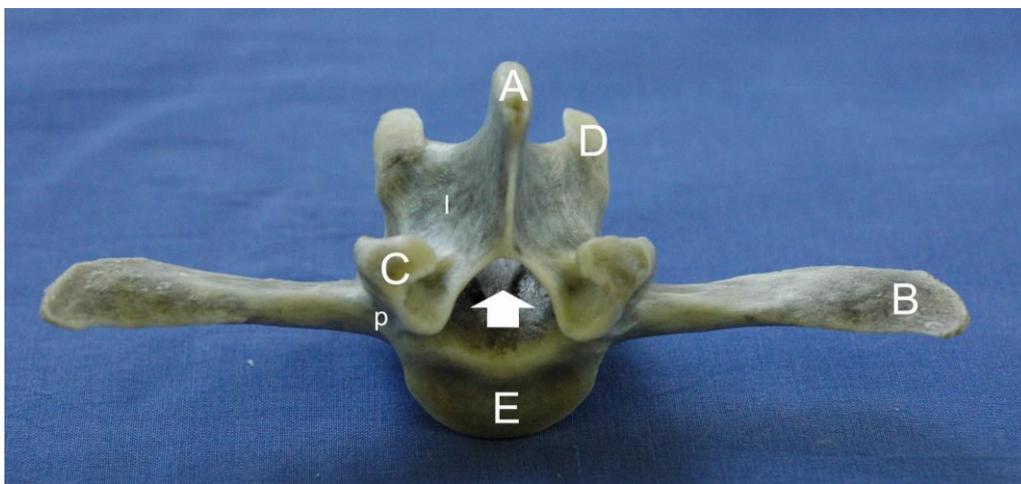
Die Knochen stellen das Grundgerüst des menschlichen und tierischen Organismus dar. Neben den Stützfunktionen bieten Knochen auch Ansatzstellen für Muskeln und Schutz für wichtige Organe. Nach ihrem Aufbau werden Knochen in platte, kurze und irreguläre Knochen, Sesambeine sowie Röhrenknochen unterteilt. Platte und kurze Knochen bestehen vor allem aus Spongiosa, dass von der Knochenrinde (Kortikalis) bedeckt wird. Lange, sogenannte Röhrenknochen besitzen einen Knochenschaft (Diaphyse). Die Diaphyse der Röhrenknochen besitzt eine Markhöhle, die von lamellenartig angeordnetem Knochengewebe (Kompakta) umgeben wird. Die Spongiosa bleibt bei den Röhrenknochen auf die Knochenenden (Epiphysen) beschränkt. Die Sesambeine sind kleine, rundliche Knochen deren Anzahl zwischen Individuen der gleichen Spezies variieren kann. Weiterhin gibt es eine Gruppe der irregulären Knochen, die sich durch ihren Aufbau keiner der anderen Gruppen zuordnen lässt oder aus Teilen besteht, die verschiedenen Gruppen zugeordnet werden kann, wie zum Beispiel die Wirbel oder der Unterkieferknochen (Loeffler 2002).

Die Verbindung zwischen zwei oder mehr Knochen heißt Gelenk. Echte, synoviale Gelenke weisen einen Gelenkspalt auf, der von zwei oder mehr Knochenenden begrenzt wird. Zwischen diesen Knochen befindet sich die Gelenkhöhle mit darin enthaltener Synovial-Flüssigkeit. Das gesamte Gelenk wird von der Gelenkkapsel umgeben. „Unechte“ Gelenke (Synarthrosen) besitzen keinen flüssigkeitsgefüllten Gelenkspalt. Hierzu zählen die fibrösen Knochenverbindungen (Juncturae fibrosae) durch Bänder, Knochennähte oder Einkeilungen. Auch die Verwachsung von Knochen (Synostosis) gehört zu den unechten Gelenken. Schließlich gehört zu den unechten Gelenken die Verbindung verschiedener Knochen durch Faserknorpel (Symphysis), zu denen die Gelenke zwischen den einzelnen Wirbeln der Wirbelsäule zählen (Budras und Mitarbeiter 1996).

#### 2.1.1 Die Wirbelsäule

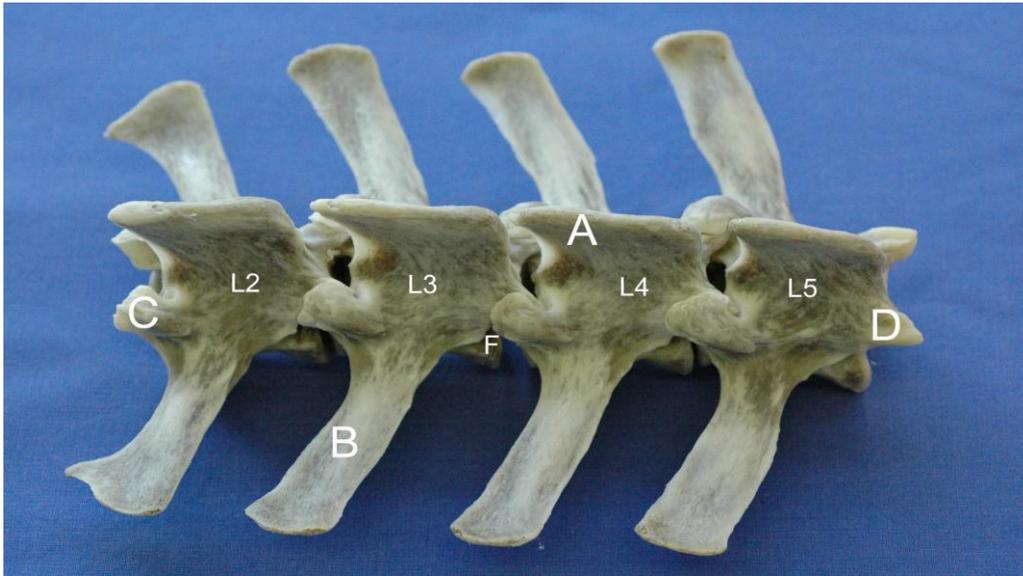
Die knöcherne Achse des Körpers, die Wirbelsäule (Columna vertebralis), ist der kennzeichnende Bestandteil der Wirbeltiere. Sie reicht von der Kopfbasis bis zur Schwanzspitze und wird von den Wirbeln (Vertebrae) gebildet, die miteinander durch die Bandscheiben (Discus intervertebralis) verbunden sind. Die Anzahl und Anatomie der Wirbel, aus denen die Wirbelsäule besteht, variiert zwischen den verschiedenen Spezies (Slijper 1946). Die meisten Wirbel besitzen einen kräftigen Wirbelkörper (Corpus vertebrae), der auf der kranialen Endfläche (Extremitas cranialis) etwas konvex und auf der kaudalen Endfläche (Extremitas caudalis) konkav ist. Dorsal des Wirbelkörpers sitzt der Wirbelbogen (Arcus vertebrae). Dieser besteht aus dem direkt am Wirbelkörper gelegenen Pedikel (Pediculus) und aus der dorsal gelegenen Lamina. Zwischen Wirbelkörper und Wirbelbogen entsteht so das Wirbelloch (Foramen vertebralis). Die aneinander liegenden Wirbellöcher bilden den Wirbelkanal (Canalis vertebralis), in dem das Rückenmark mit seinen Häuten liegt und so einen knöchernen Schutz erfährt. Auf dem Wirbelbogen befinden sich drei Fortsätze. Es handelt sich dabei um den medial gelegenen, unpaarigen Dornfortsatz (Processus spinosus) und die paarigen, lateral gerichteten Querfortsätze (Processus transversi). Kranial und kaudal am Wirbelbogen befinden sich kleine Einschnitte (Incisurae vertebrales craniales und

caudales), die zusammen mit der Incisura des davorliegenden beziehungsweise nachfolgenden Wirbels die Zwischenwirbellöcher (Foramina intervertebrales) bilden. Diese Foramina dienen den Spinalnerven als Austrittsstellen. Ferner besitzen Wirbel auch Gelenkfortsätze (Processus articulares craniales und caudales), die echte Gelenke zwischen benachbarten Wirbeln bilden. Die Wirbelsäule ist in verschiedene Bereiche unterteilt, Hals, Brust, Lende, Kreuzbein und Schwanz. Zu jedem Bereich gehören Wirbel mit verschiedenen anatomischen Strukturen oder speziellen Ausprägungen der gleichen anatomischen Strukturen. Der erste Halswirbel (Vertebra cervicalis 1), auch Atlas genannt, besitzt zum Beispiel keine Querfortsätze, sondern die so genannten Atlasflügel (Alae atlantis). In diesen liegen beim Schaf das Foramen alare und Foramen vertebrale laterale, durch die die ersten Spinalnerven durchtreten. Der Atlas besitzt als einziger Wirbel keinen Wirbelkörper, sondern einen dorsalen und ventralen Wirbelbogen (Arcus vertebrae ventralis und dorsalis). Ein Dornfortsatz fehlt ihm ebenfalls. Der zweite Halswirbel (Axis) besitzt als einziger einen Zahn (Dens axis), der den verlagerten Wirbelkörper des Atlas enthält und in die Zahngrube des Atlas (Fovea dentis) hineinragt und damit das Atlanto-axialgelenk (Articulatio atlantoaxialis) bildet. Dieses Gelenk besitzt keine Bandscheibe und ist durch seinen Aufbau als Zapfengelenk (Articulatio trochoidea) das beweglichste Gelenk der gesamten Wirbelsäule und verantwortlich für die Beweglichkeit des Kopfes (Cain und Fraser 1995). Die Brustwirbel (Vertebrae thoracicae) besitzen lange Dornfortsätze im Vergleich zu ihren Querfortsätzen. Diese teilen sich und bilden somit auch den Gelenkfortsatz (Processus costalis) für die Rippen. Lendenwirbel (Vertebrae lumbales) besitzen dagegen lange Querfortsätze. Das Kreuzbein (Os sacrum) ist das Produkt der Verschmelzung von typischerweise mehreren Wirbeln, beim Schaf zwischen drei und fünf (Budras und Mitarbeiter 1996; Nickel und Mitarbeiter 1992).



**Abbildung 1** Lendenwirbel eines Schafes von kranial

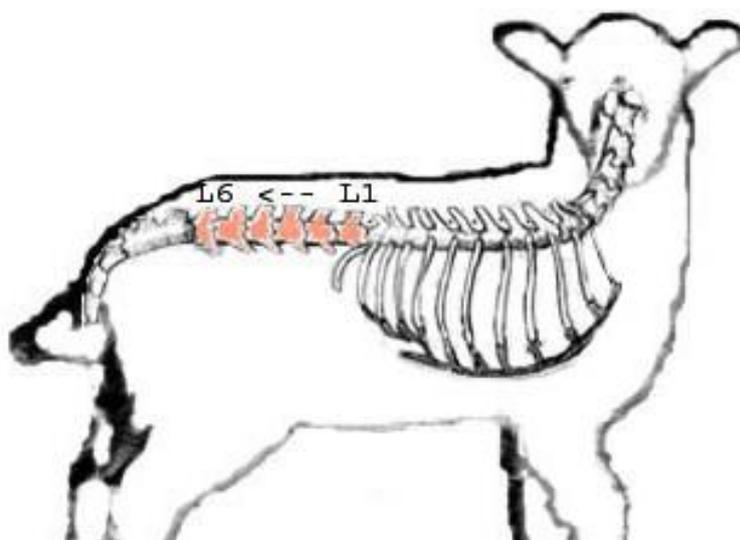
**Legende Abb. 1 und 2 (auf Seite 4): A: Processus spinosus; B: Processus transversus; C: Processus articularis cranialis; D: Processus articularis caudalis; E: Extremitas cranialis (Corpus vertebrae); F: Foramen intervertebrale. Der weiße Pfeil zeigt in den Canalis vertebralis, p: Pediculus, l: Lamina**



**Abbildung 2** Lendenwirbel eines Schafes von links-laterodorsal von Lendenwirbel L2 bis Lendenwirbel L5

Im Allgemeinen wird der Aufbau der Wirbelsäule der Vierbeiner mit einer parabolischen Bogensehnenbrücke verglichen (Slijper 1946). In diesem Modell wird die Aufgabe der Sehne von der Bauchmuskulatur und den Bändern der Mittellinie übernommen, während der Bogen aus dem Obergurt (Wirbelbögen, Dornfortsätze, Ligg. interspinalia, Rückenmuskulatur und Lig. supraspinale) und dem Untergurt (Wirbelkörper und Bandscheiben) gebildet wird (Jeffcott 1979). Das Zusammenspiel von Ober- und Untergurt verleiht der Wirbelsäule ihre Stabilität und gleichzeitig ihre Beweglichkeit (Nickel und Mitarbeiter 1992).

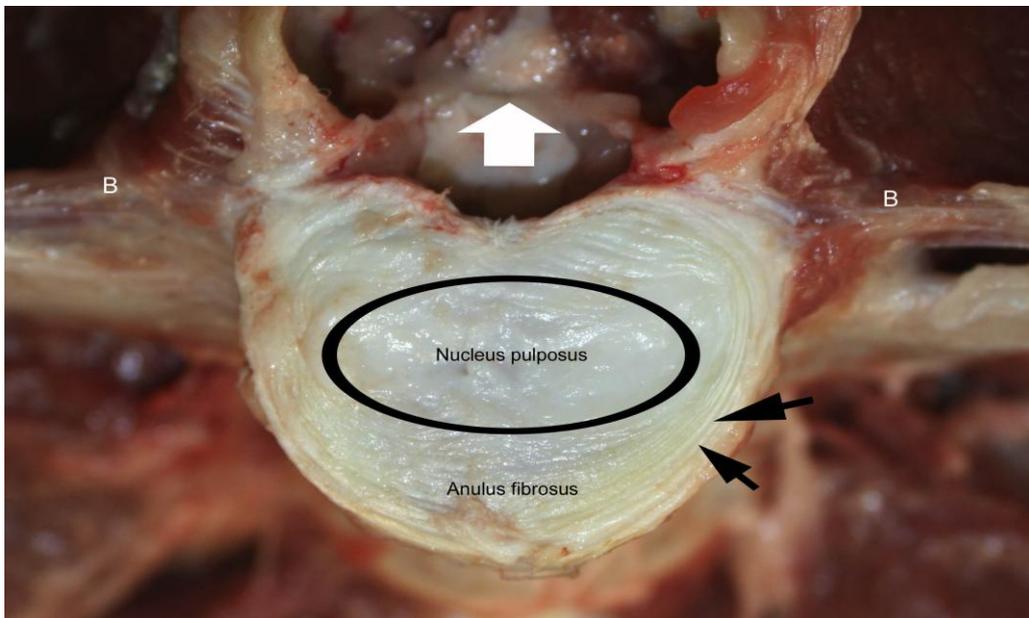
Schafe besitzen sechs, in manchen Fällen auch sieben Lendenwirbel. Die Dornfortsätze der Lendenwirbel sind wie auch die Querfortsätze, kranial geneigt. Die Querfortsätze sind außerdem sehr ausgeprägt, da sie auch als Stütze der Bauchwand dienen (Loeffler und Mitarbeiter 2002).



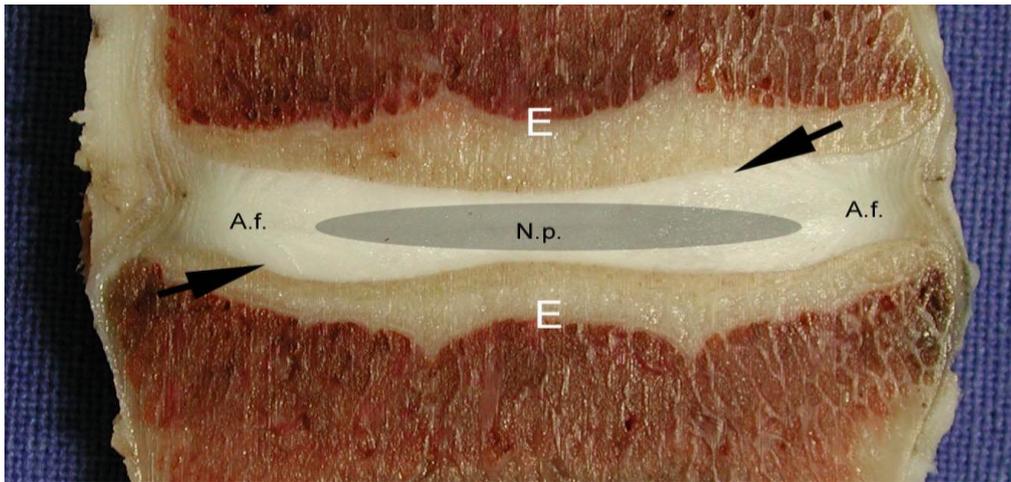
**Abbildung 3** Lendenwirbel eines Schafes vom ersten Lendenwirbel (L1) bis zum sechsten (L6) farbig markiert

### 2.1.2 Die Bandscheibe

Zwischen zwei Wirbelkörpern besteht ein Gelenk, die so genannte Symphysis. Verantwortlich für diese Verbindung sind die Bandscheiben (Disci intervertebrales). Die Bandscheiben sind eine komplexe Konstruktion bestehend aus einer äußeren, aus Faserknorpel aufgebauten Ringstruktur (Anulus fibrosus) und einem gallertigen Kern (Nucleus pulposus) in der Mitte. Der Nucleus pulposus ist das Überbleibsel der embryonal angelegten Chorda dorsalis. Bei der Geburt ist das Nucleus pulposus noch reich an Notochordzellen deren Anzahl sich mit zunehmendem Alter reduziert (Roughley 2004; Budras und Mitarbeiter 1996, Loeffler und Mitarbeiter 2002). Zusätzlich besitzt die Bandscheibe die aus hyalinem Knorpel bestehenden Endplatten. Die Endplatten stellen die Verbindung zwischen der Bandscheibe und dem Wirbelkörper her. Sie sind weniger als 1 mm dick und schließen die Bandscheibe von oben und unten beziehungsweise von vorne und hinten wie ein Sandwich ein (Raj 2008; Urban und Roberts 2003, Nickel und Mitarbeiter 1992).



**Abbildung 4** Bandscheibe eines Schafes. B: Processus transversus; Weißer Pfeil: Canalis vertebralis, (Analog Abb.1). In der Mitte der gallertige Nucleus pulposus, umgeben von den Lamellen des Anulus fibrosus. Die schwarzen Pfeile zeigen Lamellen des Anulus fibrosus.



**Abbildung 5** Querschnitt durch Lendenwirbelkörper L3 und L4 mit Blick auf die Bandscheibe von dorsal. N.p.: Nucleus pulposus; A.f.: Anulus fibrosus; E: Wirbelkörper. Die schwarzen Pfeile zeigen auf die Endplatten (obere und untere).

Die Bandscheiben alleine machen etwa 25% der Gesamtlänge der Wirbelsäule aus. Sie verleihen der Wirbelsäule durch ihren Aufbau sowohl Druck- als auch Zugfestigkeit und gewährleisten ihre Beweglichkeit (Raj 2008; Roughley 2004; Loeffler und Mitarbeiter 2002).

#### 2.1.2.1 Mikroskopische Anatomie der Bandscheibe

Der Anulus fibrosus ist aus aneinander geordneten Lamellen aufgebaut. Diese Lamellen bestehen aus Kollagenfasern, deren Dichte von außen nach innen abnimmt und die Unterteilung in einen dicht gebauten, äußeren Anulus und einem lockeren, inneren Anulus erlaubt. Zwischen den Lamellen befinden sich außerdem noch querverlaufende elastische Fasern, die die Lamellen miteinander verbinden. Zusätzlich sind zwischen den Lamellen noch Chondrone zu finden (Raj 2008; Junqueira und Carneiro 1996; Wheater und Mitarbeiter 1987). Gefäße sind in der gesunden Bandscheibe nicht anzutreffen. Der Stoffaustausch in der Bandscheibe geschieht durch Diffusion. Nervengewebe ist in der gesunden Bandscheibe ebenfalls nicht vorhanden (Urban und Roberts 2003).

Der Nucleus pulposus besteht aus dem zellulären Anteil und aus der gallertigen Matrix. Der Nucleus pulposus ist ein Überbleibsel der Chorda dorsalis und enthält bei Kleinkinder noch Notochord-Zellen. Andere Spezies, wie zum Beispiel Mäuse, behalten die Notochord-Zellen ihr Leben lang. Mit zunehmendem Alter oder durch Degeneration findet man im Nucleus pulposus aber auch Chondrozyten und Fibroblasten (Urban und Roberts 2003; Junqueira und Carneiro 1996).

Die Matrix des Nucleus pulposus liegt als gelatinöse Grundsubstanz vor. In ihr befinden sich gelöste, osmotisch aktive Moleküle, reichlich Wasser und Enzyme (Urban und Roberts 2003; Reid und Mitarbeiter 2002; Junqueira und Carneiro 1996; Melrose und Mitarbeiter 1992).

#### 2.1.2.2 Biochemie der Bandscheibe

Die Bandscheibe zeichnet sich vor allem durch den Wasserreichtum des Nucleus pulposus aus. Diesen Wasserreichtum erreicht der Nucleus pulposus mit Hilfe von osmotisch aktiven Molekülen, die einen hydrostatischen Druck in seinem Innern aufrechterhalten und ihm damit

seine Viskosität und hydrodynamischen Eigenschaften verleihen (Melrose und Mitarbeiter 2001). Das wichtigste, osmotisch aktive Molekül im Nucleus pulposus ist Aggrecan. Ein Aggrecan-Monomer besteht aus einer Kernprotein-Kette mit drei globulären Bereichen (Abb. 6). Zwischen den globulären Domänen 2 und 3 befinden sich die Bindungsstellen für die Keratansulfat- und Chondroitinsulfat-Ketten, die sogenannten Glycosaminoglycane oder Mucopolysaccharide (Roughley und Mitarbeiter 2002). Diese stellen den osmotisch wirksamen Teil des Proteins dar. Die Chondroitinsulfat-Ketten sind länger als die Keratansulfat-Ketten und auch zahlreicher innerhalb des Proteins. Die Aggrecan-Moleküle sind miteinander durch Hyaluronsäure verbunden. Dies ist ein Protein, an dem sie durch andere Linker-Proteine stabilisiert werden und durch das sie große Aggregate formen.

Aggrecan ist das wichtigste Proteoglycan der Bandscheibe, und kommt im Nucleus pulposus in höheren Konzentrationen als im Anulus fibrosus vor (Akhtar und Mitarbeiter 2005; Roughley und Mitarbeiter 2002; Beard und Mitarbeiter 1980). Durch seine Wechselwirkung mit Kollagen und seine osmotische Aktivität trägt es zusammen mit Kollagen zur Aufrechterhaltung der mechanischen Eigenschaften der Bandscheibe bei (Roughley und Mitarbeiter 2006; Urban 2002; Kuiper und Mitarbeiter 1998; Maroudas und Mitarbeiter 1969). Die Degeneration von Aggrecan äußert sich durch eine Verminderung der mit Chondroitinsulfat substituierten Bereiche, durch eine Verkürzung der Länge der Chondroitinsulfat-Ketten, durch das Lösen des kompletten Proteins von der Hyaluronsäure oder durch die Fragmentierung des gesamten Proteins (Roughley und Mitarbeiter 2002). Keratansulfat enthaltende Proteoglycane wie Aggrecan werden in den Matrixzellen synthetisiert und in die Grundsubstanz transportiert. Die Zersetzung der Proteoglycane geschieht in den Lysosomen und Vakuolen der Zellen durch Aggrecanasen und Metalloproteinasen (Akhtar und Mitarbeiter 2005).

Ein anderes Molekül aus der Familie der Proteoglykane, das in der gesunden Bandscheibe vorkommt, ist Versican, das so wie Aggrecan zu den großen Proteoglykanen gezählt wird. Versican kommt in der fötalen Bandscheibe im Nucleus pulposus diffus verteilt vor, verringert aber seine Konzentration beim adulten Tier drastisch (Melrose und Mitarbeiter 2001). Außerdem kommen kleine Proteoglykane wie Lumikan, Biglykan, Decorin und Fibromodulin vor. Glykoproteine wie Fibronectin und Amyloid sind ebenfalls vorhanden (Melrose und Mitarbeiter 2001; Roberts und Mitarbeiter 1991).

Das Trockengewicht der gesunden Bandscheiben wird im Anulus fibrosus bis zu 70% und im Nucleus pulposus bis 20% fast ausschließlich von Kollagen Typ I und Typ II verursacht. Andere Kollagentypen, die ebenfalls vorkommen sind Typ III, V, VI, IX, X, XI, XII und XIV (Urban und Roberts 2003; Roberts und Mitarbeiter 1991).

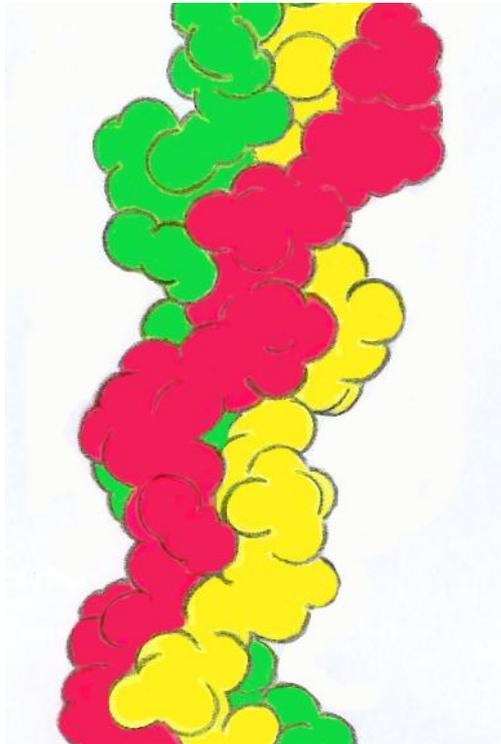
Kollagen ist das meist verbreitete Protein im menschlichen und tierischen Organismus. Es kommt unter anderem vor in Knochen, Knorpel, Sehnen, Bändern und Haut. Die Familie der Kollagene besteht aus hoch spezialisierten Glykoproteinen, von denen bisher mindestens 28 genetisch distinkte Typen bekannt sind. Kollagen besteht aus helikalen Peptidketten, den so genannten  $\alpha$ -Ketten, die eine linksgängige Helix aufweisen. Drei dieser Ketten, welche untereinander Wasserstoffbrücken ausbilden können, umschlingen einander zu einer rechtsgängigen Superhelix (Abb. 6). Hauptbestandteile der  $\alpha$ -Ketten sind die Aminosäuren Glycin, Prolin und Hydroxyprolin wobei Glycin immer an dritter Stelle auftritt. Außerdem treten Lysin und Hydroxylysin regelmäßig auf, was für die Quervernetzung der Proteinstränge und für die Glykosylierung der Moleküle von Bedeutung ist. Die unterschiedliche Zusammensetzung der  $\alpha$ -Ketten und ihre unterschiedliche Glykosylierung machen die große Vielfalt von Kollagen in den verschiedenen Geweben aus (Roberts und Mitarbeiter 1991).

Kollagen Typ I ist das meistverbreitete Einzelprotein im Säugetierorganismus. Es kommt in allen Geweben vor, aber vor allem in der Haut, in Sehnen und in Knochen. Es gehört zusammen mit Kollagen Typ II, III, V und XI zu den fibrillären Kollagenen, welche früher in der Literatur als Kollagene der Klasse I klassifiziert wurden (Burgeson und Nimni 1992). Kollagenfasern bestehen ausschließlich aus Kollagen Typ I. Die bis zu 20 µm dicken Fasern bestehen aus etwa 130 nm dicken Fibrillen, die wiederum aus Kollagen Typ I-Molekülen bestehen. Jedes Kollagen Typ I-Molekül besteht aus einer  $\alpha 1$ - und zwei  $\alpha 2$ -Ketten [ $\alpha 1(I)2\alpha 2(I)$ ]. Die Vorläufer der  $\alpha$ -Ketten, die Pro- $\alpha$ -Ketten, werden am rauhen endoplasmatischen Retikulum hergestellt und in dessen Lumen transportiert. Dabei sind sie mit N- und C-terminalen Propeptiden versehen. Im endoplasmatischen Retikulum werden an einzelne Prolin- und Lysin-Reste OH-Gruppen gebunden (Hydroxylierung) und anschließend an die resultierenden Hydroxylysin-Gruppen Zuckerreste angebracht (Glykosylierung). Durch Ausbildung von Disulfid-Brücken zwischen den C-terminalen Propeptiden wird die Tripelhelixbildung eingeleitet. Drei Pro- $\alpha$ -Ketten bilden dabei mittels Wasserstoffbrücken ein dreisträngiges Helixmolekül, das Prokollagen. Die fibrillären Kollagene werden in dieser Form aus der Zelle entlassen. Die Ausschüttung der Moleküle in den extrazellulären Raum erfolgt durch Exozytose mittels sekretorischer Vesikel. Unmittelbar nach dem Verlassen der Zelle werden die Propeptide mit Hilfe von Prokollagen-Peptidasen gespalten. So wird aus Prokollagen Tropokollagen. Anschließend lagern sich einzelne Tropokollagen-Moleküle zu Kollagen-Fibrillen zusammen (Fibrillogenese). In einem weiteren Schritt kommt es zur Ausbildung der Kollagenfasern, wobei die Quervernetzung an bestimmten Lysin- und Hydroxylysinresten erfolgt (Burgeson und Nimni 1992; Hojima und Mitarbeiter 1985).

Kollagen Typ II ist im Gelenkknorpel der am häufigsten vorhandene Kollagentyp (Jimenez und Mitarbeiter 1997). Es verleiht den Geweben zug- und stoßdämpfende Fähigkeiten. Vor allem kommt Kollagen Typ II im Knorpelgewebe und im Glaskörper vor. Es besteht aus drei identischen  $\alpha 1$ -Ketten und besitzt daher die Formel [ $\alpha 1(II)$ ]<sub>3</sub>. Die  $\alpha$ -Ketten von Kollagen Typ II oder kurz  $\alpha 1(II)$  besitzen im Vergleich zu den  $\alpha 1(I)$  Ketten einen höheren Hydroxylysin-beziehungsweise Hydroxyprolinanteil und eine nahezu fünffach höhere Substitution mit glykosidisch gebundenen Zuckerresten. Die Neubildung von Kollagen Typ II entspricht der von Kollagen Typ I. Ein Unterschied zwischen beiden Kollagen Typen ergibt sich aus dem Aufbau der  $\alpha$ -Ketten, aus den C- oder N-terminalen Substituenten und aus den Enzymen, die bei deren Entfernung aktiv sind (Jimenez und Mitarbeiter 1997; Burgeson und Nimni 1992).

In der Bandscheibe machen Kollagen Typ I und II zusammen etwa 80% des Gesamtkollagenanteils aus. In den gesunden Endplatten ist ausschließlich Kollagen Typ II zu finden (Urban und Roberts 2003; Roberts und Mitarbeiter 1991). Kollagen Typ II ist für die Zugfestigkeit zuständig, während Kollagen Typ I für die Druckfestigkeit verantwortlich ist. Deshalb hängen die funktionelle, sowie die strukturelle Integrität der Bandscheibe im großen Maße von der Integrität ihres Kollagengerüsts ab. Dieses Kollagengerüst ist nicht überall gleich. Im Bereich des Nucleus pulposus, in dem Kollagen Typ II stärker vertreten ist als Typ I, ist die Anordnung der Fasern sehr irregulär und sie liegen quasi lose in der Matrix. Eine Verbindung zu den Fasern der Endplatte wurde allerdings bewiesen (Inoue 1981). In den Endplatten, die ausschließlich aus Kollagen Typ II bestehen (Roberts und Mitarbeiter 1991), ist die Anordnung der Fasern parallel zur Bandscheibenebene. Der Anulus fibrosus besteht aus zwischen 15 und 25 konzentrisch, parallel zueinander angeordneten Lamellen. Im äußeren Anulus fibrosus ist überwiegend Kollagen Typ I zu finden. Studien an Schweinen zeigten, dass das Anulusgewebe im äußeren Anulus fibrosus vollständig aus Kollagen Typ I besteht, während in der Übergangszone von Anulus fibrosus zu Nucleus pulposus ein Verhältnis von Kollagen Typ I zu Typ II von 92 zu 8 zu finden ist (Beard und Mitarbeiter 1980). Es gibt einen entgegengesetzten Konzentrationsgradienten zwischen Kollagen Typ I und Typ II.

Während Kollagen Typ II in höchster Konzentration im Nucleus pulposus und in der Übergangszone zum Anulus fibrosus vorkommt, wo es stufenweise in Richtung der Peripherie abnimmt, geschieht das Gegenteil mit Kollagen Typ I (Guiot und Mitarbeiter 2000). Die Kollagenfasern sind in diesen Lamellen mit einem etwa 60° Winkel zu der vertikalen Achse orientiert. Die Richtung der Fasern in den Lamellen wechselt sich von einer Lamelle zur Nächsten ab.



**Abbildung 6** Darstellung einer 3-Helix (ähnlich wie Kollagen), die drei  $\alpha$ -Ketten in rot, gelb und grün. Mit freundlicher Genehmigung von J. Ziolk aus einer Hochschularbeit, Collage „Strukturen“.

Um die Integrität der Matrix zu gewährleisten, müssen Produktion, Akkumulation und Abbau der Matrixmoleküle in Gleichgewicht zueinander stehen (Lyons und Mitarbeiter 1981). Die Abbauvorgänge der extrazellulären Matrix in der Bandscheibe aber auch anderen Geweben werden unter anderen durch Matrixmetalloproteinasen (MMPs) kontrolliert (Consolo und Mitarbeiter 2009).

Die Matrixmetalloproteinasen sind eine Familie von zink- und kalziumabhängigen Endopeptidasen, die die Degradation und Reorganisation der extrazellulären Matrix bewirken. Zu ihren Substraten gehören Kollagene, Elastine, Gelatine und Proteoglycane. MMPs werden in sechs Gruppen eingeteilt: Collagenasen, Gelatinasen, Stromelysine, Matrilysine, Membran-Typ-MMPs und eine sechste noch unbestimmte Gruppe (Consolo und Mitarbeiter 2009). Exprimiert werden sie von einer Vielzahl von Zellen wie Fibroblasten, Osteoblasten, Endothelzellen, Chondrozyten, Makrophagen, neutrophilen Granulozyten und Lymphozyten. Diese Enzyme werden als Zymogene ausgeschüttet und dann durch andere Enzyme aktiviert. Der katalytische Mechanismus aller MMPs hängt von einem Zink-Ion im aktiven Zentrum ab. Die Mehrheit der MMPs besteht aus vier verschiedenen Domänen: der N-terminal pro-Domäne, der katalytischen Domäne, der Gelenkregion und der C-terminalen hämopexinähnlichen Domäne (Consolo und Mitarbeiter 2009; Rajeshwar und Mitarbeiter 2007). Die Aktivierung der Zymogene erfolgt durch die Entfernung eines ca. 10 kDa

Segmentes im N-Terminus. Unter physiologischen Bedingungen wird die proteolytische Aktivität der MMPs in ihren drei Aktivitätsphasen kontrolliert. Dazu zählen die Aktivierung der Zymogene, die Transkription und die Inhibition durch „Tissue Inhibitors of MMPs“ auch TIMPs genannt (Rajeshwar und Mitarbeiter 2007; Le Maitre und Mitarbeiter 2004).

Matrixmetalloproteinase 13 (MMP 13)/Kollagenase 3 wird als ein 60 kDa Zymogen ausgeschüttet und dann durch Proteolyse in die aktive 48 kDa Form umgewandelt. Substrate für MMP 13 sind Kollagen Typ I, II und III sowie Gelatine. Bevorzugt wird aber Kollagen Typ II gespalten. Inhibiert wird die Aktivität von MMP 13 durch TIMP-1, TIMP-2 und TIMP-3. Da MMP 13 eine hohe Aktivität und ein breites Spektrum an Substraten besitzt, wird sie vor allem in Bereichen exprimiert, in denen eine rasche Matrixverarbeitung erfolgen muss (Leeman und Mitarbeiter 2002).

## 2.2 Pathologie der Bandscheibe

Die Bandscheibenveränderungen können in zwei Gruppen unterteilt werden, die nicht-degenerativen und die degenerativen Bandscheibenerkrankungen (Krämer und Mitarbeiter 2006).

### 2.2.1 Nicht-degenerative Bandscheibenerkrankungen

Zu den nicht-degenerativen Bandscheibenveränderungen gehören Entwicklungsstörungen wie die Hemmung der Chorda dorsalis-Rückbildung, die sich in allen Entwicklungsstufen ausbilden kann. Bei der hochgradigen Ausprägung dieser Veränderung durchzieht ein zylinderförmiger, weichteilartiger Chordarest multiple Wirbelkörper und verursacht eine Chordaanschwellung (Schmorl und Junghanns 1968). Im Gegensatz zu der seltenen Chordaanschwellung gibt es auch häufiger auftretende minimale Ausprägungen einer Chordarückbildungsstörung. Solche Veränderungen äußern sich häufig in einer auffallend dünnen Knorpelendplatte der Wirbelkörper, die einen Durchtritt kleiner Mengen von Bandscheibenmaterial in die Spongiosa des Wirbelkörpers erlauben. Es bilden sich die von Schmorl 1932 benannten Knorpelknötchen. Diese Veränderung stellt in aller Regel einen Zufallsbefund dar und die Betroffenen bleiben ohne Beschwerden. Weitere Entwicklungsstörungen sind Knorpelverknöcherungsstörungen (Rathke 1954) oder Ossifikationslücken (Schmorl und Junghans 1968). Die juvenile Kyphose oder Scheuermann-Krankheit (Krämer und Mitarbeiter 2006) kann sekundär einen oder mehrere der genannten Befunde aufweisen (Scheuermann 1921).

Entzündungen der Bandscheiben (Diszitis) werden selten diagnostiziert. Eine Infektion der Bandscheibe kann durch spezifische (Mykobakterien) oder unspezifische Erreger (unter anderem Staphylokokken, Streptokokken, Kolibakterien) ausgelöst werden. Die isolierte Diszitis, das heißt ohne Entzündung des Wirbelkörpers, wird in der Regel iatrogen durch eine Diskotomie oder Diskus-Punktion verursacht (Krämer und Mitarbeiter 2006). Die hämatogene Diszitis setzt eine Gefäßeinsprossung ins Innere der Bandscheibe voraus und wird fast nur bei Kleinkindern oder älteren Patienten beobachtet (Schmorl und Junghanns 1968). Den meisten Fällen von Bandscheibeninfektionen in der Literatur liegen wahrscheinlich endplattennahe Wirbelkörperentzündungen zugrunde (Krämer und Mitarbeiter 2006). Diese bakteriellen Infektionen können sich in der Bandscheibe nach kranial oder kaudal ausbreiten und in den Längsbändern zu spindelförmigen Abszessen führen. Das

Gleiche geschieht bei den Lendenwirbeln und dem Psoasmuskel (Abb. 7 und Abb.8) (Tofuku und Mitarbeiter 2007; Krämer und Mitarbeiter 2006).



**Abbildung 7** Sagittaler Schnitt durch die Wirbelsäule eines Schafes mit eitrig abszedierender Meningomyelitis. Befund eines 6 jährigen, männlichen Schafes, das an einer Hinterbeinparese litt. A: Proccus spinosus; E: Corpus vertebrae; b: Bandscheibe; c: Canalis vertebralis. Der rote Pfeil zeigt die akut bis subakute, fokale-extensive, eitrig-abszedierende Meningomyelitis. Die gelben Pfeile zeigen Entzündungsherde in den Bandscheiben. **Bild aus einer Obduktion im Institut für Tierpathologie der Freien Universität Berlin**



**Abbildung 8** Die Psoasmuskulatur des gleichen Tieres wie Abb.7 zeigt eine akute, fokale, eitrig-abszedierende Myositis (Abszess 2 x 1,5 cm groß). Dieser Abszess befand sich auf gleicher Höhe wie der Abszess im Rückenmark des Tieres.

Eine abakterielle Bandscheibenentzündung kann man bei Krankheiten wie rheumatischer Polyarthrit oder bei der ankylosierenden Spondylitis (Morbus Bechterew) erkennen (Rehart und Mitarbeiter 2007; Ardizzone und Mitarbeiter 2006). Anders als bei den bakteriellen Bandscheibenentzündungen verursachen die abakteriellen, abgesehen von einer möglichen Versteifung der Gelenke zwischen zwei Wirbeln, in aller Regel keine klinische Symptomatik (Krämer und Mitarbeiter 2006).

Obwohl bei einer Infektion der Wirbelsäule die Bandscheiben immer betroffen werden, bleiben sie bei einer Tumorerkrankung, auch wenn diese nah an den Endplatten lokalisiert ist, weitgehend unberührt. Trotz der Tatsache dass die Bandscheibe Fasern und Bindegewebe beinhaltet und diese konstant erneuert werden, sind bis jetzt primäre Tumore der Bandscheiben noch nicht beschrieben worden (Krämer und Mitarbeiter 2006).

Da die Bandscheibe durch ihre geringe Durchblutung eine Art Isolation vom restlichen Organismus erfährt, wirken sich Allgemeinerkrankungen in aller Regel hier später aus als in anderen Geweben. Selbst mehrere Stunden nach dem Tod sind physiologische Vorgänge in der Bandscheibe wie zum Beispiel die Diffusion von Makromolekülen immer noch intakt (Krämer und Mitarbeiter 2006). Nichtsdestotrotz sind Allgemeinerkrankungen wie Chondrodystrophie, Ochronose, Alkaptonurie oder Verkalkungen beziehungsweise Verknöcherungen der Bandscheibe schon beschrieben worden (Baier und Mitarbeiter 2009; McDonnell und Mitarbeiter 2007, Rogoll und Mitarbeiter 1990). Die Wirbelsäule zählt zudem zu den bevorzugten Erscheinungsorten von Osteoporose (Glaser und Kaplan 1997).

### 2.2.2 Die Degeneration der Bandscheibe

Die Degeneration der Bandscheibe ist aufgrund unklarer pathophysiologischer Grenzwerte und der Symptomlosigkeit trotz makro- und mikroskopischen Veränderungen ein schwer zu untersuchendes Phänomen. Definitionsgemäß ist die Bandscheibendegeneration ein Prozess, bei dem die Bandscheibe aus verschiedenen Gründen ihre Elastizität, Form, Farbe und physiologische Zusammensetzung verliert. Die Ursprünge der Degeneration sind so unterschiedlich wie zahlreich. Urban und Roberts nennen in ihrer Studie „Degeneration of the intervertebral disc“ falsche Ernährung, ungünstige, mechanische Belastung, Verletzung und genetische Prädisposition als Hauptursachen (Urban und Roberts 2003).

Obwohl Bandscheibendegenerationen ein Hauptgrund für Rückenschmerzen bei Menschen sind, können degenerierte Bandscheiben auch symptomlos bleiben. Intra vitam ist die Degeneration radiologisch oder mittels Magnetresonanztomographie (MRT) durch die Reduktion des Abstandes zwischen den zwei Wirbelkörpern nachweisbar (Krämer und Mitarbeiter 2006; Urban und Roberts 2003). Auch die Farbveränderung des Bandscheibengewebes infolge molekularer Veränderungen ist Anzeichen einer Bandscheibendegeneration, die aber intra vitam nicht festzustellen ist (Abb. 9).



**Abbildung 9** Degenerierte Bandscheibe eines Schafes drei Monate nach einer Nukleotomie-Operation.

Krämer und Mitarbeiter klassifizierten 2006 die Bandscheibendegeneration in 3 Stadien. Dabei wurden die Stadien der Bandscheibendegeneration mit den dazugehörigen Lebensabschnitten, in denen sie typischerweise auftreten, in Zusammenhang gebracht. Stadium 1 oder Frühphase betrifft Jugendliche zwischen zwölf und zwanzig Jahren und wird durch eine Vorwölbung des Anulus fibrosus aufgrund des wachsenden Druckes des Nucleus pulposus-Gewebes nach Außen charakterisiert. Dieser Druck wird mit dem Heranwachsen des Individuums größer. Das Stadium 2 geschieht im mittleren Alter und wird durch Zusammenhangstrennung der Anuluslamellen charakterisiert. Durch diese Risse kann das Nucleus pulposus-Gewebe dringen und es kommt zum Sequester oder sogenannten Bandscheibenprolaps. Im Stadium 3 oder Alters-Stadium schreiten die Protrusionen oder Prolapse nicht mehr weiter fort. Die Bandscheibe ist weitgehend ausgetrocknet. Hinzu kommen Verknöcherungen der intervertebralen Bandverbindungen (Spondylose), was zur Teilversteifung des betroffenen Segmentes beiträgt (Krämer und Mitarbeiter 2006).

Auf molekularer Ebene finden verschiedene Veränderungen statt, die den degenerativen Prozess verursachen oder begünstigen können. Wichtige Veränderungen sind zum Beispiel Proteoglykanverlust mit Neuinnervation und Angiogenese in physiologisch avaskulärer und aneuraler Bandscheibenmatrix (Melrose und Mitarbeiter 2002; Johnson und Mitarbeiter 2002; Maroudas 1975), Erhöhung der Metalloproteinasen-Konzentration (Lyons und Mitarbeiter 1981) oder Veränderung der Kollagenverhältnisse (Roberts und Mitarbeiter 1991; Eyre und Muir 1977).

### 2.2.3 Proteoglykanverlust, Neuinnervation und Angiogenese im Zusammenhang

Der Verlust an Proteoglykanen ist verantwortlich für die Dehydratation des Nucleus pulposus. Der wichtigste Vertreter dieser Molekülfamilie ist Aggrecan. In degenerierten Bandscheiben werden veränderte Aggrecanmoleküle produziert, die leicht aus dem Nucleus pulposus und sogar aus der Bandscheibe diffundieren oder keine Bindungsstellen mehr für Chondroitin- oder Keratansulfat-Ketten aufweisen. Durch diese Veränderungen können sie den osmotischen Druck letztendlich nicht mehr aufrechterhalten. Infolge dessen dehydriert die Bandscheibe. Aggrecan verhindert durch seine hohe Konzentration und Ladung die Diffusion von großen Molekülen in und durch die Matrix (Maroudas 1975). Es ist deswegen sehr wahrscheinlich, dass der Verlust von Aggrecan den Durchtritt von großen, ungeladenen Molekülen wie Wachstumsfaktoren und Zytokinen in die Bandscheibenmatrix ermöglicht. Das erklärt, warum unter physiologischen Bedingungen in der aneuralen und avaskulären Bandscheibenmatrix nach Eintritt der Degeneration Angiogenese und Neuinnervation stattfinden (Melrose und Mitarbeiter 2002). Andererseits wurde *in vitro* bewiesen, dass Aggrecan in der Lage ist Nervenzellenproliferation zu inhibieren (Johnson und Mitarbeiter 2002).

### 2.2.4 $\alpha$ -Smooth-Muscle-Actin und Angiogenese

$\alpha$ -Smooth-Muscle-Actin ( $\alpha$ -SMA) ist ein kontraktiles, zytoplasmatisches Protein, welches zur Gruppe der Actin-Proteine gehört, die einen Teil des Zytoskeletts darstellen. Die Gruppe der Actin-Proteine besteht aus sechs Isoformen, die in ihrer Aminosäuresequenz variieren, aber dieselbe molekulare Masse von 42 kDa besitzen.  $\alpha$ -SMA wird normalerweise in glatten Muskelzellen und kontraktile Fibroblasten angetroffen und ist das typische  $\alpha$ -Actin der glatten Gefäß-Muskulatur (Roholl und Mitarbeiter 1990). *In vitro* sind verschiedene Zelltypen der Bandscheibe in der Lage  $\alpha$ -SMA zu exprimieren und etwa ein bis zwei Prozent der Zellen

reagieren, ohne Kontakt zu einem Blutgefäß zu haben, immunopositiv auf  $\alpha$ -SMA (Schneider und Mitarbeiter 1999). Kürzlich wurde bewiesen, dass die Expression von  $\alpha$ -SMA im Bandscheibengewebe bei degenerativen Zustand höher ist als im physiologischen (Hastreiter und Mitarbeiter 2004), was dieses Protein zu einem guten Indikator für den Degenerationszustand der Bandscheiben macht.

Frühere Studien haben die Expression von  $\alpha$ -SMA als Indikator für die Degeneration der Bandscheibe erforscht.  $\alpha$ -SMA ist nicht nur ein Indikator für die Angiogenese.  $\alpha$ -SMA wird zwar in den glatten Muskelzellen von Gefäßen exprimiert. Diese Expression ist allerdings nicht exklusiv für diese Zellpopulation.  $\alpha$ -SMA wird ebenso von kontraktiven Fibroblasten und von Chondrozyten-ähnlichen Zellen der Bandscheibenmatrix ausgeschüttet (Melrose und Mitarbeiter 2002; Schneider und Mitarbeiter 1999). Es wurde experimentell bewiesen, dass, egal ob Gefäß- oder elastische Matrixzellen vermehrt  $\alpha$ -SMA exprimieren, in degenerierten Bandscheiben die Expression von  $\alpha$ -SMA im Vergleich zu normalen Bandscheiben in jedem Fall ansteigt. Dabei wurde die Degeneration der Bandscheiben in der gleichen Weise bei Schafen simuliert wie in der vorliegenden Studie.

### 2.2.5 Aggreccan und Keratansulfat in der Bandscheibendegeneration

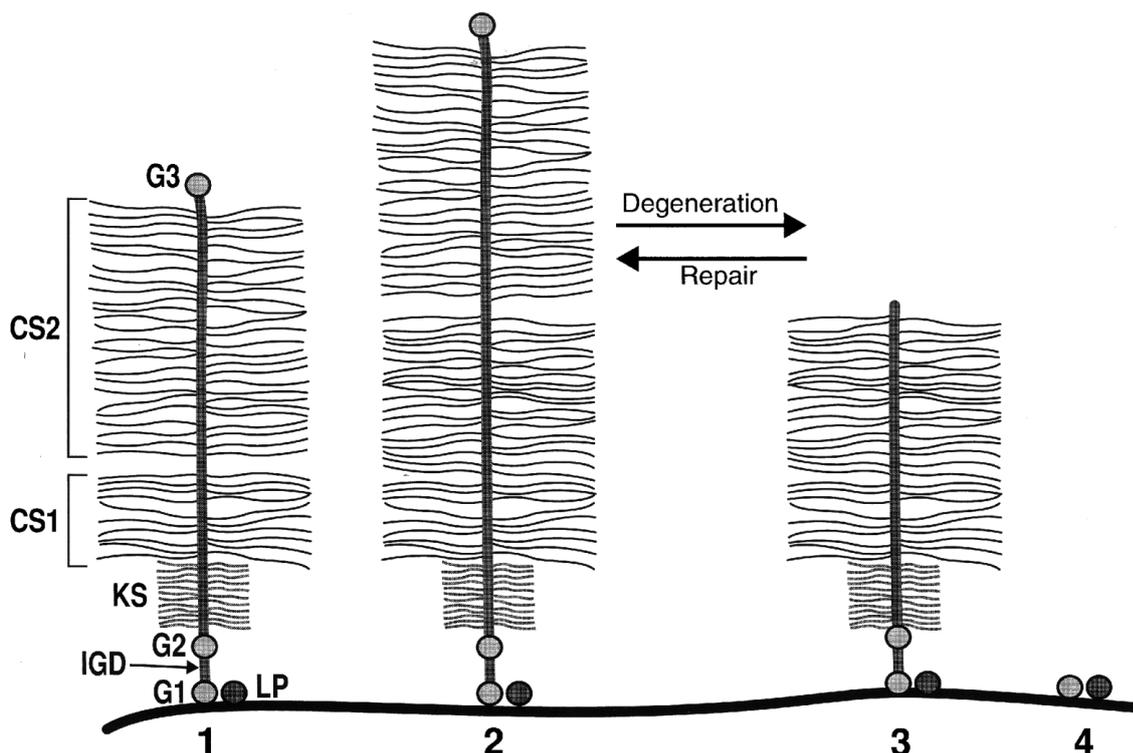
Die Matrix der Bandscheibe und vor allem des Nucleus pulposus sind wasserreich. Dies ist für die mechanischen Eigenschaften der Bandscheibe in Bezug auf ihre Druckfestigkeit unentbehrlich (Roughley 2004). Während des Fortschreitens der Degeneration der Bandscheibe verliert diese an Wasser. Dies erfolgt nicht nur durch Wasseraustritt aus der Bandscheibe durch eine vorhandene Läsion, sondern auch durch den Verlust an wichtigen, osmotisch aktiven Molekülen. Das wichtigste dieser Moleküle ist Aggreccan, ein Proteoglycan, das aus zwei funktionellen Peptidketten, Chondroitinsulfat und Keratansulfat besteht. Es ist in der Lage in Verbindung mit Hyaluronsäure große Aggregate zu formen und so den osmotischen Druck der Bandscheibe zu gewährleisten. Aggreccan ist hauptsächlich im Nucleus pulposus und im inneren Anulus fibrosus extrazellulär anzutreffen (Akhtar und Mitarbeiter 2005; Roughley 2004; Beard und Mitarbeiter 1981).

Die Degeneration der Bandscheibe äußert sich weiterhin in einem Rückgang der Konzentration von Aggreccan. Dieser Rückgang selbst unterliegt diversen möglichen Ursachen (Roughley und Mitarbeiter 2006; Pearce und Mitarbeiter 1987). Im Laufe des Wachstums und der Alterung eines Individuums verändert sich der biochemische Aufbau seiner Bandscheiben. Die noch im Jugendalter vorhandenen peripheren Blutgefäße verschwinden und überlassen die Versorgung und den Stoffaustausch der Bandscheibe der Diffusion, welche stark vom Wassergehalt und in Folge dessen, von der Konzentration an Proteoglycan abhängig ist (Roughley 2004; Pearce und Mitarbeiter 1987). Da für die Synthese von Chondroitinsulfat eine Oxidation von Glucuronsäure notwendig ist, wird mit zunehmendem Alter des Individuums auf Grund der geringeren Sauerstoffversorgung der Bandscheibe immer weniger Chondroitinsulfat, dafür immer mehr Keratansulfat gebildet, für dessen Synthese Galaktose notwendig ist (Roughley und Mitarbeiter 2002; Scott und Mitarbeiter 1989; Pearce und Mitarbeiter 1987). Die Vergrößerung der Entfernung zwischen der Peripherie der Bandscheibe und dem Nucleus pulposus führt somit zu einer Anreicherung von Keratansulfat im Aggreccan auf Kosten von Chondroitinsulfat.

Ein weiterer Aspekt der Alterung ist die Abnahme des pH-Wertes der Matrix, in Folge dessen die Synthese von Proteoglycanen in der Matrix durch Chondrozyten oder Fibroblasten vermindert wird (Hadjipavlou und Mitarbeiter 2008; Ohshima und Urban 1992). Die

Veränderungen, die bei der Alterung des Individuums in der Bandscheibe in Bezug auf die Proteoglycane geschehen, sind von denen, die bei der Degeneration zustande kommen, kaum zu unterscheiden (Roughley und Mitarbeiter 2004; Pearce und Mitarbeiter 1987).

Bei vorangeschrittener Bandscheibendegeneration reichern sich Spaltprodukte des Proteoglycans in der Matrix an. Dies sind Keratansulfat, Hyaluronsäure und Linker-Protein-Reste. Sie entstehen als Folge der Erhöhung der Enzymaktivität der sogenannten Aggrecanasen wie ADAMTS-4 und ADAMTS-5, die zur Familie der Metalloproteinasen gehören (Hadjipavlou und Mitarbeiter 2008; Roughley und Mitarbeiter 2006 und 2002). Verschiedene Zytokine, die in der Matrix ausgeschüttet werden, hemmen die Synthese der Matrix durch die Chondrozyten und die Ausschüttung von TIMPs, was eine Erhöhung der Aktivität der Metalloproteinasen zur Folge hat. Diese Zytokine werden von Makrophagen produziert, die im Laufe der Degeneration in die Bandscheibe gelangen. Diese Makrophagen produzieren außerdem Superoxid ( $O_2^-$ ), das in der Lage ist Hyaluronsäure zu zersetzen, was zur Folge hat, dass Aggrecan deaggregiert. Ferner hemmt Superoxid die Proliferation und Synthese der Chondrozyten (Hadjipavlou und Mitarbeiter 2008; Shinmei und Mitarbeiter 1989). Bei der Bandscheibendegeneration wird durch Zersetzung der Aggrecan-Aggregate und der Monomere selbst eine Keratansulfatkonzentration-Erhöhung induziert, weshalb diese Fragmente dann frei in der Matrix und sogar im Blutplasma nachweisbar werden (Kuiper und Mitarbeiter 1998).



**Abbildung 10** Darstellung von Aggrecan-Aggregat in Degeneration, beziehungsweise Reparatur von Aggrecan. LP: Linker-Protein, G1-G3: Globuläre Protein-Domäne 1-3, IGD: Inter-globuläre Domäne, KS: Keratansulfat, CS: Chondroitinsulfat.

Mit freundlicher Genehmigung von: P.J Roughley, M. Alini and Antoniou. **The role of proteoglycans in aging, degeneration and repair of the intervertebral disc.** Biochem Soc. Trans. 2002 Nov; 30 (Pt 6): 869-74.

<http://www.biochemsoctrans.org/>

Eine Erhöhung von Aggrecan in anderen Zonen der Bandscheibe, wie zum Beispiel im inneren und im äußeren Anulus fibrosus, stellt ein Reparaturmechanismus dar, bei dem das Bandscheibengewebe noch versucht, der Degeneration entgegenzuwirken. Aus diesem Grund wird in der Literatur die Verminderung der Keratansulfat-Konzentration der Bandscheibe als ein Indikator für die Bandscheibendegeneration angesehen. Diese Verminderung der Keratansulfat-Konzentration findet aber, laut Literatur, erst bei einem chronischen Verlauf der Degeneration statt, während die oben erwähnte Erhöhung der Keratansulfat-Konzentration als eine akute Folge der Degeneration angesehen wird (Roughley und Mitarbeiter 2004; Robinson und Mitarbeiter 1998).

#### 2.2.6 Erhöhung der Metalloproteinasen-Konzentration

Metalloproteinasen werden durch Matrixzellen synthetisiert und erfüllen Abbauaufgaben in der Matrix. Da die Integrität der Matrix durch das Gleichgewicht zwischen Synthese, Akkumulation und Abbau von Matrixmolekülen determiniert wird, sind Metalloproteinasen ein geeigneter Indikator für den Grad der Degeneration in der Bandscheibe (Liang und Mitarbeiter 2010; Lyons und Mitarbeiter 1981).

MMP 13 besitzt eine Substratspezifität für Kollagen Typ I, II, III und Gelatine. Ferner ist MMP 13 auch in der Lage Aggrecan und Perlecan abzubauen (Rajeshwar und Mitarbeiter 2007; Leeman und Mitarbeiter 2002). Die größte Affinität besitzt MMP 13 aber für Kollagen Typ II, wobei MMP 13 die höchste Aktivitätsrate aller anderen MMPs besitzt (Leeman und Mitarbeiter 2002). Zusätzlich reagiert MMP 13 auf Bandscheibendegeneration mit einer, im Vergleich zu den anderen MMPs, sehr ausgeprägten Erhöhung ihrer Konzentration in der Bandscheibenmatrix und vor allem im Nucleus pulposus (Le Maitre und Mitarbeiter 2004). Diese Erhöhung wird unter anderem durch die Ausschüttung von Zytokinen durch Makrophagen verursacht, die nach einer Läsion in die Bandscheibe einwandern (Hadjipavlou und Mitarbeiter 2008; Roughley 2004). Ferner fand früher MMP 13 Anwendung in der Tumordiagnose, vor allem von Mammatumoren und wird heutzutage zur Diagnose von chronischen Hepatopathien herangezogen (Consolo und Mitarbeiter 2009; Balbín und Mitarbeiter 1999).

#### 2.2.7 Protein Gene Product 9.5 und Neoinnervation

Die Innervation der Bandscheibe im unveränderten Zustand wurde bereits am ovinen Modell qualitativ und quantitativ untersucht (Fagan und Mitarbeiter 2003). Studien an verschiedenen Spezies belegen, dass in gesunden Bandscheiben nur in dem äußeren Anulus fibrosus bis in eine Tiefe von 3 Lamellen, beziehungsweise bei Menschen etwas 3,5 mm Tiefe, Nervengewebe nachweisbar ist (Palmgren und Mitarbeiter 1999; Cavanaugh und Mitarbeiter 1995; Jackson und Mitarbeiter 1966).

Protein Gene Product 9.5 (PGP 9.5), auch bekannt als Ubiquitin-Carboxyl-Terminal-Hydrolase-1 (UCH-L1), ist ein 25 kDa Protein (Piccinini und Mitarbeiter 1996), das dank seines reichlichen Vorkommens im Zellplasma von Neuronen als allgemeiner Neuronenmarker Verwendung findet. Als Mitglied der Familie der Ubiquitin-Carboxyl-Terminal-Hydrolasen ist PGP 9.5 an der Hydrolyse von Estern und Amiden am Glycin-Carboxyl-Terminus von Ubiquitin, an der Lyse von Peptiden aus Polyubiquitin-Komplexe, sowie an der Verarbeitung von Genprodukten von Ubiquitin beteiligt (Piccinini und Mitarbeiter 1996; Wilkinson 1997). Ferner wurde PGP 9.5 in der Vergangenheit als Marker

für die Diagnose von Tumoren neuralen Ursprungs verwendet (Ermisch und Schwechheimer 1995).

Studien haben bei gesunden Bandscheiben nur eine spärliche Innervation der äußeren Lamellen des Anulus fibrosus vor allem in Verbindung mit seiner Vaskularisation beschrieben (Konttinen und Mitarbeiter 1990). Der innere Anulus fibrosus und der Nucleus pulposus bleiben aber trotz ausgeprägter Vaskularisation physiologischerweise aneural (Urban und Roberts 2003; Brown und Mitarbeiter 1997). Selbst bei fortgeschrittener Bandscheibendegeneration bleibt der Nucleus pulposus in der Regel frei von Nervenfasern. Bei degenerierten Bandscheiben reichen diese aber im Gegensatz zu gesunden Bandscheiben bis in den inneren Anulus fibrosus und ihre Anzahl ist im Vergleich zum normalen Anulus fibrosus erhöht (Melrose und Mitarbeiter 2002). Die Endplatten, die im physiologischen Zustand spärlich innerviert sind, zeigen bei degenerierten Bandscheiben eine höhere Nervenfaserdichte (Brown und Mitarbeiter 1997). Es wurde außerdem in degenerierten Bandscheiben ein Hineinwachsen von Nervenfasern bis in den Nucleus pulposus beschrieben (Freemont und Mitarbeiter 1997).

### 2.2.8 Veränderung der Kollagenverhältnisse

In der Bandscheibe ist Kollagen Typ I für die Druckfestigkeit zuständig und vorwiegend in deren Peripherie anzutreffen. In der Literatur wird bei der Untersuchung der Bandscheibendegeneration einer Konzentrationsveränderung von Kollagen Typ I keine große Relevanz beigemessen (Raj 2008; Urban und Roberts 2003; Guiot und Mitarbeiter 2000; Kääpä und Mitarbeiter 1995; Beard und Mitarbeiter 1980), vielmehr dem Verhältnis von Kollagen Typ I zu Typ II in der Übergangszone zwischen dem Nucleus pulposus und dem Anulus fibrosus. In dieser Zone tritt mit Fortschreiten der Degeneration eine Verminderung der Konzentration von Kollagen Typ II und eine Konzentrationserhöhung von Kollagen Typ I auf.

Das auch zu den fibrillären Kollagenen gehörende Kollagen Typ II ist die im Gelenkknorpel am stärksten vorhandene Kollagenart. Kollagen Typ II ist für die Zugfestigkeit der Bandscheibe verantwortlich. Es kommt in der Bandscheibe im Nucleus pulposus vor, wo es Kollagen Typ I weit überwiegt (Beard und Mitarbeiter 1980 und 1981). In den Übergangszonen herrscht ein entgegengesetzter Gradient zwischen Kollagen Typ I und II. In der Nähe des Nucleus pulposus herrscht eine höhere Konzentration von Kollagen Typ II, während der Gradient zugunsten des Kollagens vom Typ I in Richtung Anulus fibrosus zunimmt (Hoogendoorn und Mitarbeiter 2008; Urban und Roberts 2003; Bernard und Mitarbeiter 2000). Die Endplatten bestehen ausschließlich aus Kollagen Typ II (Roberts und Mitarbeiter 1991). Bei Eintritt der Degeneration wird eine Verminderung der Menge an Kollagen Typ II in den Endplatten beobachtet. In den frühen Phasen einer experimentell induzierten Degeneration wird eine Erhöhung des Kollagengehaltes in der Bandscheibe durch eine erhöhte Expression von Kollagen Typ II-mRNA (Messenger-Ribonukleinsäure) beobachtet. Diese anfängliche Erhöhung lässt aber durch die enzymatische Aktivität nach (Hoogendoorn und Mitarbeiter 2008; Bernard und Mitarbeiter 2000).

## 2.3 Therapiemethoden in der Humanmedizin

Die chirurgische Standardmethode bei einem Bandscheibenvorfall ist die minimal-invasive Mikrodiskektomie. Jedoch wurden in den letzten Jahren neuartige Methoden mit unterschiedlichen Vor- und Nachteilen für die Patienten entwickelt.

### 2.3.1 Nukleotomie

Die Nukleotomie hat zum Ziel Nucleus-Material chirurgisch zu entfernen und den Druck im Innern der Bandscheibe zu senken. Dieses Verfahren hat meist nur eine kurzfristige Besserung des Patientenzustandes zur Folge. Langfristig entstehen aber infolge der Narbenbildung und Degeneration der Bandscheibe weitere Beschwerden. Außerdem entstehen durch die Präparation der Muskulatur des Patienten bei der offenen Operation erhebliche postoperative Schmerzen (Li und Mitarbeiter 2008). Heutzutage wird die minimal-invasive perkutane Nukleotomie bevorzugt. Bei der Durchführung einer perkutanen Nukleotomie wird eine Sonde durch einen kleinen Schnitt perkutan zur Bandscheibe geführt. Die Prozedur wird mittels CT oder Röntgen überwacht. Durch die Sonde können dann hervorgetretenes Gewebe abgesaugt oder spezielle Instrumente zum Entfernen des Vorfalls eingeführt werden. Die „Percutaneous Laser Disc Decompression“ (PLDD) stellt eine Alternative dar. Die Sonde wird bis zum Innern der Bandscheibe eingeführt und mit einer dünnen optischen Faser bestückt. Die optische Faser leitet dann einen Laserstrahl, welcher das Nucleusgewebe verdampft. Auf diese Weise wird Nucleusgewebe aus der Bandscheibe entfernt und der Druck im Nucleus pulposus erniedrigt. Die perkutanen Methoden haben den Vorteil, dass während der Operation wenig Gewebe beschädigt wird und können sogar unter lokaler Anästhesie durchgeführt werden. In der Literatur wird über Erfolgsquoten von 80% berichtet (Schenka und Mitarbeiter 2006). Langfristig ist aber mit dem Auftreten von Degenerationserscheinungen bei den behandelten Bandscheiben zu rechnen (Singh und Mitarbeiter 2009; Ogon und Mitarbeiter 1997). Es ist außerdem unmöglich mit dieser Methode Sequester zu entfernen.

#### 2.3.1.1 Intradiscal Electrothermal Therapy

Bei der Intradiscal Electrothermal Therapy (IDET) handelt es sich um eine minimal-invasive Methode, bei der ein Katheter in den Anulus fibrosus hineingeschoben wird und diesen erhitzt. Durch die Hitze wird das im Anulus proliferierende Nervengewebe zerstört und die Kollagenfasern verschmolzen, so dass die Elastizität der Bandscheibe wesentlich vermindert wird. Dadurch sollen sich idealerweise die Schmerzen vermindern und eine erneute Prolapsbildung wird durch die Verfestigung des Nucleusgewebes erschwert (Kloth und Mitarbeiter 2008; Andersson und Mitarbeiter 2006; Heary 2001).

#### 2.3.2 Mikrochirurgische Sequesterektomie (Mikrodiskektomie)

Die Mikrodiskektomie gehört zu den Standardmethoden der Bandscheibenoperationen. Hierbei wird minimal-invasiv ein Zugang zum betroffenen Segment gelegt und mit Hilfe eines Operationsmikroskops oder einer Lupe das natürliche Knochenfenster (Foramen intervertebralis) zwischen den zwei nebeneinander liegenden Wirbelkörpern zugänglich gemacht. Dieses Fenster wird bei Bedarf erweitert, so dass der Bandscheibenvorfall und die betroffene Nervenwurzel zum Vorschein kommen. Anschließend wird der Bandscheibenvorfall entfernt und so der Nerv vom mechanischen Druck befreit (Chin und Mitarbeiter 2008; Perez-Cruet und Mitarbeiter 2002). Es wird auch kontrolliert, ob im

umliegenden Gewebe noch Sequester vom Bandscheibenmaterial liegen. Als Letztes wird in der Regel das freiliegende Rückenmarkssegment und die Nervenwurzel mit körpereigenem Fett bedeckt und die Wunde verschlossen (Ogon und Mitarbeiter 1997).

### 2.3.3 Autologe Chondrozyten-Transplantation

Eine weitere Möglichkeit der Therapie stellt die Transplantation von Matrixzellen dar. Diese Methode wird Autologous Disc Chondrocyte Transplantation (ADCT) genannt. Dazu werden Matrixzellen, genauer gesagt Chondrozyten, von gesunden Bandscheiben des Patienten entnommen und *in vitro* kultiviert, so dass eine größere Anzahl an gesunden, aktiven Zellen in die pathologische Bandscheibe transplantiert werden kann. Diese Zellen sollen durch ihren normalen Metabolismus zur Wiederherstellung und Erhaltung der physiologischen Bandscheibenmatrix beitragen (Meisel und Mitarbeiter 2007 und 2006).

### 2.3.4 Fusion/Spondylodese

Durch Fusion werden zwei Wirbelkörper miteinander verbunden, so dass sie sich gegeneinander nicht mehr bewegen können. Diese Methode wird, wenn sie bei anderen Gelenken durchgeführt wird, Ankylosierung genannt. Knochenimplantate, entweder vom Patienten selbst oder aus einer Knochenbank, werden zwischen den Wirbeln fixiert, um die zwei Wirbel miteinander zu verschmelzen. Meistens findet vor dem Einsetzen der Implantate eine Diskektomie statt. Um die Primärstabilität zu erhalten und Pseudoarthrosen zu verhindern kann zusätzlich zu den Implantaten ein Fixateur benutzt werden, der die Wirbelkörper während der Knochenheilung fixiert (Loguidice und Mitarbeiter 1988). Bei Wirbelfrakturen, ist die Fusion häufig ein notwendiger Bestandteil der chirurgischen Versorgung. Spondylolisthese oder Instabilität sind weitere Indikationen für die Fusion. Nach einer Halswirbeldiskektomie werden in der Regel die Wirbelkörper miteinander fusioniert, während es bei einer lumbalen Diskektomie nicht immer der Fall ist. Die Rehabilitation nach einer Fusionsoperation dauert länger als bei anderen chirurgischen Eingriffen an der Wirbelsäule. Nach der Heilung bleiben die fusionierten Segmente in aller Regel beschwerdefrei (Sun und Mitarbeiter 2009). Der Nachteil dieser Methode besteht darin, dass die an das Operationsgebiet anschließenden Wirbelgelenke vermehrt belastet werden und ihre Degeneration beschleunigt werden kann (Schlegel und Mitarbeiter 1996).

### 2.3.5 Dynesys

Dynesys, (Dynamic Neutralisation System), vertrieben von ZIMMER SPINE® (Freiburg, Deutschland), ist ein System bestehend aus Titanschrauben, die in den Wirbelkörper eingebracht werden und durch einen Distanzhalter auf jeder Seite der Wirbel verbunden sind. Damit werden die betroffenen Segmente stabilisiert, ohne sie komplett zu immobilisieren (Stoll und Mitarbeiter 2002). Die Segmente werden in ihre ursprüngliche Position gebracht und dort stabilisiert. Eine gewisse Beweglichkeit der Segmente bleibt dabei erhalten. Der Eingriff erfolgt von dorsal. Die betroffenen Segmente werden freigelegt und die Titanschrauben beidseitig durch die Pedikel in die Wirbelkörper eingebracht. Die Schrauben werden dann mit zwei Distanzhaltern aus Sulene-Polycarbonateurethan (PCU) miteinander verbunden, durch die eine Kordel aus Sulene-Polyethylenterephtalat (PET) gezogen wird, die mit den Pedikelschrauben verbunden wird. Beugebewegungen der Wirbelsäule werden durch die elastische Kordel begrenzt, die Distanzhalter limitieren Streckbewegungen. Der Erhalt der

Beweglichkeit für den Patienten ist der größte Vorteil des Dynesys (Lee und Mitarbeiter 2008; Bothmann und Mitarbeiter 2008; Schwarzenbach und Mitarbeiter 2005).

### 2.3.6 Soft-Fixation System

Die Firma SYNTHES<sup>®</sup> entwickelte das experimentelle Soft Fixation-System (SoFi) zur Behandlung von Bandscheibendegenerationen. Dieses Implantat setzt das gleiche Prinzip wie das bereits erklärte Dynesys-Implantat von ZIMMER SPINE<sup>®</sup> ein. Das SoFi-System besteht aus vier Pedikelschrauben, vier Schraubenköpfen und vier dazugehörigen Verschlusskappen aus Titanlegierung sowie vier Stäben aus Reintitan, die paarweise durch ein Gelenkteil aus Sulene-PCU-Kunststoff verbunden sind. Durch das Einbringen der Pedikelschrauben in die Wirbelkörper erhält das Implantat die nötige Befestigung. Die 3D-Schraubenköpfe sind zugleich mit einer Vorrichtung zum Einsetzen der Titanstäbe, als auch mit einem internen Gewinde zum Einbringen der Verschlusskappen versehen. Sind die Titanstäbe auf die 3D-Schraubenköpfe gesetzt, werden diese durch die Verschlusskappen auf die 3D-Schraubenköpfe befestigt.

Das SoFi-Implantat verleiht dem betroffenen Wirbelsäulensegment durch die Titanstäbe gleichzeitig Stabilität und Entlastung. Der Druck, der auf das Segment wirkt, wird durch die Pedikelschrauben auf die Titanstäbe übertragen. Gleichzeitig gewährleistet das Gelenkteil eine gewisse Beweglichkeit des Wirbelgelenks, die die Range of Motion (ROM) des betroffenen Segments sowie der gesamten Wirbelsäule so gut wie möglich erhalten sollen (Lee und Mitarbeiter 2008). SYNTHES<sup>®</sup> versuchte mit diesem experimentellen Implantat die einfache Anwendbarkeit des Click'X Schraubensystems und die dynamische Stabilisationsmethode zu kombinieren.

## 2.4 Schafe als Modell für Bandscheibenstudien

Verschiedene Tierspezies sind auf ihre Eignung als Tiermodelle für Bandscheibenbeziehungsweise Wirbelsäulenstudien getestet worden (Sheng und Mitarbeiter 2010; Alini und Mitarbeiter 2008). Dazu wurden die physiologischen und nach induzierter Degeneration auch pathologischen Parameter der Bandscheibe beziehungsweise Wirbelsäule gemessen. Untersuchte Parameter sind die biomechanischen Charakteristika der Wirbelsäule und die Komposition der einzelnen Bandscheiben. Anschließend wurden die Ergebnisse dieser Untersuchungen mit den entsprechenden Parametern der menschlichen Bandscheibe beziehungsweise Wirbelsäule verglichen, um so die Eignung der einzelnen Spezies als Tiermodell zu beurteilen (Kettler und Mitarbeiter 2007; Singh und Mitarbeiter 2005).

In einer Studie von Wilke und Mitarbeitern aus dem Jahr 1997 wurden die biomechanischen Eigenschaften der Wirbelsäulen von Schafen untersucht. Die Range Of Motion (ROM) von Wirbelsäulensegmenten wurde anhand verschiedener biomechanischer Tests ermittelt. Die Ergebnisse wurden mit denen in der Literatur vorhandenen, experimentell ermittelten Werten für Menschen verglichen (Wilke 1996; Adams 1995). Das Ergebnis der Studie von Wilke deutet darauf hin, dass die ovine Wirbelsäule mit der des Menschen vergleichbar ist. Ein direkter Vergleich zwischen ovinen und menschlichen Wirbelsäulen wurde ebenfalls durchgeführt (Kandziora und Mitarbeiter 2001). In dieser Studie wurden die Halswirbelsäulen von Menschen und Schafen anatomisch, radiologisch und biomechanisch miteinander verglichen, mit dem Ergebnis, dass ovine Halswirbelsäulen als experimentelle Tiermodelle für Bandscheibenstudien geeignet sind.

Ein Argument gegen die Anwendung von Tiermodellen für Wirbelsäulenstudien ist die unterschiedliche Belastungsart, welche die Wirbelsäulen von Vierbeinern, im Vergleich zu Zweibeinern ertragen muss. Allerdings nennt Smit 2002 in seiner Studie “The use of a quadruped as an in vivo model for the study of the spine – biomechanical considerations” biomechanische Gründe für die Annahme, dass bei Vierbeinern die Belastung, die die Wirbelsäule erfährt, nicht unterschiedlich zu der Belastung auf die Wirbelsäule eines Zweibeiners ist.

2002 untersuchten Reid und Mitarbeiter alle Bandscheiben zwischen den Lendenwirbeln von drei Schafen nach ihrem Wasser- sowie Kollagengehalt und nach der Orientierung der Kollagenfasern. Dafür wurden die Bandscheiben in drei Zonen unterteilt: Nucleus pulposus, äußerer Anulus fibrosus und innerer Anulus fibrosus. Der Vergleich des Resultats mit Daten humaner Bandscheiben zeigte, dass ovine Bandscheiben ein geeignetes Tiermodell darstellen.

Nicht nur biomechanische und biochemische Charakteristika sprechen für die Verwendung von Schafen als Modell für Bandscheibenstudien (Guder und Mitarbeiter 2009; Kandziora und Mitarbeiter 2001). Die durchschnittliche Masse der Tiere ist mit 82 kg vergleichbar der eines erwachsenen Menschen. Außerdem sind Kosten und Aufwand der Haltung der Tiere im Vergleich mit anderen tierischen Modellen vorteilhaft (Singh und Mitarbeiter 2005). Inzwischen ist das ovine Wirbelsäulenmodell in der Erforschung der Pathophysiologie und der Therapie in der Wirbelsäulenmedizin weit verbreitet (Heineck und Mitarbeiter 2010; Goldschlager und Mitarbeiter 2010; Kandziora und Mitarbeiter 2004).

### 3. Tiere, Material und Methoden

#### 3.1 Untersuchte Tiere

Für die vorliegende Studie wurden 40 zweijährige, reinrassige Merinolandschafe als Versuchstiere verwendet. Alle Tiere wurden zum Anfang der Studie tierärztlich untersucht, um kranke und trächtige Tiere von der Studie auszuschließen. Es wurden in die Studie nur weibliche Tiere aufgenommen, um Unruhen und Rankämpfe möglichst zu vermeiden. Nach der Eingangsuntersuchung wurde den Tieren Prostaglandin F 2 $\alpha$  (ILIREN<sup>®</sup>, Intervet Deutschland GmbH, Unterschleissheim) verabreicht. Diese Maßnahme diente dazu, mögliche Trächtigkeiten im Frühstadium zu unterbrechen. Zusätzlich bekamen die Tiere eine Paramunisierung mittels Parapox ovis (BAYPAMUNE<sup>®</sup>, Bayer AG, Leverkusen, Deutschland) und eine Behandlung gegen Endo- und Ektoparasiten mit Ivermectin (IVOMEC<sup>®</sup>, Merial, Hallbergmoos, Deutschland). Das durchschnittliche Körpergewicht der Tiere betrug 80 kg +/- 10%. Alle Tiere stammten aus Freilandhaltung. Zu den jeweiligen Operationsterminen wurden die Tiere in die tierexperimentelle Einrichtung der Charité – Campus Virchow-Klinikum transportiert. Dort wurden sie in den Stallungen auf Einstreuspänen und Stroh bis zwei Wochen post operationem gehalten. Die Einstreu wurde zweimal wöchentlich gewechselt. Danach wurden sie zurück in Freilandhaltung verlegt. Dort erhielten sie zweimal täglich Heu. Mineral und Lecksteine standen den Tieren jederzeit zur Verfügung. Das Projekt wurde von den zuständigen Behörden mit der Tierversuchsnummer Reg 0038/04 genehmigt.

#### 3.2 Gruppeneinteilung

Die vierzig Tiere wurden in vier Gruppen zu je zehn Tieren unterteilt. Alle Tiere gehörten in eine Alters- und eine Behandlungsgruppe. Die Altersgruppen wurden nach der Zeit, nach der die Tiere euthanasiert wurden (3- und 12-Monate-Gruppe) benannt. Die Behandlungsgruppen wurden danach benannt, ob die jeweiligen Tiere nur eine partielle Nukleotomie (Läsion-Gruppe) oder zusätzlich zur Nukleotomie auch das Implantat SoFi implantiert bekamen (Implantat-Gruppe). Daraus entstanden eine 3-Monate-Läsion-Gruppe, eine 3-Monate-Implantat-Gruppe, eine 12-Monate-Läsion-Gruppe und eine 12-Monate-Implantat-Gruppe mit jeweils 10 Tieren.

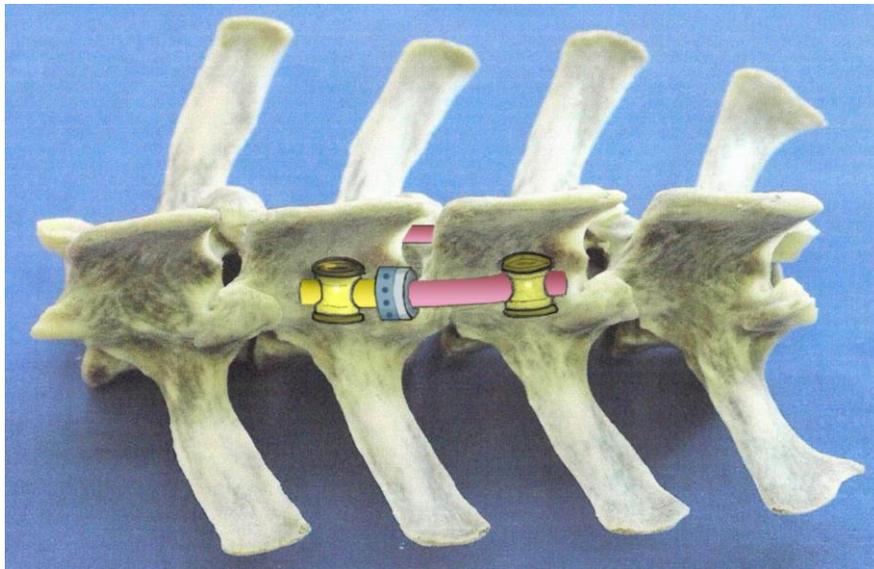
Die sich daraus ergebende Gruppeneinteilung sah folgendermaßen aus:

**Tabelle 1** Gruppeneinteilung der Tiere für die vorliegende Studie

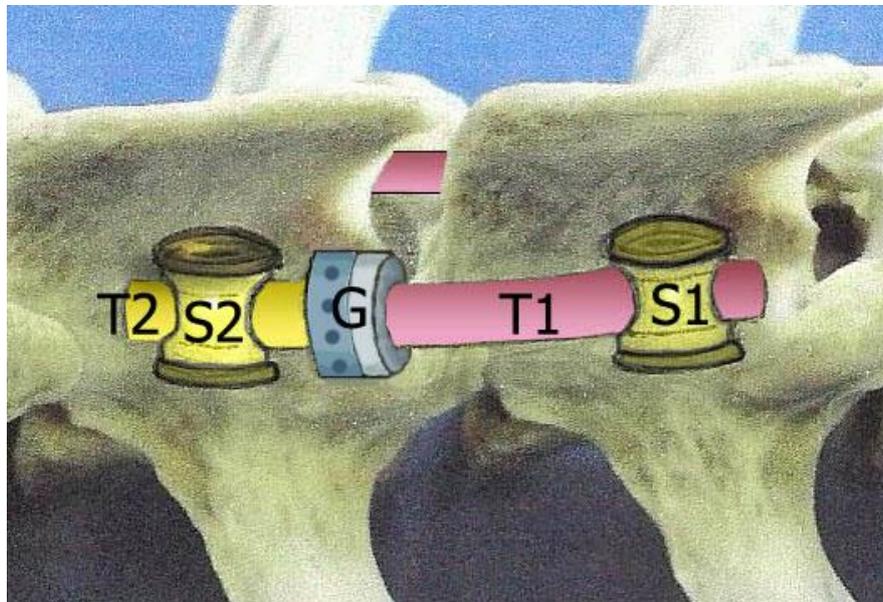
Altersgruppe	Behandlungsgruppe	Anzahl der Tiere
3-Monate	Läsion	10
3-Monate	Implantat	10
12-Monate	Läsion	10
12-Monate	Implantat	10

### 3.3 Das SoFi-Implantat

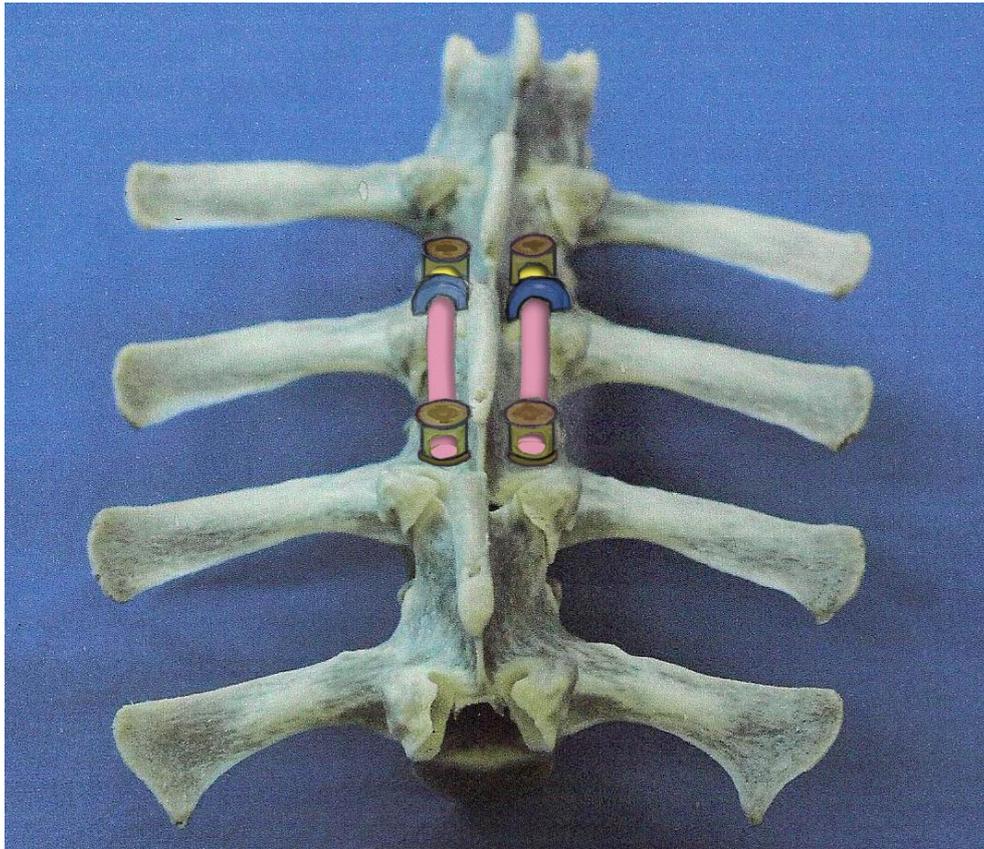
Das Implantat und die dazugehörigen Werkzeuge werden steril verpackt geliefert. Eine genaue Beschreibung des SoFi Implantates ist auf Seite 20 erläutert.



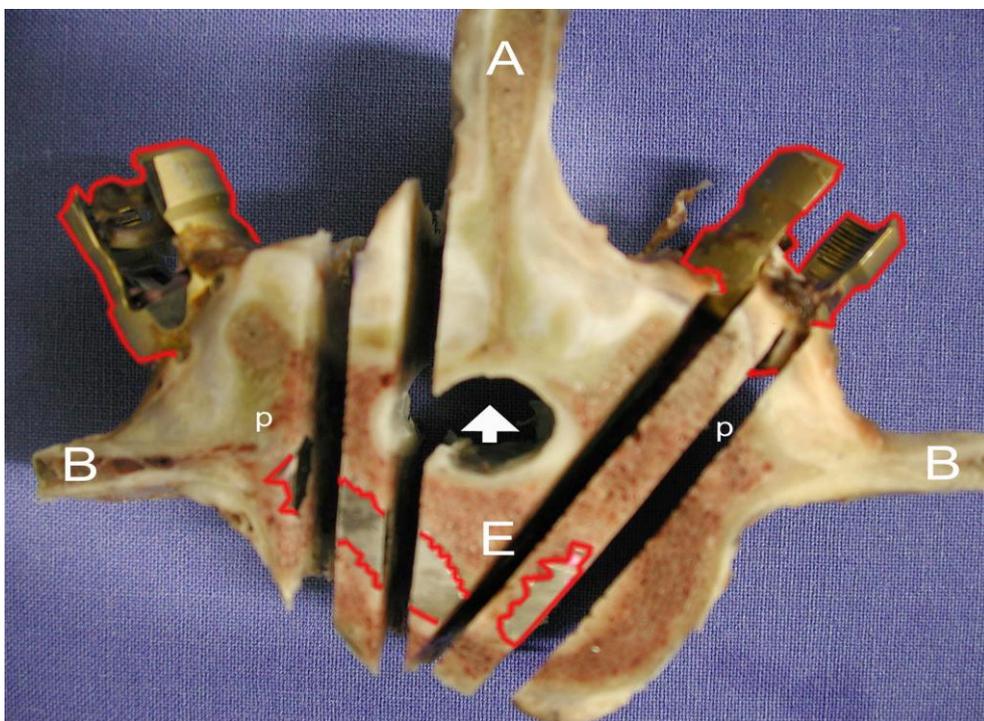
**Abbildung 11** Das SoFi-System in Modell auf einer präparierten Wirbelsäule.



**Abbildung 12** SoFi-System auf einer präparierten Wirbelsäule. T1 und T2: Titanstäbe; S1 und S2: Schraubenköpfe; G: Gelenkteil aus Sulene-PCU-Kunststoff.



**Abbildung 13** Das SoFi-System in einer Sicht von anterior-dorsal



**Abbildung 14** Präpariertes SoFi-Implantat. Analog der Abb.1: A: Processus spinosus; B: Processus transversus; E: Corpus vertebrae; p: Pediculus; der weiße Pfeil zeigt in den Rückenmarkskanal. Rot eingerahmt sind die Pedikelschrauben des SoFi Systems, beidseitig oben die Schraubenköpfe an denen die Distanzhalter befestigt wurden, unten die Gewinde die in den Wirbelkörper hineingeschraubt wurden

### 3.4 Chirurgische Eingriffe

#### 3.4.1 Vorbereitung

Vierundzwanzig Stunden vor dem geplanten Operationstermin erhielten die Tiere keine Nahrung. Nur Wasser stand ihnen nach wie vor ad libitum zur Verfügung. Die Tiere wurden in der „Sitz-Stellung“ fixiert und erhielten einen venösen Zugang in der Vena cephalica antebrachii. Die Narkose wurde durch intravenöse Injektion von 0,5-1,5 g Thiopental-Natrium (Trapanal<sup>®</sup>, Altana Pharma AG, Konstanz, Deutschland) und 0,1 mg Fentanylhydrochlorid (Fentanyl-Janssen<sup>®</sup>, Janssen-Cilag, Neuss, Deutschland) eingeleitet. Anschließend wurden die Reflexe kontrolliert bis das Tier sich im intubationsfähigen Zustand befand. Die Tiere wurden mit einem Endotrachealtubus (Mallinckrodt, Athlone, Irland) der Stärke 8-9 mm intubiert. Die Lage des Tubus wurde kontrolliert und anschließend fixiert. Um ein Aufgasen des Pansens zu vermeiden, wurde den Tieren eine Magensonde (Rüsch Ø 14 mm, Kernen, Deutschland) ebenfalls unter Kontrolle der korrekten Lage gelegt.



**Abbildung 15** Fixierung eines Schafes und Legen eines venösen Zugangs in der „Sitz-Stellung“.

Ein Monitoring System (Anästhesie Sulla 8000V, Drägerwerk AG, Lübeck, Deutschland) wurde zur Überwachung der Vitalwerte wie Sauerstoffsättigung, CO<sub>2</sub>-Sättigung, Herzfrequenz und Elektrokardiogramm (EKG) an den Tubus, an die Zunge und an die Beine des Tieres angeschlossen. Die Tiere wurden in Bauchlage auf dem Operationstisch fixiert und die Extremitäten abgepolstert. In dieser Position erfolgte die Rasur und Desinfektion des Operationsfeldes. Die Erhaltungsnarkose wurde mit Isofluran (Forene<sup>®</sup>, Abbott GmbH & Co.KG, Wiesbaden, Deutschland) und einem Sauerstoff-Lachgas-Gemisch (Verhältnis 60:40) durchgeführt. Über die Dauer der Operation erhielten die Tiere eine Elektrolytinfusion (Jonosteril<sup>®</sup>, Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Deutschland). Weiterhin wurde den Tieren 1 ml Pancuronium (Pancuronium Curamed<sup>®</sup>, CuraMED Pharma GmbH, Karlsruhe, Deutschland) i.v. injiziert.

Die Tiere wurden anschließend in den Operationssaal gebracht und mit sterilen Tüchern abgedeckt. Um die Lokalisation des Lendenwirbelsegments L3-L4 genau bestimmen zu können, wurden die Tiere unmittelbar vor Operationsbeginn radiologisch durchleuchtet (BV 25, Phillips, Hamburg, Deutschland) und die Lage des Intervertebralfachs L3-L4 mit einer 1er Kanüle markiert.

### 3.4.2 Partielle Nukleotomie

Etwa 3 cm distal der letzten Rippe und 8 cm links lateral der Querfortsätze wurde ein ca. 10 cm langer Hautschnitt gesetzt, der gerade nach kaudal parallel zur Wirbelsäule verlief. Die Bauchmuskelschichten bestehend aus den Bauchmuskeln (*Mm. obliquus externus et internus* und *M. transversus abdominis*) wurden entlang ihrer jeweiligen Faserrichtungen eröffnet. Nach Präparation des sich retroperitoneal befindenden *M. quadratus lumborum* konnte der *M. psoas major* dargestellt werden. Die Psoasfaszie wurde im Anschluss eröffnet. Nach Abheben des Psoasmuskel konnte das Lendenwirbelsäulensegment L3-L4 freigelegt werden. Es erfolgte eine Lokalisationskontrolle mit dem Röntgenbildverstärker (BV 25, Phillips, Deutschland). Dann wurde an der links lateralen Seite des Anulus fibrosus der Bandscheibe ein 5 mm x 5 mm x-förmiger Schnitt mit einem Skalpell gemacht und mittels eines 2 mm Rongeurs der Nucleus pulposus partiell ausgeräumt. Das Gewicht des entnommenen Nucleusmaterial wurde anschließend dokumentiert. Nach Wundspülung mit physiologischer Kochsalzlösung wurde die Wunde schichtweise verschlossen.

### 3.4.3 Einsatz des SoFi-Systems

Bei der Hälfte der Schafe wurde randomisiert nach der partiellen Nukleotomie auch das SoFi-System eingesetzt. Der Eingriff erfolgte unmittelbar nach der Nukleotomie. Der etwa 12 cm lange Operationsschnitt wurde entlang der Dornfortsätze der Lendenwirbel L2 bis L5 gesetzt. Die paravertebrale, autochthone Muskulatur wurde vorsichtig abpräpariert und die dorsale Seite der Wirbelkörper L3 und L4 (*Proc. spinosus*, *Lamina arcus vertebrae*, *Proc. articularis cranialis* und *caudalis*) freigelegt. Im Anschluss wurde die Knochenkortikalis der Lendenwirbel L3 und L4 mit einem Pfriem eröffnet und mittels eines handgeführten Bohrers ein Kanal durch die Pedikel auf beiden Seiten des Dornfortsatzes gebohrt. In diese Kanäle wurden pro Wirbel zwei Titanschrauben des Click'x Pedikelschraubensystems (SYNTHES® Solothurn, Schweiz, 5,2 mm Stärke und 30 mm Länge) eingedreht, die der Verankerung des SoFi dienen. Anschließend wurde auf jede Schraube je ein 3D-Schraubenkopf aufgesetzt und befestigt. Der Abstand zwischen zwei 3D-Schraubenköpfe, die auf der gleichen Seite des Dornfortsatzes der Wirbel eingesetzt wurden, wurde mittels eines biegsamen Probestabes gemessen und dementsprechend die Länge der Stäbe aus Reintitan gewählt. Die Verschlusskappen wurden auf jeden einzelnen Schraubenkopf aufgesetzt, befestigt und das Implantat in seiner Lage somit stabilisiert. Zum Abschluss wurde die Wunde mit physiologischer Kochsalzlösung gründlich gespült und schichtweise verschlossen. Die Tiere erhielten ein analgetisches Hautpflaster (Fentanyl 75 mg, Durogesic®, Janssen-Cilag Pharma GmbH, Deutschland) bevor sie zur Kontrolle von lateral und dorsal geröntgt wurden.

Unmittelbar nach Beendigung der Narkose erhielten die Tiere als antibiotische Nachsorge 2,2 g Amoxicillin (Augmentan®, SmithKline Beechman Pharma, München, Deutschland) i.v. injiziert. Die Tiere wurden in die Stallungen gebracht, wo sie extubiert wurden. Vom Moment der Extubation bis zum vollständigen Erwachen standen die Tiere unter ständiger tierärztlicher Aufsicht. Futter, Wasser und Auslauf standen den Tieren sofort wieder zur

Verfügung. Aufgrund von Narkosenachwirkungen sind post operationem fünf Tiere gestorben, folgende Tabelle zeigt eine Übersicht der postoperativen Todesfällen:

**Tabelle 2** Überblick der Verluste und Zwischenfälle bei den Tieren.

Gruppe	Verstorbene Tiere	Todesursache	Anzahl verbliebener Tiere
3-Monate-Läsion	0	-	10
3-Monate Implantat	S65 S94	Narkosenachwirkung Narkosenachwirkung	8
12-Monate-Läsion	S51	Narkosenachwirkung	9
12-Monate-Implantat	S61 S64	Narkosenachwirkung Narkosenachwirkung	8

#### 3.4.4 Postoperative Nachsorge und Kontrollen

Bis zum fünften Tag post operationem erhielten die Tiere einmal täglich 0,5 g Metamizol-Natrium (Novaminsulfon-Ratiopharm<sup>®</sup>, Ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland) als analgetische Nachbehandlung i.m. verabreicht. Die Operationswunde wurde täglich kontrolliert und eine allgemeine, klinische Untersuchung der Tiere durchgeführt. Weiterhin wurden die Tiere sowohl einer Magnetresonanztomographie der gesamten Lendenwirbelsäule als auch röntgenologischen Untersuchungen des operierten Segmentes unterzogen. Die 3 Monate-Gruppen wurden 1 Woche und 4 Wochen post operationem radiologisch untersucht. Die 12-Monate-Gruppen wurden 1 Woche, 1 Monat, 2 Monate, 3 Monate, 6 Monate und 9 Monate post operationem radiologisch untersucht. Der radiologische Teil der Studie wird derzeit von einem anderen Doktoranden im Rahmen seiner Dissertation durchgeführt und analysiert.

#### 3.5 Tötung und Entnahme der Wirbelsäule

Nach Ablauf des Studienzeitraums wurden die Tiere wieder in die Stallungen der tierexperimentellen Einrichtung der Charité, Campus Virchow Klinikum transportiert. Die Tiere wurden durch intravenöse Injektion von 1 g Thiopental-Natrium (Trapanal<sup>®</sup>, Altana Pharma AG, Konstanz, Deutschland) und 0,1 mg Fentanylhydrogencitrat (Fentanyl-Janssen<sup>®</sup>, Janssen-Cilag, Neuss, Deutschland) anästhesiert. Der Tod wurde nach Eintritt der Bewusstlosigkeit durch intravenöse Injektion von Kaliumchlorid herbeigeführt. Der Eintritt des Todes wurde durch Auskultation des Herzens festgestellt und die Tiere wurden dann in den Sektionsraum transportiert.

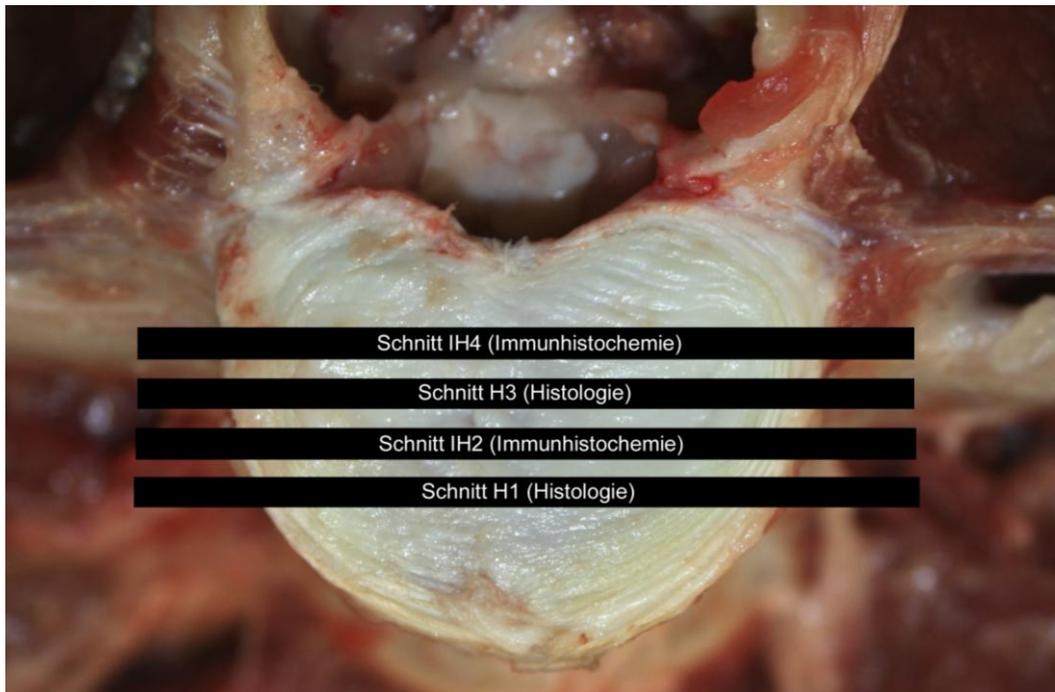
Im Sektionsraum wurde die Lendenwirbelsäule zusammen mit dem Kreuzbein mittels einer oszillierenden Säge (Aesculap Typ G-6100-05, Tuttlingen, Deutschland) herauspräpariert und vorsichtig von Muskeln und Sehnen befreit. Die Wirbelsäulen der Tiere wurden dann zur röntgenologischen und computertomographischen Untersuchung (CT) gebracht. Nach den radiologischen Untersuchungen wurden die Segmente für die biomechanischen Tests ins Labor zurückgebracht. Währenddessen wurden die Brust- und Bauchhöhlenorgane der Schafe herausgenommen und für die Untersuchungen zur Verträglichkeit auf die Implantate in

Kunststoffbehälter verpackt. Nach den biomechanischen Untersuchungen wurden die Anschlußsegmente L2-L3 und L4-L5 zusammen mit dem Hauptsegment L3-L4 vom Rest der Wirbelsäule abgetrennt und in Gefäße mit einer Formaldehyd-Alkohol-Lösung (Zusammensetzung: 324 ml Formol 36%ig, 540 ml Ethylalkohol 100%ig, 130 ml 0,1 molarer Barbital-Natrium-Puffer pH 7,4 sowie 6 g Glukose) ins Labor gebracht.

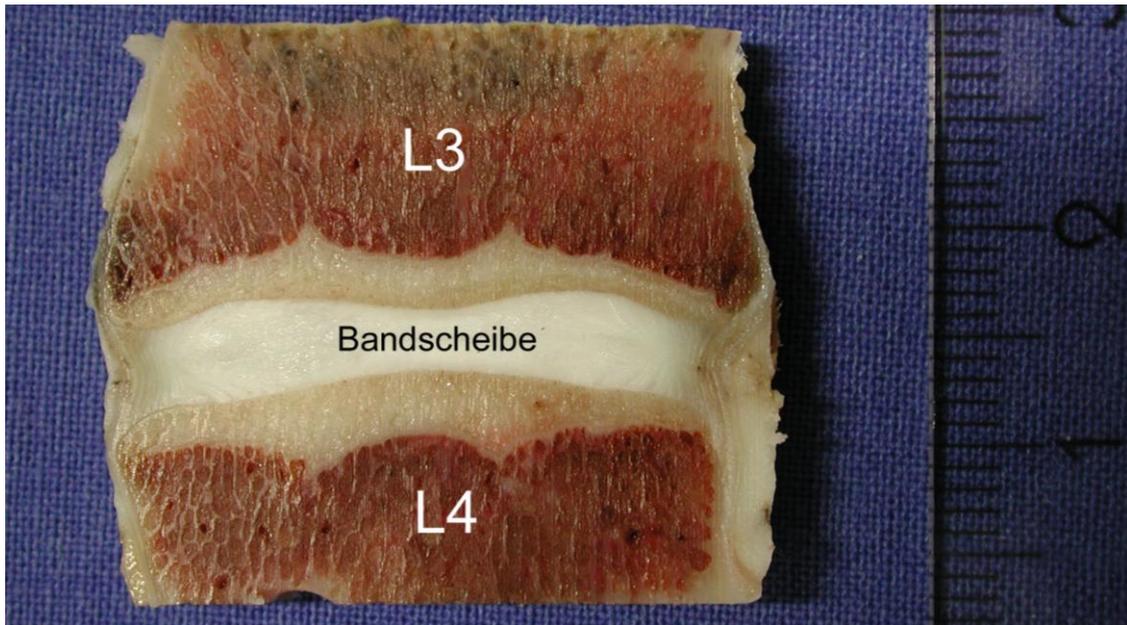
### 3.6 Immunhistochemische Untersuchung

#### 3.6.1 Vorbereitung der Proben

Die Segmente wurden nach zweiwöchiger Formaldehyd-Fixierung zehn Minuten lang mit Wasser gespült und mit einem Skalpell fein präpariert. Danach wurden sie mittels einer wassergekühlten Säge (Makrotrennschleifsystem, EXAKT<sup>®</sup>, Norderstedt, Deutschland) in 4 mm dicke, makroskopische Frontalschnitte geteilt. Jeder Schnitt bestand aus der Endplatte L3-L4 mit der dazwischen liegenden Bandscheibe. Jedes Segment wurde in vier makroskopische Schnitte gesägt, die nach dem Schaf sowie Lage und Zweck benannt wurden. H1 und H3 (Histologie 1 und 3) dienten den histologischen Untersuchungen die von einem anderen Mitglied des Projekts durchgeführt wurden (Guder 2008; siehe auch Seite 109), während IH2 und IH4 (Immunhistochemie 2 und 4) für die immunhistochemischen Untersuchungen verwendet wurden (siehe Abb. 16 und Abb. 17).



**Abbildung 16** Darstellung der makroskopischen Schnitte und ihrer Benennung



**Abbildung 17** 4 mm dicker, makroskopischer, frontaler Schnitt durch das L3-L4-Segment

IH2 und IH4 wurden in 40%ige Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) bei 37°C zur Entkalkung gelagert. Das EDTA wurde wöchentlich erneuert. Fünf Wochen später erfolgte die Einbettung der groben Schnitte in Paraffin. Die Paraffinblöcke wurden mit Hilfe eines Mikrotoms (LEICA<sup>®</sup>, Wetzlar, Deutschland) in 4 µm dünne Scheiben geschnitten und auf Objektträger aufgezogen. Die Proben wurden schließlich im Brutkasten bei 37 °C gelagert bis zum Tag, an dem sie untersucht wurden.

Probenverlust entstand in dieser Phase der Herstellung durch mangelnde Entkalkung trotz mehrwöchiger Inkubation mit 40%iges EDTA. Die Proben vom Tier S71 (3-Monate-Läsion) und S100 (3-Monate-Implantat) konnten aus diesem Grunde nicht immunhistochemisch analysiert werden. Bei einigen Proben wurde nur eine unvollständige Entkalkung erreicht, was dazu führte, dass aus diesen Tieren nur eine geringe Anzahl an Proben gewonnen werden konnte. Diese fehlenden Proben werden in den statistischen Tabellen als „Fehlende Proben“ angezeigt und wurden für die jeweiligen Untersuchungen nicht herangezogen.

### 3.6.2 Immunlokalisation von $\alpha$ -SMA

Zur Untersuchung der Bereitschaft zur Angiogenese in der Bandscheibe wurde der Mouse Anti-Human Smooth Muscle Actin-Antikörper der Firma DAKO<sup>®</sup> (Glostrup, Dänemark) in einer 1:100 Verdünnung verwendet. Alle Antikörper wurden mit Antibody Diluent (DAKO<sup>®</sup>, Glostrup, Dänemark) verdünnt.

Das Epitop für  $\alpha$ -SMA befindet sich in der N-terminalen Sequenz AcEEED (Skalli und Mitarbeiter 1986). Nullproben wurden durch Weglassen des primären Antikörpers hergestellt. Die Positivkontrollen entstanden aus laboreigenen Routinekontrollen von Aorten von Schafen und aus Gefäßeinsprossungen in den Proben ins umgebende Gewebe als interne Eigenkontrolle. Die Reaktivität dieses Antikörpers mit Gewebe von Schafen wurde bereits von anderen Studien ausgenutzt (Hastreiter und Mitarbeiter 2004; Melrose und Mitarbeiter 2002).

### 3.6.3 Immunlokalisation von Keratansulfat

Für die Untersuchung des Proteoglykangehaltes wurde der Mouse anti-bovine Keratan Sulfate, Corneal-Antikörper (USBiological<sup>®</sup>, Massachusetts, USA) in einer 1:1000 Verdünnung eingesetzt. Dieser Antikörper reagiert mit proteingebundenen Epitopen der Keratansulfat-Ketten von Hornhaut und Knorpel.

### 3.6.4 Immunlokalisation von MMP 13

Der Gehalt an Matrixmetalloproteinasen (MMP) der Bandscheiben wurde durch die Bestimmung des Gehaltes an MMP 13 (oder Kollagenase 3) untersucht. Dafür wurde der Antikörper von QED Bioscience<sup>®</sup> (San Diego, Kalifornien, USA) MMP 13 (Collagenase-3) Antibody in einer 1:1000 Verdünnung ausgewählt. Das Antigen ist die Gelenkregion des Enzyms (Rajeshwar und Mitarbeiter 2007).

### 3.6.5 Immunlokalisation von PGP 9.5

Die Untersuchung der Neuinnervation wurde mit dem Antikörper PGP 9.5 von BIOTREND<sup>®</sup> (Köln, Deutschland) in einer 1:500 Verdünnung durchgeführt. Die Reaktivität dieses Antikörpers gegen Gewebe von Schafen wurde in der quantitativen Studie von Fagan und Mitarbeiter 2003 belegt. Dieser Antikörper ist für den Nachweis von Nervenzellkörpern, Axonen im zentralen Nervensystem (ZNS) und in der Peripherie, Neurofibrillen im peripheren Gewebe, neuroendokrinen Zellen der Hypophyse, der Schilddrüse, des Pankreas sowie Tumoren des neuroendokrinen Systems geeignet (Harris und Mitarbeiter 1990).

### 3.6.6 Immunlokalisation von Kollagen Typ I und Typ II

Für die Untersuchung des Kollagengehalts wurden Kollagen Typ I und II herangezogen. Dafür wurden die Antikörper Anti-Collagen Typ I, Rind und Anti-Collagen Typ II, Rind verwendet, beide von der Firma Biologo<sup>®</sup> (Kronshagen, Deutschland). Die Reaktivität mit Gewebe von Schafen von diesem Antikörper wird auf dem Beipackzettel des Produktes angegeben. Beide Antikörper wurden für die Untersuchung in einer 1:100 Verdünnung eingesetzt. Die Untersuchung von Kollagen Typ I und Typ II setzte eine Antigendemaskierung bei allen Proben voraus. Zu diesem Zweck wurden alle Proben für vier Stunden bei 37 °C mit Hyaluronidase (Sigma<sup>®</sup>, Steinheim, Deutschland) vorbehandelt. Kollagen Typ II setzte zusätzlich eine 30 minütige Vorbehandlung mit Pepsin (Sigma<sup>®</sup>, Steinheim, Deutschland) bei 37 °C voraus.

Gewöhnlich wird in der Literatur von einem äußeren und einem inneren Anulus fibrosus gesprochen (Roberts und Mitarbeiter 1991). Da bei dieser Studie durch die Nukleotomie teilweise erhebliche Matrixverluste auftraten, wurde zur Messung der immunopositiven Flächen auf eine zusätzliche Unterteilung in äußeren und inneren Anulus fibrosus verzichtet. Dafür wurde die Übergangzone zwischen Nucleus pulposus und Anulus fibrosus untersucht, die unter physiologischen Bedingungen reich an Kollagen Typ II ist und dennoch auch einen Anteil an Kollagen Typ I besitzt (Beard und Mitarbeiter 1980). Die Endplatten, welche bei gesunden Bandscheiben fast ausschließlich aus Kollagen Typ II bestehen (Raj 2008; Roberts und Mitarbeiter 1991), wurden ebenfalls untersucht. In der vorliegenden Studie wurde den

Endplatten eine Höhe von 0,5 mm zugeteilt, da in der Literatur lediglich „weniger als 1 cm“ als Maß angegeben wird (Urban und Roberts 2003, Nickel und Mitarbeiter 1992).

### 3.6.7 Immunhistochemische Markierung

Vor der eigentlichen immunhistochemischen Markierung mussten die Gebrauchslösungen hergestellt werden:

- PBS-Puffer, pH 7,2 (Spülpuffer)

- Chroma<sup>®</sup>-Phosphatpufferkonzentrat: 1 Teil
- Destilliertes Wasser: 9 Teile

- Normalserum

- 5 ml PBS-Puffer
- 1 Tropfen Normalserum (Blockierungsserum vom Pferd, Vector Laboratories-Vectastain<sup>®</sup>, Burlingame, Kalifornien, USA)

- Primärantikörper

Um die Herstellung der Primärantikörper besser zu veranschaulichen, wurde eine Tabelle angefertigt:

**Tabelle 3** Überblick der verwendeten Antikörper.

Antigen	Bezeichnung	Herkunft	Verdünnung	Verdünnungsmittel
$\alpha$ -SMA	Monoclonal Mouse Anti-Human Smooth Muscle Actin (DAKO <sup>®</sup> , Glostrup, Dänemark)	Maus, monoklonal	1:100	Antibody Diluent (DAKO <sup>®</sup> , Glostrup, Dänemark)
Keratansulfat	Mouse anti-Bovine Keratan Sulfate, Corneal (USBiological <sup>®</sup> , Massachusetts, USA)	Maus, monoklonal	1:1000	Antibody Diluent (DAKO <sup>®</sup> , Glostrup, Dänemark)
MMP 13	MMP 13 Antibody (QED Bioscience <sup>®</sup> , San Diego, California, USA)	Kaninchen, polyklonal	1:1000	Antibody Diluent (DAKO <sup>®</sup> , Glostrup, Dänemark)
PGP 9.5	Protein Gene Product Antibody (BIOTREND <sup>®</sup> , Köln, Deutschland)	Kaninchen, polyklonal	1:500	Antibody Diluent (DAKO <sup>®</sup> , Glostrup, Dänemark)
Kollagen Typ I	Anti-Collagen Typ I, Rind (BioLogo <sup>®</sup> , Kronshagen, Deutschland)	Kaninchen, polyklonal	1:100	Antibody Diluent (DAKO <sup>®</sup> , Glostrup, Dänemark)
Kollagen Typ II	Anti-Collagen Typ II, Rind (BioLogo <sup>®</sup> , Kronshagen, Deutschland)	Kaninchen, polyklonal	1:100	Antibody Diluent (DAKO <sup>®</sup> , Glostrup, Dänemark)

- Biotinylierter Zweitantikörper
  - 5 ml PBS-Puffer
  - 2 Tropfen Normalserum (Blockierungsserum vom Pferd, Vector Laboratories-Vectastain<sup>®</sup>, Burlingame, Kalifornien, USA)
  - 2 Tropfen biotinylierter Antikörper (Vector Laboratories-Vectastain<sup>®</sup>, Burlingame, Kalifornien, USA)
  
- Chromogenpuffer, pH 8,2
  - Sigma HCLT 3253 (Trizma<sup>®</sup>, St. Louis, USA) 3,96 g
  - Sigma T 1503 (Trizma<sup>®</sup>, St. Louis, USA) 0,54 g
  - Merck 6404 NaCl (Merck<sup>®</sup>, Darmstadt, Deutschland) 2,63 g
  - mit destilliertem Wasser auf 300 ml aufgefüllt.
  
- AB Komplex
  - 5 ml PBS-Puffer
  - 1 Tropfen Reagenz A (AP Standard Kit AK 5000, Vector Laboratories-Vectastain<sup>®</sup>, Burlingame, Kalifornien, USA)
  - 1 Tropfen Reagenz B (AP Standard Kit AK 5000, Vector Laboratories-Vectastain<sup>®</sup>, Burlingame, Kalifornien, USA)
  
- AP Substrat
  - 30 Minuten vor der Benutzung ansetzen
  - 2 Tropfen von Reagenz A (Elite ABC AP Kit, Vector Laboratories-Vectastain<sup>®</sup>, Burlingame, Kalifornien, USA) auf 10 ml PBS-Puffer und mischen
  - 2 Tropfen von Reagenz B (Elite ABC AP Kit, Vector Laboratories-Vectastain<sup>®</sup>, Burlingame, Kalifornien, USA) dazugeben und mischen
  
- Hyaluronidase
  - 8 mg Hyaluronidase (Sigma<sup>®</sup>, Steinheim, Deutschland) in 50 ml PBS-Puffer lösen (pH 6,7)
  - die Lösung wird aliquotiert und bei -10°C eingefroren

Die immunhistochemische Färbung erfolgte immer nach dem gleichen Arbeitsschema:

- 1. Entparaffinierung der Schnitte;** Inkubation zweimal zehn Minuten lang mit Xylol.
- 2. Rehydrierung mittels absteigender Alkoholreihe;** Inkubation zwei Minuten in Alkohol absteigender Konzentration: 100% (zweimal), 96%, 80%, 70% und anschließend in destilliertes Wasser.
- 3. Spülen der Schnitte für zweimal fünf Minuten im Puffer;** PBS (Phosphate buffered saline, Chroma<sup>®</sup>, Berlin, Deutschland) pH 7,2.
- 4. Demaskierung des Antigens;** Mit 0,1%ige Pepsin (Sigma<sup>®</sup>, Steinheim, Deutschland) 30 Minuten lang bei 37 °C (Kollagen Typ II) und mit Hyaluronidase (Sigma<sup>®</sup>, Steinheim, Deutschland) 4 Stunden bei 37 °C (Kollagen Typ I und Typ II)
- 5. Inkubation mit Normalserum;** Elite ABC Kit PK6200 (Vector Laboratories-Vectastain<sup>®</sup>, Kalifornien, USA). Anfertigung des Serums nach beiliegenden Anweisungen des Herstellers. Inkubation 20 Minuten bei Zimmertemperatur.
- 6. Inkubation mit Primärantikörper;** Konzentrationsangaben in der folgenden Tabelle und bei der Erläuterung der einzelnen Antigene. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4°C.
- 7. Spülen mit Puffer;** siehe Punkt 3.

- 8. Inkubation mit biotinyliertem Zweitantikörper;** (Elite ABC Kit PK6200, Vector Laboratories-Vectastain<sup>®</sup>, Kalifornien, USA) zwanzig Minuten bei Zimmertemperatur.
- 9. Spülen mit Puffer;** siehe Punkt 3.
- 10. Inkubation mit AB (Avidin-Biotin) -Komplex;** (AP Standard Kit AK 5000, Vector Laboratories-Vectastain<sup>®</sup>, Kalifornien, USA) Anfertigung nach Anweisungen des Herstellers (siehe Liste der Gebrauchslösungen). Inkubation 50 Minuten bei Zimmertemperatur.
- 11. Spülen mit Puffer;** siehe Punkt 3.
- 12. Inkubation mit dem Chromogenpuffer pH 8,2;** Inkubation wie beim Spülpuffer.
- 13. Inkubation mit AP-Substrat (Alkalisches Phosphatase-Substrat);** (Elite ABC AP Kit, Vector Laboratories-Vectastain<sup>®</sup>, Kalifornien, USA) Anfertigung nach Anweisungen des Herstellers (siehe Liste der Gebrauchslösungen).

Die Inkubation mit AP-Substrat wurde unter mikroskopischer Kontrolle durchgeführt und dauerte zwischen zwei und sieben Minuten.

- 14. Spülen mit Puffer;** siehe Punkt 3.
- 15. Kontrastfärbung;** zur besseren Darstellung des histologischen Bildes wurde die Kontrastfärbung mit Methylgrün durchgeführt:
  - aus dem Puffer mit destilliertem Wasser kurz spülen
  - Eintauchen in Methylgrün (5 Mal)
  - zweimal in destilliertem Wasser kurz spülen
  - Eindecken mit Kaiser's Glycerin-Gelatine (Merck<sup>®</sup>, Darmstadt, Deutschland)

Die Kontrastfärbung wurde nur bei  $\alpha$ -SMA und Keratansulfat durchgeführt, da sie bei den anderen Antigenen zu Überfärbung der Proben führte.

### 3.7 Digitale Bilderfassung

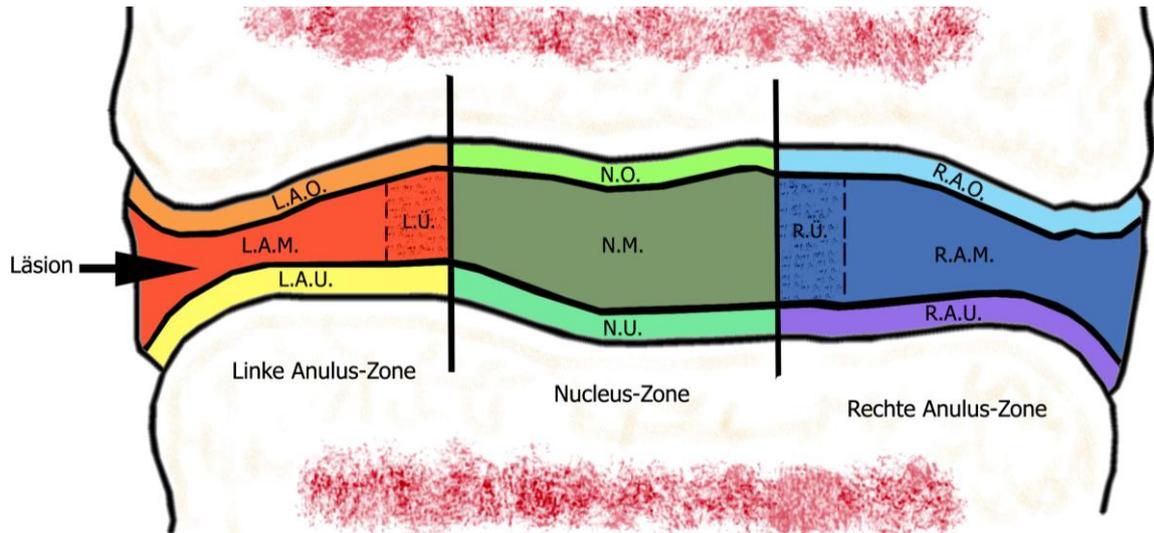
Mit einem Mikroskop der Firma Leica (LEICA DMRB<sup>®</sup> Wetzlar, Deutschland) und der daran angeschlossenen Digitalkamera von ZEISS (Carl Zeiss<sup>®</sup> AxioCam MR colour, Oberkochen, Deutschland) wurden die histologischen Schnitte als digitale Bilder erfasst. Das dazugehörige Programm Axio Vision Rel. 4.5 (Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland) wurde dazu verwendet, die Aufnahmen in die richtige Position zu bringen, so dass bei späteren Untersuchungen bei allen Proben die Läsionsseite links (von dorsal der Wirbelsäule betrachtet) lag. Um die korrekte Ausrichtung der Aufnahmen zu gewährleisten, wurden die Digitalaufnahmen gleichzeitig mit den einzelnen Proben im Mikroskop und den ungeschnittenen Paraffinblöcken verglichen und kontrolliert (Abb. 18). Als Nächstes wurden die Digitalaufnahmen mit Hilfe des Programms Adobe Photoshop (California, USA) komprimiert und auf das Wesentliche (Bandscheibe und Endplatten) reduziert. Für die Analyse wurde ein Makro-Programm der Firma ZEISS<sup>®</sup> (KS 400 3.0 Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland) benutzt.



**Abbildung 18** Ausrichtung der Digitalaufnahmen unter Kontrolle der Paraffinblöcke und der zu untersuchenden Probe auf dem Objektträger.

### 3.8 Bildanalyse

Die Proben wurden mit einem Mikroskop (LEICA DMRB Wetzlar, Deutschland) und einer Digitalkamera (ZEISS, Oberkochen, Deutschland) in digitale Dateien umgewandelt. Danach wurden die „rohen“ Dateien für die Pixelanalyse vorbereitet. Als Nächstes wurden die Digitalaufnahmen der Proben in die Datenbank des Programms KS 400 3.0 von ZEISS (Oberkochen, Deutschland) hochgeladen. Für den ersten Schritt wurden die Ränder der Bandscheibe mit einer Linie nachgezeichnet, so dass nur der Bandscheibenbereich auf einem schwarzen Grund erschien. Danach wurden die leeren Bereiche in denen kein Gewebe vorhanden war (Artefakte) umzeichnet, damit diese von der Auswertung ausgeschlossen werden konnten. Dieser Schritt war deshalb wichtig, weil dadurch die Flächen möglichst genau erfasst wurden und Farbablagerungen ausgeschlossen wurden. Die Länge der Bandscheibe von links nach rechts wurde mit einer vertikalen Linie durchgezogen und diese, für die spätere Aufteilung, in drei Zonen unterteilt. Der obere und der untere Rand der Bandscheibe wurden per Mausklick mit jeweils zwanzig Punkten möglichst genau markiert. Von diesen Rändern bis 0,5 mm in Richtung des Nucleus pulposus wurden die oberen und unteren Endplatten-RoIs gebildet. Die seitlichen Ränder wurden anhand von zehn Punkten per Mausklick möglichst genau markiert. Mit diesen äußeren Rändern und der Länge der Bandscheibe, die vorher bestimmt wurde, wurden die endgültige Form und Fläche der RoIs ermittelt. Die Aufteilung der Anulusflächen in äußere Anulusflächen und Übergangszonen erfolgte automatisch nach diesem Schritt. Dafür wurde eine 2 mm breite Fläche vom Nucleusrand in Richtung Peripherie als Übergangszone bestimmt. Mit Hilfe dieser Daten unterteilte das Programm die Bandscheibe automatisch in drei verschiedene Zonen: Die linke Anulus-Zone (linker Anulus fibrosus), an der die partielle Nukleotomie durchgeführt wurde, eine zentrale Nucleus-Zone (Nucleus pulposus) und die rechte Anulus-Zone (rechter Anulus fibrosus). Jede Zone beinhaltet jeweils drei RoIs: „Oben“ und „Unten“ sind zugleich die Bereiche der Endplatten und „Mitte“ wird der Bereich des Nucleus pulposus, beziehungsweise beider Anuli fibrosi benannt. Zusätzlich befanden sich links und rechts der Nucleus-Zone die 2 mm breite Übergangszonen (Abb. 19).

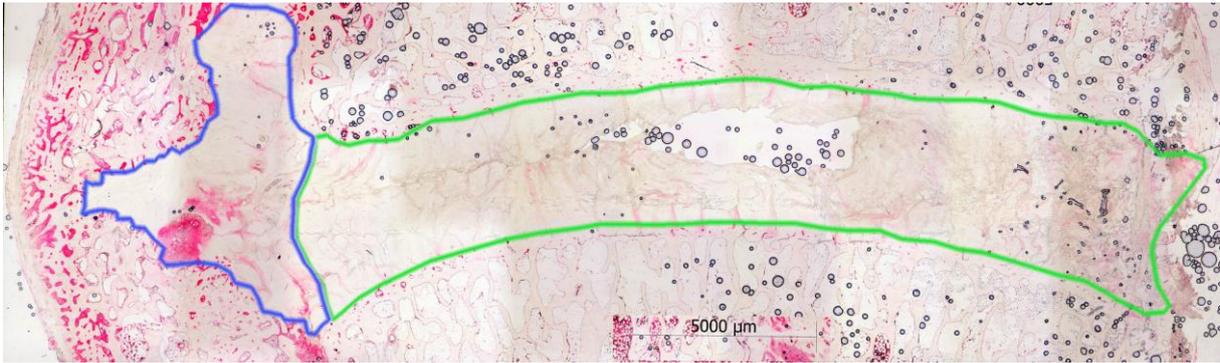


**Abbildung 19** Schematische Darstellung einer Bandscheibe zur Veranschaulichung der verschiedenen Rols. Der schwarze Pfeil zeigt den Ort der Läsion. L.A.O.: Linker Anulus oben; L.A.M.: Linker Anulus Mitte; L.A.U.: Linker Anulus unten; N.O.: Nucleus oben; N.M.: Nucleus Mitte; N.U.: Nucleus unten; R.A.O.: Rechter Anulus oben; R.A.M.: Rechter Anulus Mitte; R.A.U.: Rechter Anulus unten; L.Ü.: Linke Übergangszone; R.Ü.: Rechte Übergangszone.

Für den nächsten Schritt wurde mit der Maus ein Pixel, welches immunopositiv rot gefärbt war, gewählt und markiert, so dass das Programm, die gleich gefärbten Pixel als immunopositive Flächen erfassen konnte (Abb. 20). Danach konnten zu diesen ausgewählten immunopositiven Flächen weitere in anderen Farbtönen oder Intensitäten gefärbte Bereiche hinzugefügt oder von diesen ausgeschlossen werden. Zuletzt hatte man die Möglichkeit, Artefakte aus der Berechnung durch Umzeichnen mit der Maus auszuschließen. Bei einigen 12-Monate-Proben wurde auf der Seite der Läsion exophytisches Wachstum festgestellt. Diese Bereiche wurden bei der Auswertung der immunopositiven Flächen nicht berücksichtigt (Abb. 21).



**Abbildung 20** Im Schwarzen Kreis eingeschlossen sind sichtbare immunopositive Flächen in einer Bandscheibe, die in die Auswertung miteinbezogen wurden. Probe vom Tier S67 (12-Monate-Gruppe) markiert mit Anti-MMP 13.



**Abbildung 21** Eingeschlossen mit einer grünen Linie ist der Bereich der Bandscheibe. Mit einer blauen Linie eingeschlossen ist ein Bereich mit exophytem Wachstum der nicht in die Auswertung miteinbezogen wurde. Dieser Bereich enthält eine zumindest optisch bandscheibenähnliche Matrix. Probe vom Tier S 60 (12-Monats-Gruppe) markiert mit Anti-MMP 13.

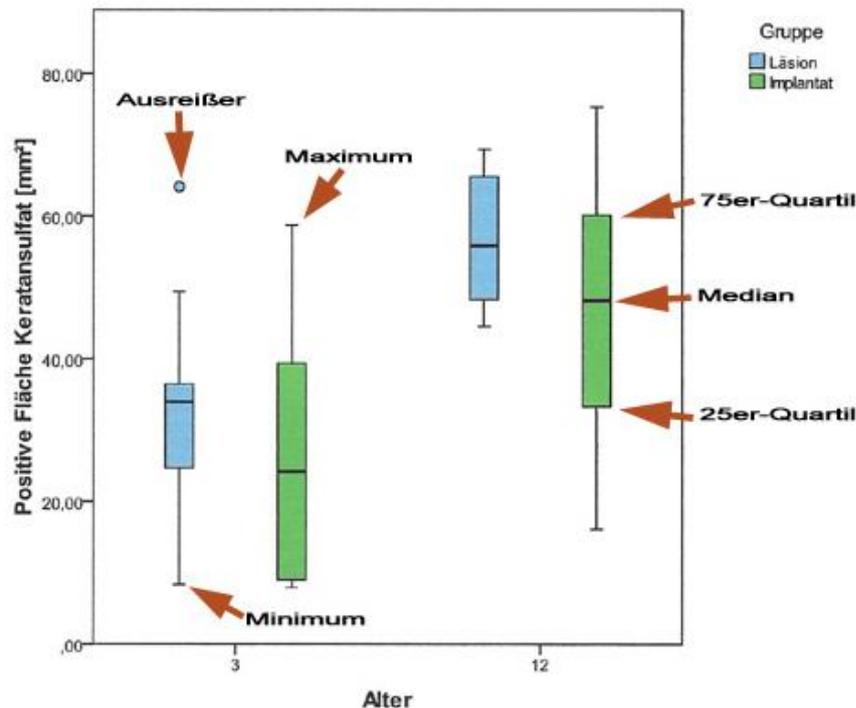
Das Programm errechnete die immunopositive Fläche als Summation der als positiv erkannten Pixel. Diese Ergebnisse wurden automatisch den verschiedenen RoIs zugeordnet und in einer Excel-Tabelle (von Microsoft Office 2003) als Quadratmillimeter [mm<sup>2</sup>] eingetragen.

### 3.9 Statistische Auswertung

#### 3.9.1 Deskriptive Statistik

Das Programm PASW Statistics 17.0 Version 17.9.2 (Predictive Analysis Software, Chicago, USA) wurde für die Auswertung der Daten verwendet. Alle Werte aus den Excel Tabellen wurden dafür verwendet. Als erstes erfolgte die Auswertung der Gesamtflächen. Gesamtfläche heißt, dass bei dieser Auswertung die Bandscheibe nicht in Zonen und RoIs unterteilt wurde, sondern dass die Zählung der immunopositiven Flächen sich auf die gesamte Bandscheibe bezog. In diesen Tabellen findet sich das Antigen, die Anzahl der untersuchten Proben, das Minimum, Maximum und die Quartile (25%, Median und 75%) jeder Gruppe.

Nach der Gesamtflächen-Tabelle wurden die gleichen Werte in einem Boxplot-Diagramm dargestellt (siehe Abb. 22).



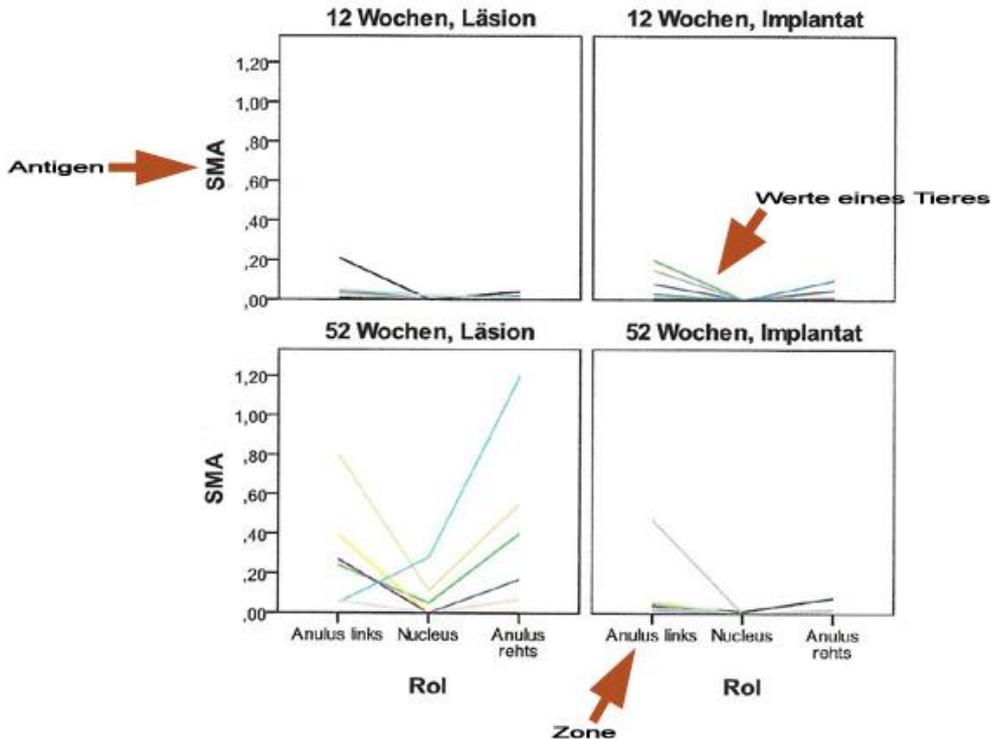
**Abbildung 22** Boxplot-Darstellung der Ergebnisse aus der Gesamtflächen-Tabelle

Die Boxplot-Darstellung macht einen Vergleich zwischen den Verteilungen der Gesamtflächen der Gruppen besser nachvollziehbar. Für die Beurteilungen der Ergebnisse wurde hauptsächlich die gesamte Streuung oder Spannweite herangezogen. Der Medianwert und Quartile wurden hauptsächlich zum Vergleich zweier Gruppen mit ähnlicher Streuung eingesetzt. Der Median oder Medianwert wird im Diagramm als eine schwarze, dicke Linie innerhalb der Boxen dargestellt. Der Median hat gegenüber dem arithmetischen Mittel den Vorteil, dass er sich von Extremwerten und Ausreißern weniger beeinflussen lässt. Minimum und Maximum wurden bei der Beurteilung ebenfalls herangezogen. Bei der Beurteilung kann man gelegentlich sehen, dass die Werte in den Tabellen für das 25- beziehungsweise 75-Perzentil von der grafischen Darstellung der Quartile abweicht. Einziger Grund dafür ist, dass die exakte errechnete Lage der Quartile unter Umständen zwischen zwei ermittelten Werten liegen kann, während bei der grafischen Darstellung die Linie stets auf der gleichen Höhe eines ermittelten Wertes dargestellt wird, und zwar auf der Höhe des Wertes der näher am Medianwert liegt. Als Ausreißer gelten Werte im Diagramm, die um mehr als das 1,5fache der Boxhöhe oder Interquartilsbreite über oder unterhalb der Boxen liegen. Diese Werte werden mit einem Kreis dargestellt. Unter Extremwert wird ein Wert verstanden, der um mehr als das 3-fache der Interquartilsbreite über oder unterhalb der Boxen liegt und mit einem Stern dargestellt wird.

Nach dem Diagramm werden die Ergebnisse der einzelnen Zonen in einer weiteren Tabelle gezeigt. Der Aufbau dieser Tabelle ist dem der ersten Gesamtflächen-Tabelle sehr ähnlich. Hier werden von jeder Gruppe die Anzahl der Proben und die Quartile gezeigt, so dass die Streuung der Werte beurteilt werden kann. Minimum und Maximum werden hier nicht angezeigt.

Im folgenden Diagramm werden die tatsächlich ermittelten Werte aller Tiere mit einer Liniengrafik dargestellt (siehe Abb. 23). Diese Grafik beinhaltet vier Diagramme und jeweils ein Diagramm pro Gruppe. Die Ordinaten zeigen die Größen der immunopositiven Flächen in

mm<sup>2</sup>. Die Abszisse ist in drei Areale eingeteilt, je eins für jede Zone der Bandscheibe. In diesen Diagrammen kann zum einen durch den Verlauf der einzelnen Linien in einer Gruppe beurteilt werden, welche Zonen in der Gruppe dazu neigen, größere immunopositive Flächen zu zeigen. Zum anderen können die Linien der gleichaltrigen Gruppen miteinander verglichen werden, da jeweils zwei gleichaltrige Gruppen nebeneinander stehen.



**Abbildung 23** Linien-Diagramm mit den Werten der einzelnen Tiere und der einzelnen Zonen der Bandscheiben

Bei manchen Antigenen wurden zusätzlich die immunopositive Fläche in einzelnen RoIs oder RoI-Gruppen, wie zum Beispiel die Übergangszonen oder die Endplatten beurteilt. Dafür wurden die ermittelten Werte in einfachen Tabellen gezeigt. Weiterhin wurde bei MMP 13 ein Verteilungsquotient ermittelt. Dieser hilft, unabhängig von der Größe der immunopositiven Flächen, herzuleiten inwiefern die Expression des Antigens sich auf eine bestimmte Zone begrenzt hatte. Nach der Auswertung von Kollagen Typ II, wird noch in Diagrammen die Expression von Kollagen Typ I und II in den Übergangszonen dargestellt.

### 3.9.2 Statistische Tests

Durch die statistischen Tests wurden die Behandlungsgruppen miteinander verglichen. Die Ergebnisse der immunopositiven Flächen jeder einzelnen RoI wurden dafür verwendet. Der Mann-Whitney-U-Test und die Wilcoxon-Rangsummen-Statistik zum Vergleich unabhängiger Gruppen wurden durchgeführt. Bei den statistischen Tests handelt es sich um etablierte Methoden der Datenanalyse, bei denen mittels des Programms PASW Statistics 17.0 Version 17.9.2 (Statistical Package for the Social Sciences, USA) ermittelt werden kann, ob der Unterschied zwischen den Streuungen zweier Gruppen als signifikant oder als zufallsbedingt eingestuft werden sollte. Die statistische Signifikanz gibt deshalb Aufschluss über die Qualität der Information, die bei der Datenanalyse gewonnen wird (Bortz 2005; Siegel 1985). Kurz- und Langzeitstudien an der Bandscheibe haben bereits diese Methoden benutzt, um

immunhistochemische Ergebnisse in der Bandscheibe statistisch zu überprüfen (Sato und Mitarbeiter 2001).

Nach der deskriptiven Statistik jedes einzelnen Antigens wurden die Ergebnisse der statistischen Tests in Form von Tabellen dargestellt. Pro Antigen wurden insgesamt zwei Tabellen angefertigt, eine für beide 3 Monate-Gruppen und eine für die 12-Monate-Gruppen. Auf den Tabellen sind alle neun RoIs der Bandscheiben in der gleichen Ordnung, wie sie in der Bandscheibe vorkommen, dargestellt. In jedem RoI-ähnlichen Feld befindet sich die durch das Programm PASW Statistics 17.0 Programm ermittelte exakte zweiseitige Signifikanz. Wenn der Wert der exakten zweiseitigen Signifikanz unter 0,05 liegt, wird der Unterschied zwischen den untersuchten Gruppen für diese RoI als signifikant eingestuft und es folgt eine Boxplot-Darstellung der betroffenen Gruppen.

## 4. Ergebnisse

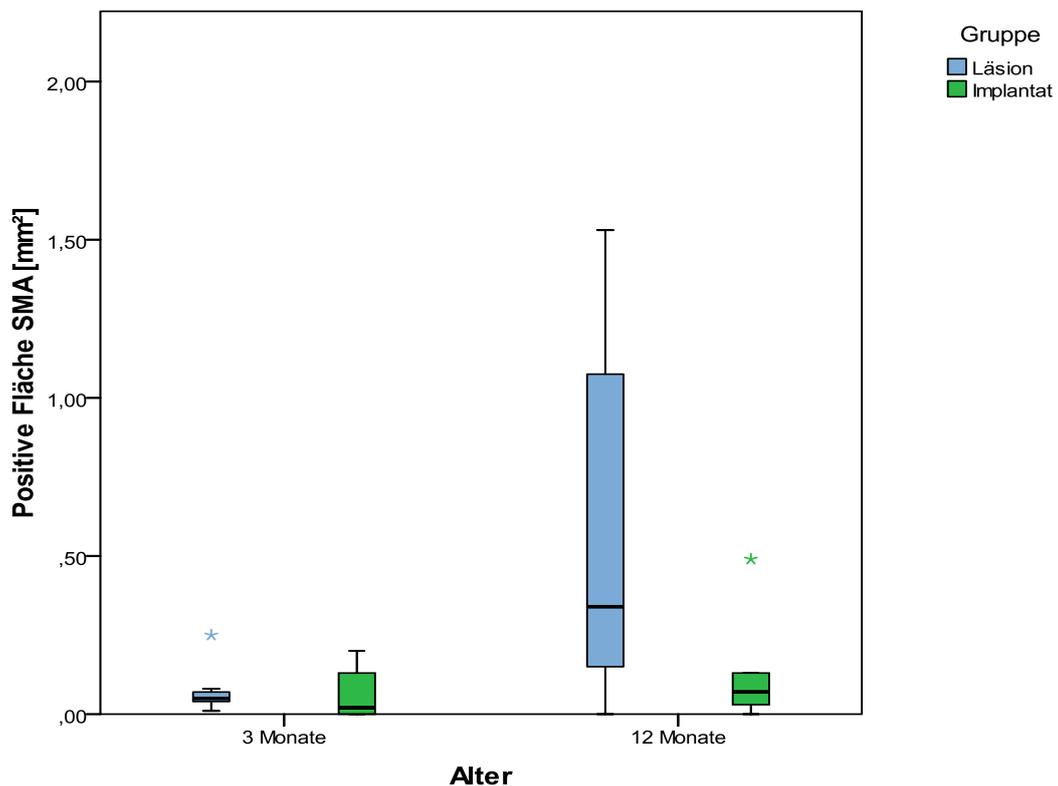
### 4.1 $\alpha$ -Smooth Muscle Actin:

**Tabelle 4** Deskriptive Statistik der gegen  $\alpha$ -SMA immunpositiven Gesamtflächen. Die Ergebnisse sind in den gleichen Farben wie die Boxplots der korrespondierenden Gruppen im Diagramm 1 dargestellt.

	Läsion-Gruppe		Implantat-Gruppe	
	3-Monate	12-Monate	3-Monate	12-Monate
Gültige Proben	9	8	9	6
Fehlende Proben	1	1	0	0
Minimum [mm <sup>2</sup> ]	0,0100	0,0000	0,0000	0,0000
Maximum [mm <sup>2</sup> ]	0,2500	1,5300	0,2000	0,4900
25 % [mm <sup>2</sup> ]	0,0250	0,1400	0,0000	0,0225
Median [mm <sup>2</sup> ]	0,0500	0,3400	0,0200	0,0700
75 % [mm <sup>2</sup> ]	0,0750	1,2575	0,1400	0,2200

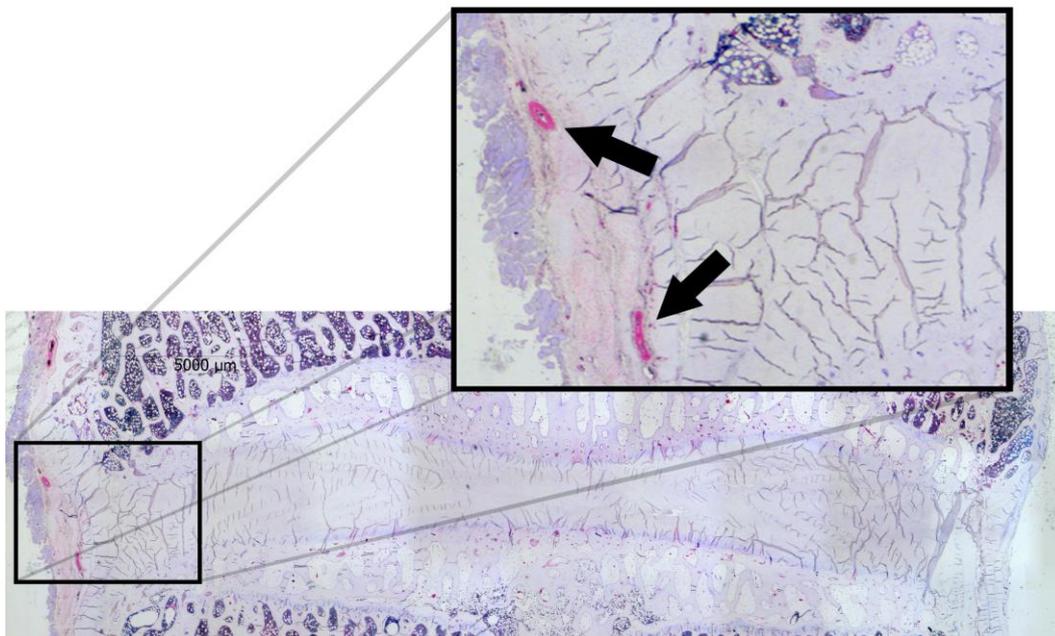
„Fehlende Proben“ bezeichnet Proben von Tieren die zwar eingebettet wurden, jedoch im Laufe der weiteren Bearbeitung verloren gingen und nicht in die statistische Auswertung gelangten.

**Diagramm 1** Boxplot-Darstellung der Streuung der gegen  $\alpha$ -SMA immunpositiven Gesamtflächen aller Gruppen



Bei der Betrachtung der Ergebnisse aus Tabelle 4 und Diagramm 1 erkennt man eine Zunahme der Werte für  $\alpha$ -SMA vom dritten, bis zum zwölften Monat. Die 3-Monate-Gruppen zeigen untereinander einen geringen Unterschied. In der Läsion-Gruppe findet sich ein Extremwert bei einem Tier, S80. Die überdurchschnittlich große, immunopositive Fläche dieses Individuums wurde im mittleren, linken Anulus fibrosus, am Ort der Läsion, gemessen. Berücksichtigt man dieses Individuum nicht, so zeigt die Läsion-Gruppe in dieser Altersgruppe eine kleinere Streuung der gemessenen Werte, als die Implantat-Gruppe. Der Medianwert der Läsion-Gruppe liegt, wenn auch geringfügig, über dem Wert der Implantat-Gruppe. Die 12-Monate-Gruppen unterscheiden sich in ihrer Streuung drastisch, obwohl ihre Medianwerte nicht weit auseinander liegen. Die höheren Werte sowohl bei der Streuung als auch des Medianwertes sind hier bei der Läsion-Gruppe zu finden. In der 12-Monate-Implantat-Gruppe ist ein Extremwert beim Tier S67 zu finden. Diese große immunopositive Fläche wurde bei diesem Tier ebenfalls im mittleren, linken Anulus-RoI gemessen. Es ist außerdem zu beobachten, dass während die immunopositiven Flächen beider Implantat-Gruppen sich untereinander wenig unterscheiden, der Unterschied zwischen den beiden Läsion-Gruppen beträchtlich ist.

Eine immunohistochemische Darstellung der Markierung mit  $\alpha$ -SMA mit interner Kontrolle ist in Abbildung 24 zu sehen.



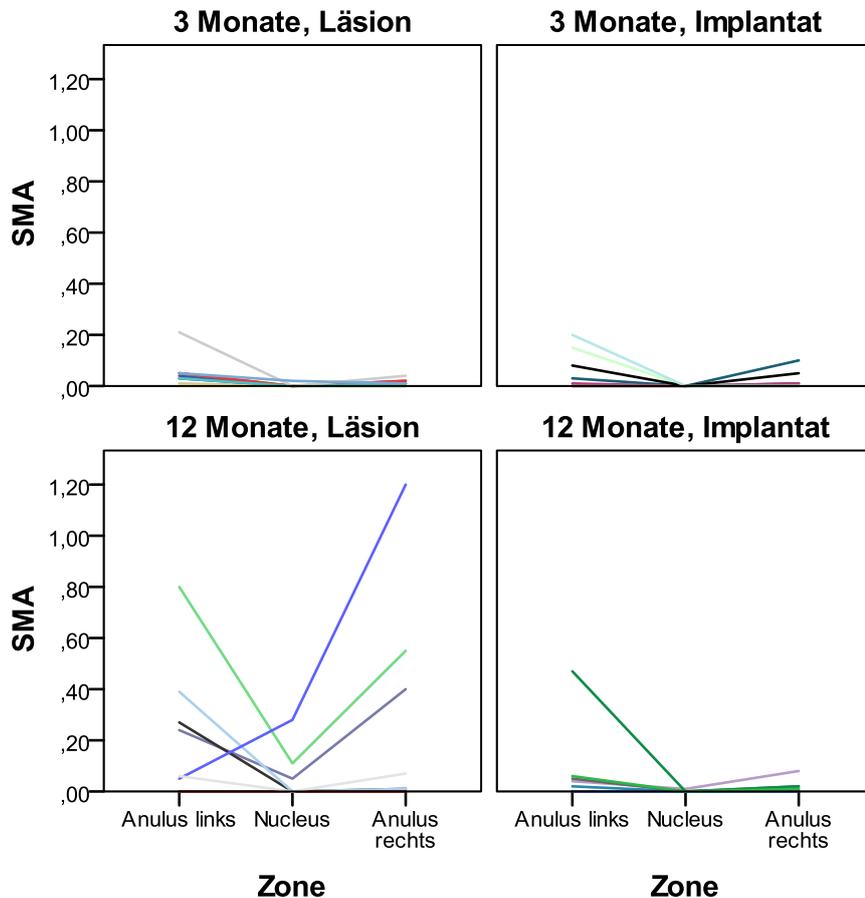
**Abbildung 24** Probe des Tieres S82 (3-Monate-Degeneration-Gruppe), gefärbt mit Anti- $\alpha$ -SMA. Die schwarzen Pfeile zeigen auf 2 Gefäße außerhalb des linken Anulus fibrosus. Solche Gefäße dienten als „interne“ positiv-Kontrollen.

**Tabelle 5** Statistische Ergebnisse der gegen  $\alpha$ -SMA immunopositiven Flächen der einzelnen Zonen innerhalb der Bandscheiben

		Linker Anulus	Nucleus	Rechter Anulus
3-Monate-Läsion	25 % [mm <sup>2</sup> ]	0,0200	0,0000	0,0050
	Median [mm <sup>2</sup> ]	0,0400	0,0000	0,0100
	75 % [mm <sup>2</sup> ]	0,0500	0,0000	0,0200
3-Monate-Implantat	25 % [mm <sup>2</sup> ]	0,0000	0,0000	0,0000
	Median [mm <sup>2</sup> ]	0,0100	0,0000	0,0000
	75 % [mm <sup>2</sup> ]	0,1150	0,0000	0,0300
12-Monate-Läsion	25 % [mm <sup>2</sup> ]	0,0125	0,0000	0,0100
	Median [mm <sup>2</sup> ]	0,1500	0,0000	0,1200
	75 % [mm <sup>2</sup> ]	0,3600	0,0950	0,5125
12-Monate-Implantat	25 % [mm <sup>2</sup> ]	0,0150	0,0000	0,00750
	Median [mm <sup>2</sup> ]	0,0450	0,0000	0,0150
	75 % [mm <sup>2</sup> ]	0,1625	0,0025	0,0350

Aus der Tabelle 5 ist zu entnehmen, dass bei jeder der vier Gruppen, die Nucleus pulposus-Zonen die niedrigsten Werte innerhalb der einzelnen Gruppen aufweisen. Außer einem einzigen Tier, das eine immunopositive Fläche im Nucleus pulposus zwischen 0,001 mm<sup>2</sup> und 0,002 mm<sup>2</sup> aufweist (S82 der Läsion-Gruppe), zeigen alle Tiere der 3-Monate-Gruppe keine immunopositive Fläche in dieser Zone. Anders verhalten sich die Anulus fibrosus-Zonen, insbesondere die linke Anulus-Zone (Läsion-Zone). Auf dieser Seite werden die höchsten Werte aller drei Zonen bei allen vier Gruppen gemessen. Die höchsten Werte werden mit großem Abstand bei der 12-Monate-Läsion-Gruppe gefunden.

**Diagramm 2** Grafische Darstellung der Ergebnisse für  $\alpha$ -SMA aller vier Gruppen. Jede Linie steht für ein Tier. Hier wird sichtbar, welche Zonen die größeren immunopositiven Flächen innerhalb der einzelnen Tiere besitzen.



Bei den 3-Monate-Gruppen sind, wie erwartet, in den meisten Fällen beide Anulus-Zonen stärker gefärbt als die Nucleus-Zonen. Von beiden Anuli wird der linke Anulus (Läsion-Zone) bevorzugt gefärbt. Man erkennt eine drastische Zunahme der Immunopositivität des rechten Anulus bei der 12-Monate-Läsion-Gruppe, im Vergleich zu beiden 3-Monate-Gruppen. Die 12-Monate-Implantat-Gruppe verhält sich, abgesehen von einem Extremwert beim Tier S67, ähnlich wie die 3-Monate-Gruppen.

Die statistischen Tests werden in tabellarischer Form dargestellt. Hierfür wird die immunopositive Fläche jeder einzelnen ROI (drei ROIs für jede Zone) mit der homologen ROI der gleichaltrigen Gruppe verglichen. Der Unterschied zwischen beiden Ergebnissen wird als signifikant eingestuft, sobald der Signifikanzwert kleiner als 0,05 ist. Die statistischen Daten jeder einzelnen ROI sind im Anhang der vorliegenden Studie ebenfalls in tabellarischer Form dargestellt.

**Tabelle 6** Statistische Signifikanz zwischen beiden 3-Monate-Gruppen

	Linker Anulus	Nucleus	Rechter Anulus
Oben	0,453	1,000	1,000
Mitte	0,468	1,000	0,423
Unten	0,576	1,000	1,000

**Tabelle 7** Statistische Signifikanz zwischen beiden 12-Monate-Gruppen

	Linker Anulus	Nucleus	Rechter Anulus
Oben	0,977	0,473	0,287
Mitte	0,568	0,329	0,233
Unten	0,413	0,473	0,329

Durch die statistischen Tests lässt sich kein signifikanter Unterschied zwischen den für  $\alpha$ -SMA immunpositiven Flächen der Läsion- und Implantat-Gruppen gleichen Alters zeigen.

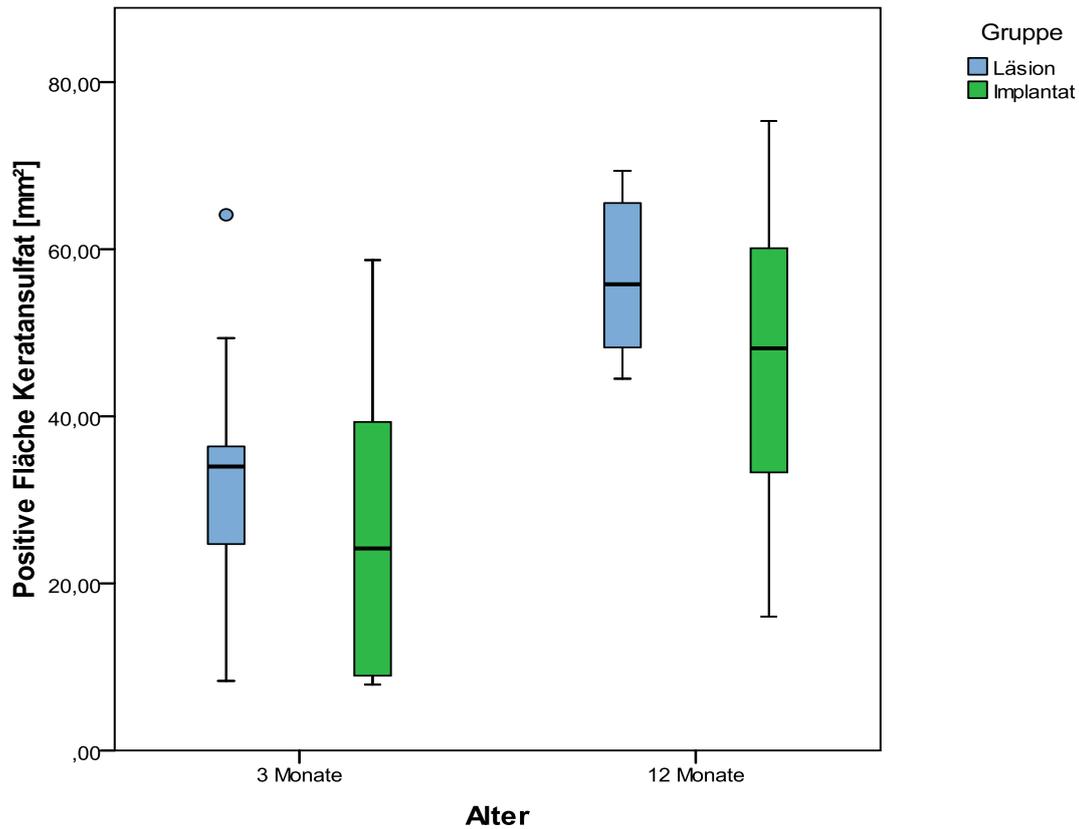
#### 4.2 Keratansulfat:

**Tabelle 8** Deskriptive Statistik der gegen Keratansulfat immunpositiven Gesamtflächen. Die Ergebnisse sind in den gleichen Farben wie die Boxplots der korrespondierenden Gruppen im Diagramm 3 dargestellt.

	Läsion-Gruppe		Implantat-Gruppe	
	3-Monate	12-Monate	3-Monate	12-Monate
Gültige Proben	9	8	8	6
Fehlende Proben	1	1	1	0
Minimum [mm <sup>2</sup> ]	8,3300	44,5000	7,8800	16,0300
Maximum [mm <sup>2</sup> ]	64,1200	69,3700	58,7000	75,3400
25 % [mm <sup>2</sup> ]	21,0300	46,4075	8,6000	28,9750
Median [mm <sup>2</sup> ]	33,9900	55,8200	24,1950	48,1600
75 % [mm <sup>2</sup> ]	42,8850	66,8900	41,4650	63,9250

„Fehlende Proben“ bezeichnet Proben von Tieren die zwar eingebettet wurden, jedoch im Laufe der weiteren Bearbeitung verloren gingen und nicht in die statistische Auswertung gelangten.

**Diagramm 3** Boxplot-Darstellung der Streuung der gegen Keratansulfat immunopositiven Gesamtflächen aller Gruppen



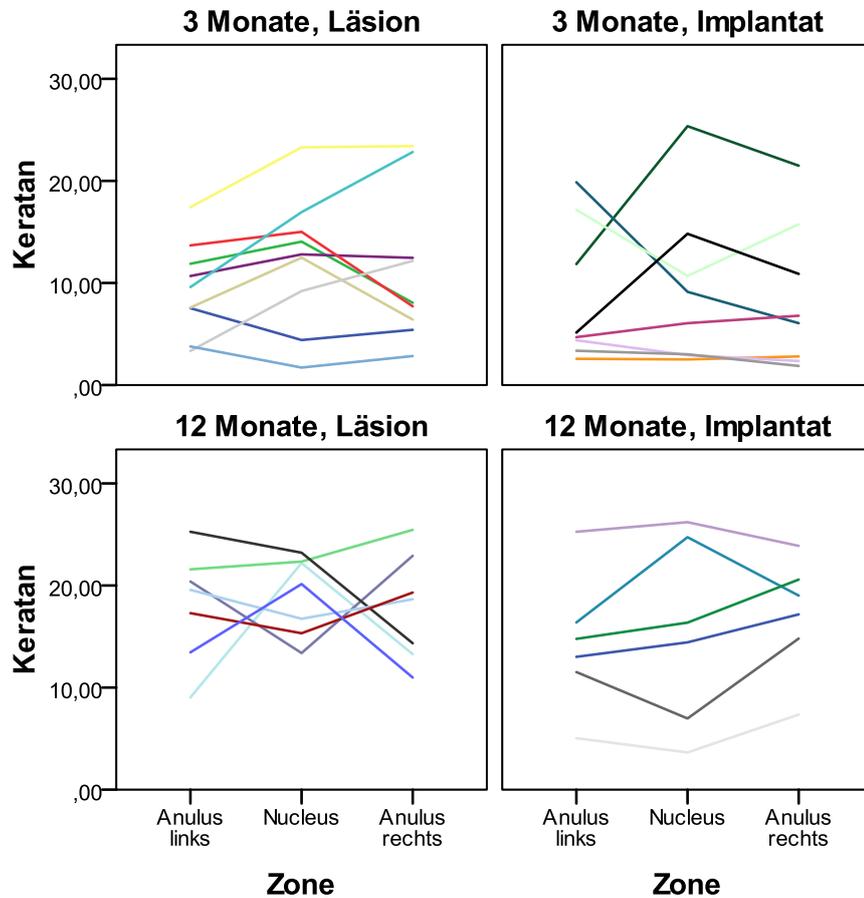
Die Werte der Untersuchung von Keratansulfat liegen in einer anderen Größenordnung als die von  $\alpha$ -SMA. Betrachtet man nur die Medianwerte der Gruppen zeigen beide Läsion-Gruppen höhere Werte, als die Implantat-Gruppen. Die Streuungen beider Implantat-Gruppen sind jedoch größer, als die der Läsion-Gruppen und weisen in beiden Altersgruppen sowohl niedrigere Minima, als auch höhere Maxima, als die der Läsion-Gruppen auf. Einzige Ausnahme ist ein Extremwert der 3-Monate-Läsion-Gruppe, welcher höher liegt als das Maximum der Implantat-Gruppe gleichen Alters. Es handelt sich dabei um das Tier S76 mit einer hohen Immunopositivität in den mittleren RoIs aller drei Zonen. Außerdem ist deutlich zu sehen, dass beide 12-Monate-Gruppen höhere Werte aufweisen als die 3-Monate-Gruppen.

**Tabelle 9** Statistische Ergebnisse der gegen Keratansulfat immunopositiven Flächen der einzelnen Zonen innerhalb der Bandscheiben

		Linker Anulus	Nucleus	Rechter Anulus
3-Monate-Läsion	25 % [mm <sup>2</sup> ]	5,6550	6,8100	5,9100
	Median [mm <sup>2</sup> ]	9,6000	12,8000	8,0600
	75 % [mm <sup>2</sup> ]	12,7800	15,9750	17,6450
3-Monate-Implantat	25 % [mm <sup>2</sup> ]	3,6175	2,9500	2,4700
	Median [mm <sup>2</sup> ]	4,9150	7,5950	6,4250
	75 % [mm <sup>2</sup> ]	15,8325	13,7875	14,5350
12-Monate-Läsion	25 % [mm <sup>2</sup> ]	14,4100	15,6750	13,5375
	Median [mm <sup>2</sup> ]	19,9800	21,1700	18,9800
	75 % [mm <sup>2</sup> ]	21,7825	22,9925	22,8625
12-Monate-Implantat	25 % [mm <sup>2</sup> ]	9,9000	6,1375	12,9375
	Median [mm <sup>2</sup> ]	13,8900	15,3950	18,0900
	75 % [mm <sup>2</sup> ]	18,6000	25,0975	21,4050

Die Tabelle 9 zeigt, dass zwischen den linken (Läsion) und den rechten (intakte) Anuli fibrosi kein großer Unterschied hinsichtlich der Größe ihrer immunopositiven Flächen besteht. Im Allgemeinen liegen die Streuungen aller drei Zonen in etwa auf gleicher Höhe. Bei der Nucleus-Zone sind grob betrachtet höhere Werte zu finden, als bei den Anulus-Zonen. Bei beiden Implantat-Gruppen erkennt man einen relativ hohen Medianwert der rechten Anuli fibrosi, im Vergleich mit dem der linken Anuli. Bei der 12-Monate-Implantat-Gruppe geht dieser Wert sogar über den Wert des Nucleus pulposus selbst.

**Diagramm 4** Grafische Darstellung der Ergebnisse für Keratansulfat aller vier Gruppen. Jede Linie steht für ein Tier. Hier wird sichtbar, welche Zonen die größeren immunopositiven Flächen innerhalb der einzelnen Tiere besitzen.



In der Liniengrafik ist die große Streuung der Werte wiederzuerkennen. Es ist im Gegensatz zu  $\alpha$ -SMA schwieriger festzustellen, welche der drei Zonen bevorzugt immunopositiv gefärbt wird. Die hohe Streuung der 12-Monate-Implantat-Gruppe ist in dieser Grafik ebenfalls gut zu erkennen.

Wie bei  $\alpha$ -SMA wird für jede einzelne ROI der Signifikanzwert ermittelt und in zwei Tabellen (eine je zwei Altersgruppen) aufgeführt.

**Tabelle 10** Statistische Signifikanz zwischen beiden 3-Monate-Gruppen

	Linker Anulus	Nucleus	Rechter Anulus
Oben	0,815	0,541	0,334
Mitte	0,541	0,321	0,236
Unten	0,795	0,236	0,691

**Tabelle 11** Statistische Signifikanz zwischen beiden 3-Monate-Gruppen

	Linker Anulus	Nucleus	Rechter Anulus
Oben	0,974	0,549	0,345
Mitte	0,142	0,573	0,573
Unten	0,240	0,241	0,241

Der statistische Test zeigt auch hier keinen signifikanten Unterschied zwischen der Läsion- und der Implantat-Gruppe des gleichen Alters bei allen untersuchten RoIs. Damit bleibt der Unterschied auf der Ebene der deskriptiven Statistik begrenzt.

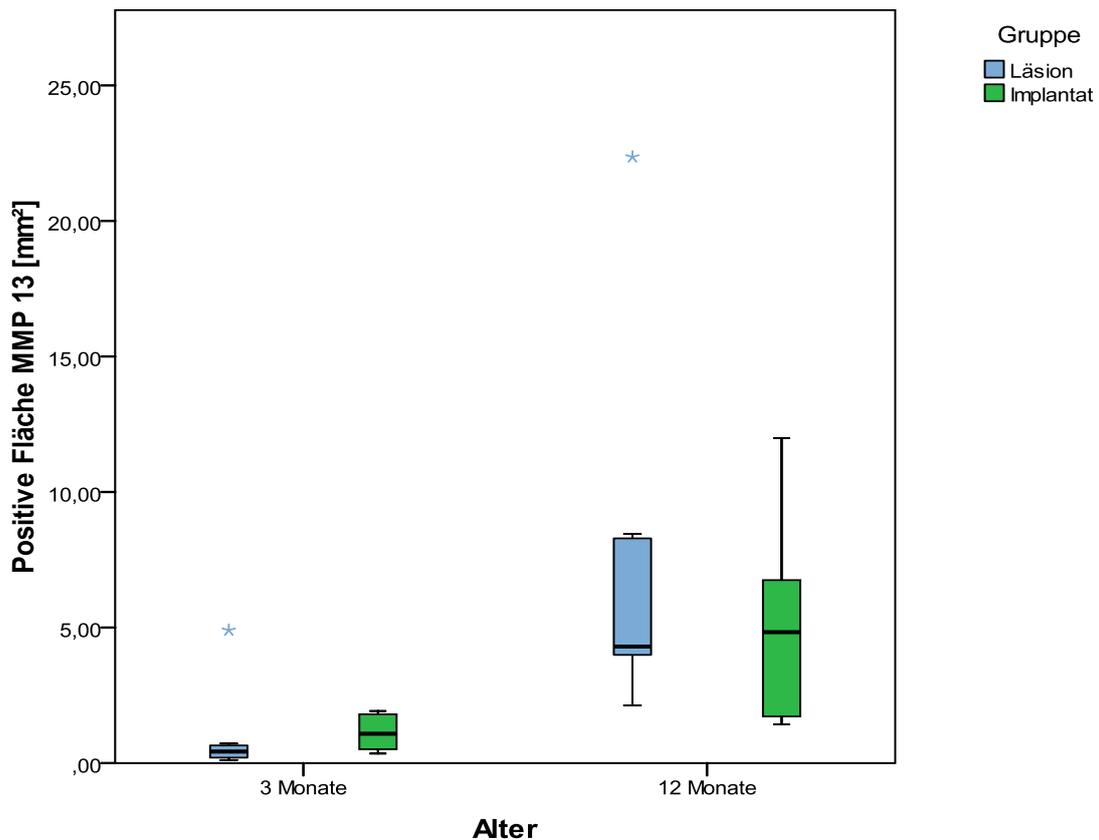
#### 4.3 MMP 13:

**Tabelle 12** Deskriptive Statistik der gegen MMP 13 immunopositiven Gesamtflächen. Die Ergebnisse sind in den gleichen Farben wie die Boxplots der korrespondierenden Gruppen im Diagramm 5 dargestellt

	Läsion-Gruppe		Implantat-Gruppe	
	3-Monate	12-Monate	3-Monate	12-Monate
Gültige Proben	9	9	5	6
Fehlende Proben	1	0	4	0
Minimum [mm <sup>2</sup> ]	0,1100	2,1300	0,3500	1,4300
Maximum [mm <sup>2</sup> ]	4,9000	22,3600	1,9200	11,9900
25 % [mm <sup>2</sup> ]	0,2000	3,7600	0,4300	1,6475
Median [mm <sup>2</sup> ]	0,4200	4,2900	1,0800	4,8300
75 % [mm <sup>2</sup> ]	0,6850	8,3700	1,8600	8,0600

„Fehlende Proben“ bezeichnet Proben von Tieren die zwar eingebettet wurden, jedoch im Laufe der weiteren Bearbeitung verloren gingen und nicht in die statistische Auswertung gelangten.

**Diagramm 5** Boxplot-Darstellung der Streuung der gegen MMP 13 immunopositiven Gesamtflächen aller Gruppen



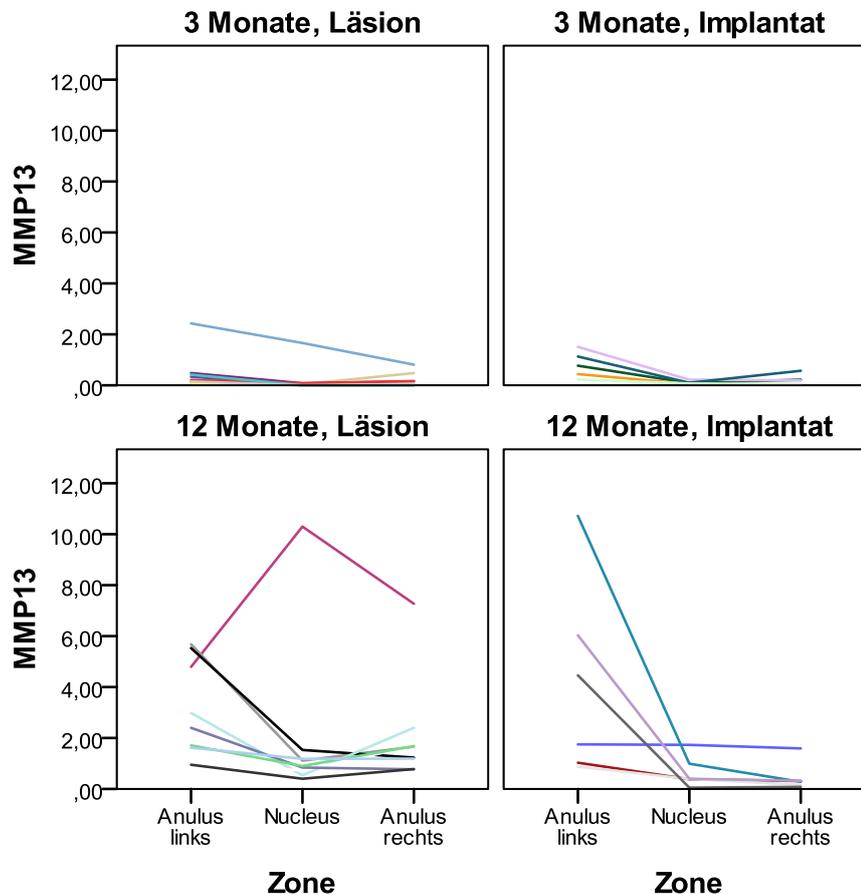
In Tabelle 12 und Diagramm 5 ist ein erheblicher Unterschied der MMP 13-Immunopositivität zwischen den Altersgruppen zu erkennen. Die 3-Monate-Läsion-Gruppe zeigt eine äußerst kleine Streuung mit einer Interquartilsbreite von etwa 0,40 mm<sup>2</sup>, dagegen besitzt die 3-Monate-Implantat-Gruppe eine Interquartilsbreite von etwa 1,4 mm<sup>2</sup>. Letzte Gruppe besitzt außerdem einen Median bei 1,08 mm<sup>2</sup>, welcher mehr als doppelt so hoch liegt wie der Medianwert der 3-Monate-Läsion-Gruppe. Die Streuungen der 12-Monate-Gruppen liegen wesentlich höher und zeigen eine wesentlich größere Spannbreite, als die 3-Monate-Gruppen. Obwohl der Medianwert der 12-Monate-Implantat-Gruppe geringfügig höher liegt, als der der 12-Monate-Läsion-Gruppe, liegt die Interquartilsbreite der Läsion-Gruppe höher. Ihre Streuung ist, abgesehen von einem Extremwert, kleiner als die der Implantat-Gruppe. Erkennbar sind zudem zwei Extremwerte, eins in jeder Läsion-Gruppe, es handelt sich dabei um das Tier S82 in der 3- und S52 in der 12-Monate-Läsion-Gruppe.

**Tabelle 13** Statistische Ergebnisse der gegen MMP 13 immunopositiven Flächen der einzelnen Zonen innerhalb der Bandscheiben

		Linker Anulus	Nucleus	Rechter Anulus
3-Monate-Läsion	25 % [mm <sup>2</sup> ]	0,1100	0,0000	0,0150
	Median [mm <sup>2</sup> ]	0,2100	0,0400	0,0600
	75 % [mm <sup>2</sup> ]	0,4500	0,0800	0,3200
3-Monate-Implantat	25 % [mm <sup>2</sup> ]	0,3350	0,0600	0,0350
	Median [mm <sup>2</sup> ]	0,7700	0,0900	0,1900
	75 % [mm <sup>2</sup> ]	1,3200	0,1600	0,3950
12-Monate-Läsion	25 % [mm <sup>2</sup> ]	1,3700	0,6300	0,9850
	Median [mm <sup>2</sup> ]	2,4000	0,9000	1,6600
	75 % [mm <sup>2</sup> ]	5,1600	1,3550	2,0450
12-Monate-Implantat	25 % [mm <sup>2</sup> ]	0,9925	0,2975	0,1400
	Median [mm <sup>2</sup> ]	3,1050	0,3950	0,2950
	75 % [mm <sup>2</sup> ]	7,2025	1,1750	0,6375

Wie man aus der Tabelle 13 ablesen kann, zeigt die linke Anulus-Zone (Läsionszone) mit Abstand die höchsten Werte bei allen vier Gruppen. Nur bei der 12-Monate-Läsion-Gruppe ist dieser Unterschied nicht in dem Maße ausgeprägt, wie bei den anderen Gruppen. Die Werte der beiden Implantat-Gruppen insgesamt, zeigen den größten Unterschied zwischen der Läsion-Zone und die der anderen beiden Zonen.

**Diagramm 6** Grafische Darstellung der Ergebnisse für MMP 13 aller vier Gruppen. Jede Linie steht für ein Tier. Hier wird sichtbar, welche Zonen die größeren immunopositiven Flächen innerhalb der einzelnen Tiere besitzen.



Das Diagramm 6 zeigt, dass innerhalb der einzelnen Proben die Tendenz besteht, dass beide Anuli fibrosi größere Werte aufweisen, als der Nucleus pulposus. Die einzige Gruppe bei der diese Tendenz nicht bei den meisten Tieren zu sehen ist, ist die 12-Monate-Implantat-Gruppe. Von beiden Anuli besitzt in den meisten Fällen der linke Anulus (Läsionszone) die größte immunopositive Fläche. Eine Ausnahme dazu zeigt sich an beiden Extremwert-Exemplaren und vor allem am Tier S52 der 12-Monate-Läsion-Gruppe, sichtbar in dieser Grafik als rosarote Linie, die sich stark nach oben projiziert und zu den übrigen Linien einen großen Abstand besitzt.

Um die Größe der immunopositiven Flächen der linken Anulus-RoI mit der der anderen RoIs besser vergleichen zu können, wurden die immunopositiven Flächen der Nucleus pulposus- und der rechten Anulus-Zone, in Verhältnis zu der immunopositiven Fläche der korrespondierenden linken Anulus-Zone gesetzt. Damit wird eine Aussage über die Verteilung von MMP 13 innerhalb der Bandscheiben möglich. Aus den so gewonnenen Werten wird eine Verteilungsgrafik mit Boxplots erstellt.

Die Formel für die Berechnung lautet:

$$\text{Linker Anulus} : (\text{Nucleus pulposus} + \text{Rechter Anulus}) = \text{Verteilungsquotient (Q)}$$

Dadurch ergibt sich aus einem hohen Wert des Verteilungsquotienten eine höhere Ausschüttung von MMP 13 in der Läsionszone (linke Anulus-Zone), im Vergleich zu den anderen beiden Zonen. Dieser Wert ist dadurch von der absoluten Größe der immunopositiven

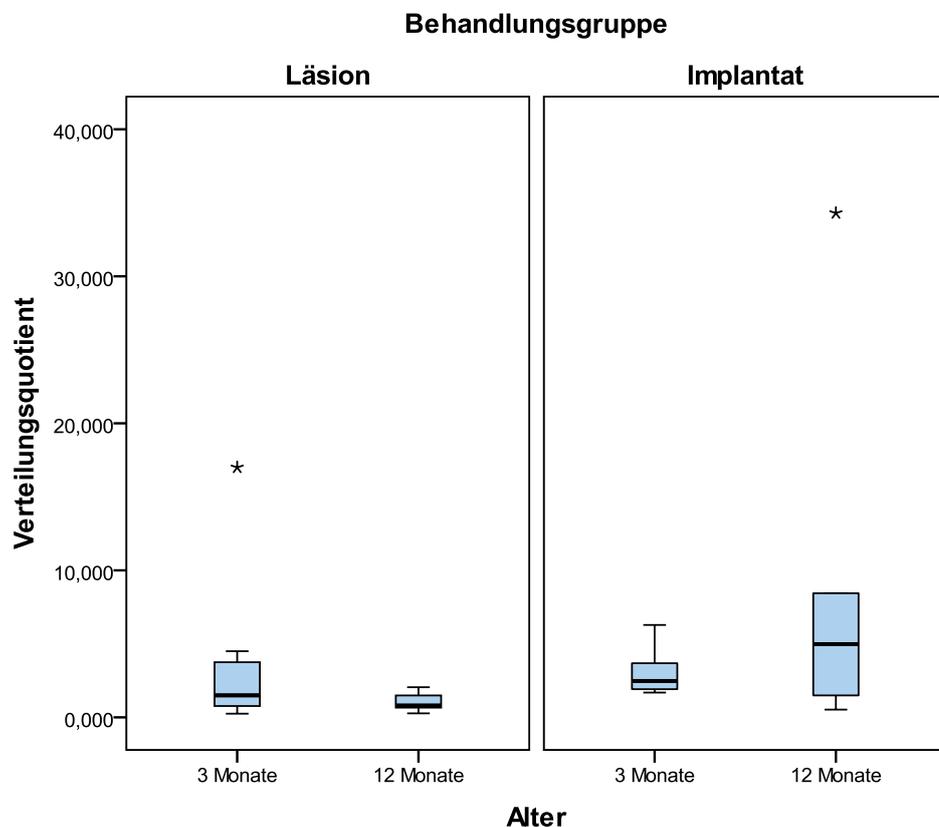
Fläche der Bandscheiben unabhängig. Die Berechnung wird bei jedem einzelnen Tier durchgeführt.

•Verteilungsquotient von MMP 13:

**Tabelle 14** Verteilungsquotient (Q) von MMP 13 bei allen Gruppen

Gruppen Werte	3-Monate- Läsion	3-Monate- Implantat	12-Monate- Läsion	12-Monate- Implantat
<b>Minimum</b>	0,250	1,686	0,272	0,527
<b>Median</b>	1,491	2,483	2,000	4,987
<b>Maximum</b>	17,000	6,285	0,805	34,300

**Diagramm 7** Statistik des Verteilungsquotienten von MMP 13



Im Diagramm 7 ist zu erkennen, dass beide 3-Monate-Gruppen, abgesehen von einem Extremwert bei der 3-Monate-Läsion-Gruppe, ähnliche Streuungen aufweisen. Die 3-Monate-Implantat-Gruppe zeigt einen höheren Minimum-, Maximum- und Medianwert als die Läsion-Gruppe gleichen Alters. Letztere weist jedoch den Extremwert am Tier S72 mit einem Verteilungsquotient von 17 auf. Die Streuungen der 12-Monate-Gruppen weisen untereinander erheblichere Unterschiede als die der 3-Monate-Gruppen auf. Die 12-Monate-Läsion-Gruppe zeigt die niedrigsten Werte (Minimum, Median und Maximum) und die geringste Streuung aller untersuchten Gruppen. Die 12-Monate-Implantat-Gruppe dagegen besitzt den höchsten Median und Maximumwert und die breiteste Streuung aller untersuchten Gruppen. Zusätzlich besitzt diese Gruppe den höchsten Extremwert aller Gruppen am Tier S70, mit einem Verteilungsquotient von 34,30. Bei den Berechnungen stellte sich als eine

Schwäche dieser Untersuchung die Tatsache heraus, dass es bei einer Messung zu einer Teilung durch null gekommen wäre, da das Tier S78 keine immunopositive Fläche im Nucleus und rechten Anulus zeigte. Der Verteilungsquotient dieses Tieres würde damit rein mathematisch gesehen ins unendliche wachsen. Aus diesem Grund wurde dieses Tier von dieser Messung ausgeschlossen.

Als Nächstes erfolgt die Darstellung der statistischen Testergebnisse für diese Färbung.

**Tabelle 15** Statistische Signifikanz zwischen beiden 3-Monate-Gruppen

	Linker Anulus	Nucleus	Rechter Anulus
Oben	0,412	0,124	0,305
Mitte	0,147	0,150	0,537
Unten	0,139	0,110	0,476

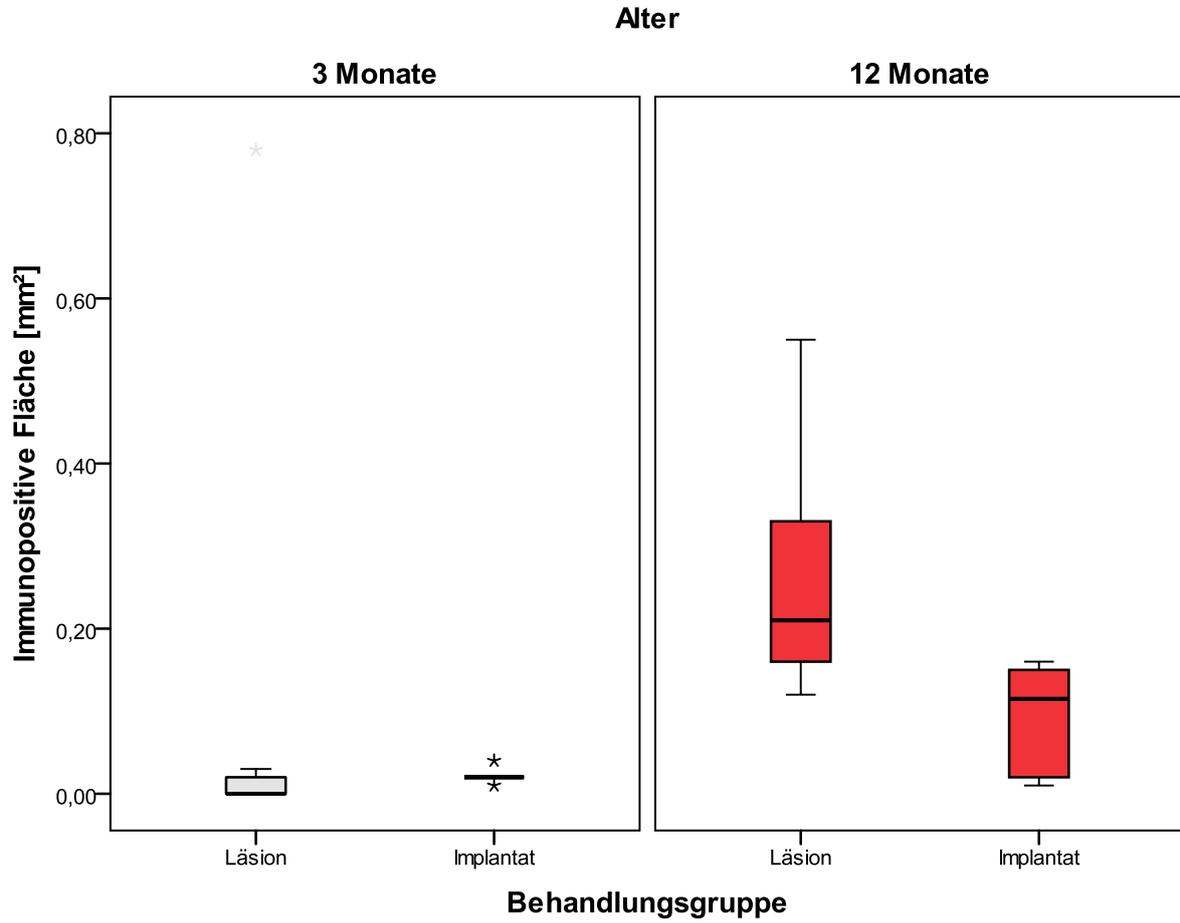
**Tabelle 16** Statistische Signifikanz zwischen beiden 12-Monate-Gruppen

	Linker Anulus	Nucleus	Rechter Anulus
Oben	0,474	0,004	0,007
Mitte	0,689	0,311	0,007
Unten	0,754	0,372	0,012

Durch die statistischen Tests wurde ein signifikanter Unterschied zwischen den Verteilungen der immunopositiven Flächen des oberen Nucleus pulposus, sowie bei dem gesamten rechten Anulus fibrosus der 12-Monate-Gruppen (siehe Tabelle 16) festgestellt.

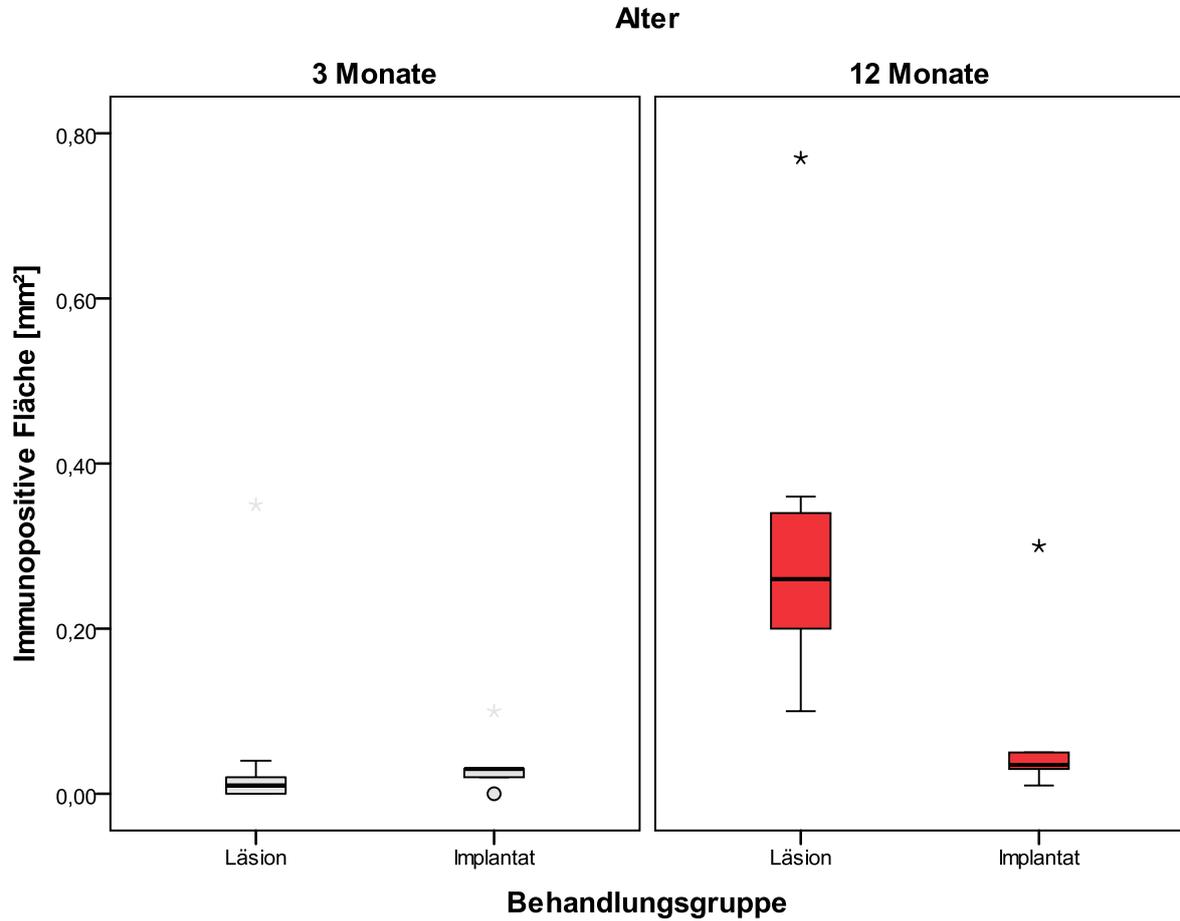
## •Nucleus pulposus, oben, MMP 13:

**Diagramm 8** Streuung der immunopositiven Flächen in der oberen Nucleus pulposus-ROI. Bei den rot dargestellten 12-Monate-Gruppen wurde durch die statistischen Tests ein signifikanter Unterschied festgestellt.



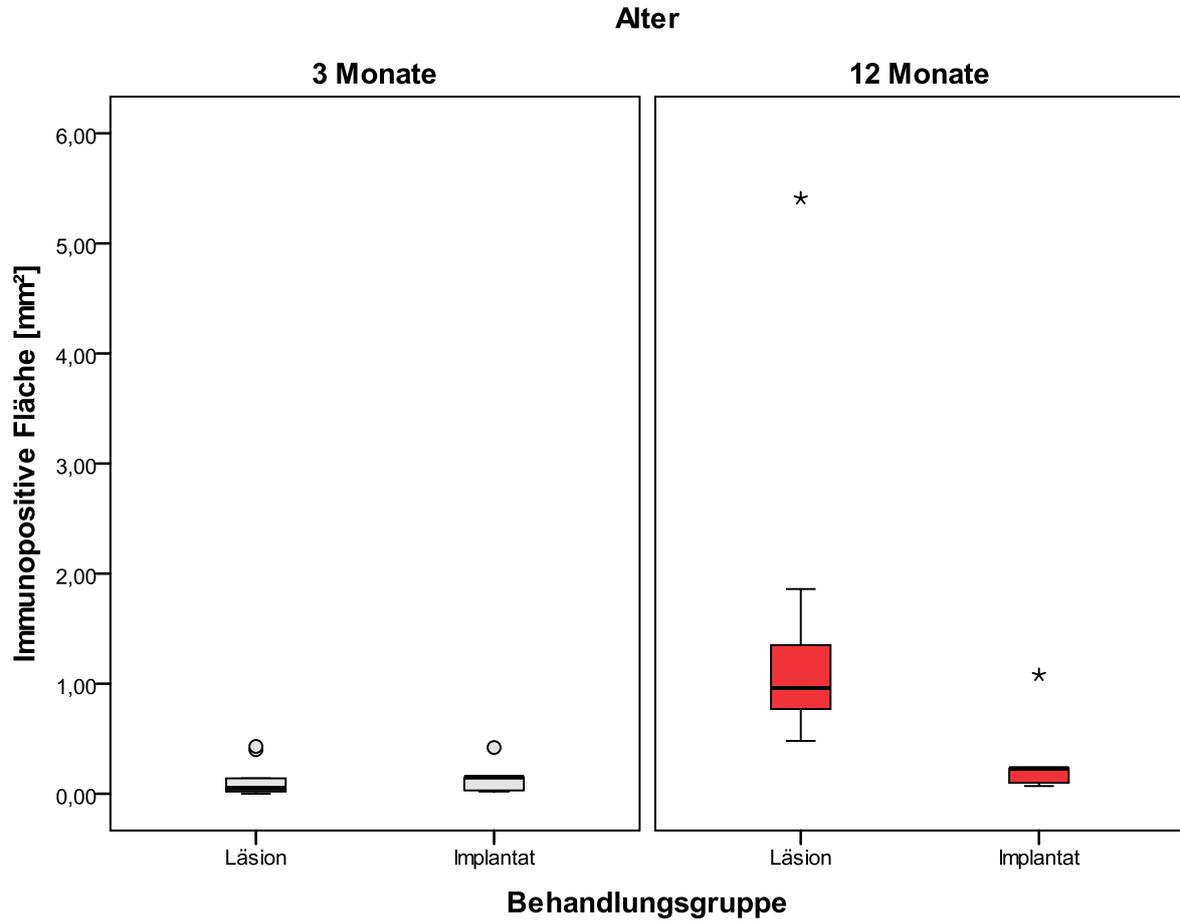
## •Rechter Anulus fibrosus, oben, MMP 13:

**Diagramm 9** Streuung der immunopositiven Flächen in der oberen, rechten Anulus fibrosus-ROI. Bei den rot dargestellten 12-Monate-Gruppen wurde durch die statistischen Tests ein signifikanter Unterschied festgestellt.



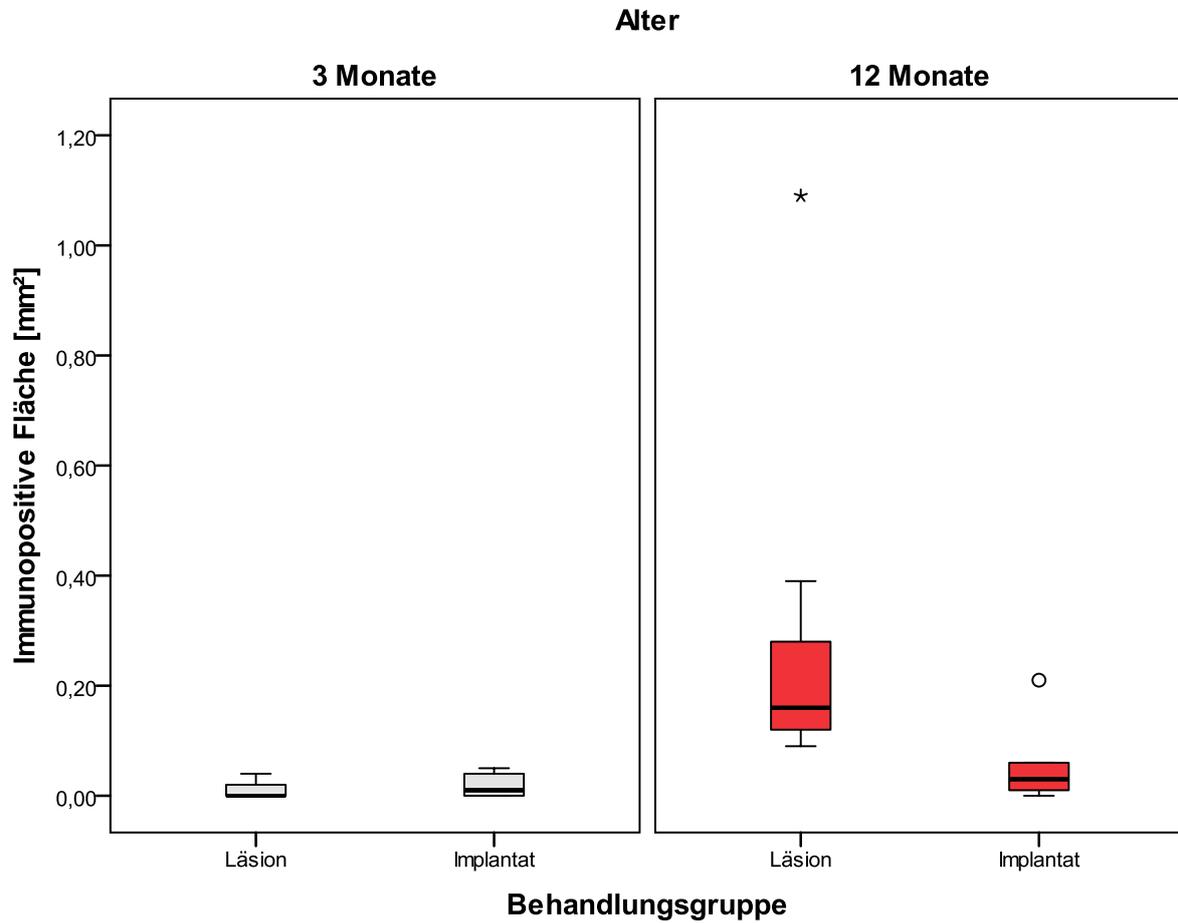
## •Rechter Anulus fibrosus, Mitte, MMP 13:

**Diagramm 10** Streuung der immunopositiven Flächen in der mittleren, rechten Anulus fibrosus-ROI. Bei den rot dargestellten 12-Monate-Gruppen wurde durch die statistischen Tests ein signifikanter Unterschied festgestellt.



## •Rechter Anulus fibrosus, unten, MMP 13:

**Diagramm 11** Streuung der immunopositiven Flächen in der unteren, rechten Anulus fibrosus-ROI. Bei den rot dargestellten 12-Monate-Gruppen wurde durch die statistischen Tests ein signifikanter Unterschied festgestellt.



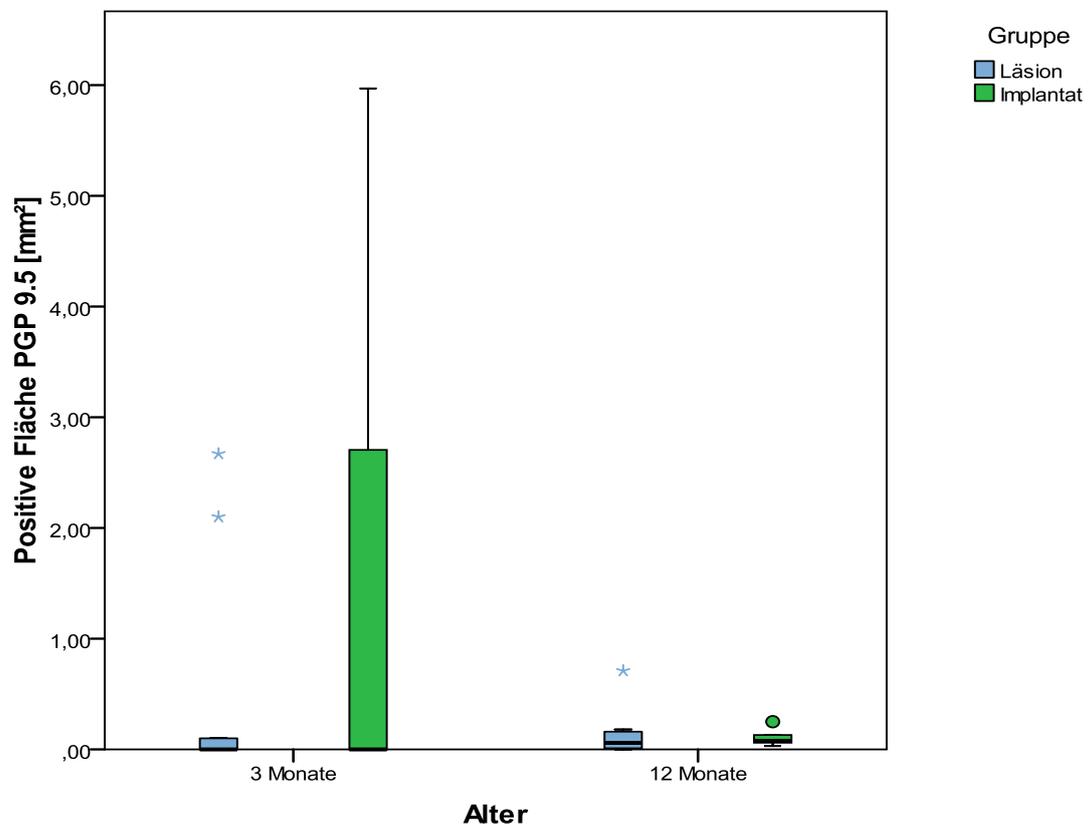
## 4.4 PGP 9.5:

**Tabelle 17** Deskriptive Statistik der für PGP 9.5 immunopositiven Gesamtflächen. Die Ergebnisse sind in den gleichen Farben wie die Boxplots der korrespondierenden Gruppen im Diagramm 12 dargestellt.

	Läsion-Gruppe		Implantat-Gruppe	
	3-Monate	12-Monate	3-Monate	12-Monate
Gültige Proben	9	9	7	6
Fehlende Proben	1	0	2	0
Minimum [mm <sup>2</sup> ]	0,0000	0,0000	0,0000	0,0300
Maximum [mm <sup>2</sup> ]	2,6700	0,7100	5,9700	0,2500
25 % [mm <sup>2</sup> ]	0,0000	0,0050	0,0000	0,0525
Median [mm <sup>2</sup> ]	0,0000	0,0600	0,0000	0,0750
75 % [mm <sup>2</sup> ]	1,1000	0,1700	2,7100	0,1600

„Fehlende Proben“ bezeichnet Proben von Tieren die zwar eingebettet wurden, jedoch im Laufe der weiteren Bearbeitung verloren gingen und nicht in die statistische Auswertung gelangten.

**Diagramm 12** Boxplot-Darstellung der Streuung der gegen PGP 9.5 immunopositiven Gesamtflächen aller Gruppen



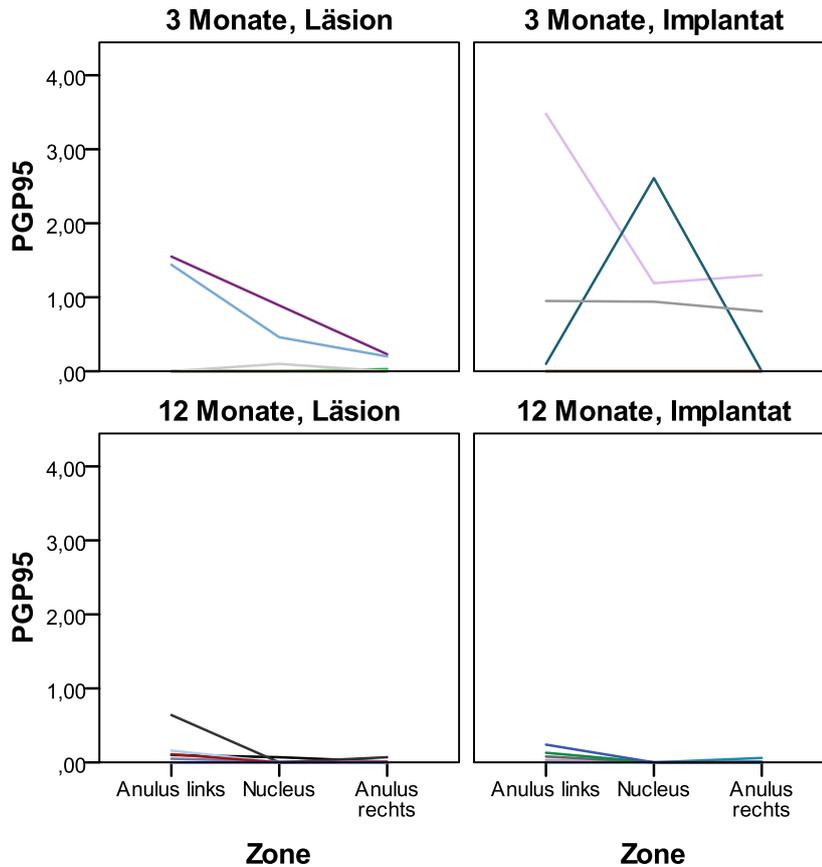
Bezüglich PGP 9.5 zeigt die statistische Analyse der Gesamtflächen in Tabelle 17 ähnliche Werte bei allen Gruppen, außer bei der 3-Monate-Implantat-Gruppe, die eine besonders große Streuung zeigt (siehe Diagramm 12). Der Median dieser Gruppe, der bei 0,06 mm<sup>2</sup> liegt, ist wegen seiner Nähe zur null-Linie nicht gut sichtbar. Beide Läsion-Gruppen und die 3-Monate-Implantat-Gruppen haben ihr Minimum bei 0 mm<sup>2</sup>. Die 3-Monate-Läsion-Gruppe zeigt zwei Extremwerte (S75 und S82). Die 12-Monate-Läsion-Gruppe zeigt ebenfalls einen Extremwert (S52) und die 12-Monate-Implantat-Gruppe besitzt einen Ausreißer (S70). Alle Extrem- und Ausreißerproben zeigen ihre übergroßen immunopositiven Flächen in der mittleren und oberen, linken Anulus-RoI.

**Tabelle 18** Statistische Ergebnisse der gegen PGP 9.5 immunopositiven Flächen der einzelnen Zonen innerhalb der Bandscheiben

		Linker Anulus	Nucleus	Rechter Anulus
3-Monate-Läsion	25 % [mm <sup>2</sup> ]	0,0000	0,0000	0,0000
	Median [mm <sup>2</sup> ]	0,0000	0,0000	0,0000
	75 % [mm <sup>2</sup> ]	0,7200	0,2800	0,1150
3-Monate-Implantat	25 % [mm <sup>2</sup> ]	0,0000	0,0000	0,0000
	Median [mm <sup>2</sup> ]	0,0000	0,0000	0,0000
	75 % [mm <sup>2</sup> ]	0,9500	1,1900	0,8100
12-Monate-Läsion	25 % [mm <sup>2</sup> ]	0,0000	0,0000	0,0000
	Median [mm <sup>2</sup> ]	0,0500	0,0000	0,0100
	75 % [mm <sup>2</sup> ]	0,1350	0,0050	0,0150
12-Monate-Implantat	25 % [mm <sup>2</sup> ]	0,0225	0,0000	0,0000
	Median [mm <sup>2</sup> ]	0,0700	0,0000	0,0050
	75 % [mm <sup>2</sup> ]	0,1575	0,0000	0,0225

Aus Tabelle 18 kann man entnehmen, dass die Quartilwerte des linken Anulus größer sind als die der anderen Zonen, außer bei der 3-Monate-Implantat-Gruppe, bei der die Nucleus-Zone einen höheren oberen Quartil besitzt. Alle Medianwerte der 3-Monate-Gruppen liegen bei null. Die Medianwerte aller Nucleus-Zonen liegen bei null.

**Diagramm 13** Grafische Darstellung der Ergebnisse für PGP 9.5 aller vier Gruppen. Jede Linie steht für ein Tier. Hier wird sichtbar, welche Zonen die größeren immunopositiven Flächen innerhalb der einzelnen Tiere besitzen.



Bei der Betrachtung der einzelnen RoIs kann man erkennen, dass viele der Linien einen relativ flachen Verlauf aufweisen. Außerdem bestätigt diese Grafik die Nullwerte der vorigen Tabellen, da sich viele Linien mit der Abszisse überschneiden oder nur minimal oberhalb liegen. Es ist zu erkennen, dass bei der Mehrzahl der Tiere, die linke Anuluszone (Läsionszone) die größte immunopositive Fläche besitzt. Die 3-Monate-Implantat-Gruppe zeigt im Vergleich mit den anderen Gruppen einen irreguläreren Verlauf ihrer Linien. Selbst bei dieser Gruppe kann man aber erkennen, dass der höchste Einzelwert bei der linken Anulus-Zone zu finden ist.

**Tabelle 19** Statistische Signifikanz zwischen beiden 3-Monate-Gruppen

	Linker Anulus	Nucleus	Rechter Anulus
Oben	0,218	0,285	0,879
Mitte	0,538	0,354	0,879
Unten	1,000	1,000	0,437

**Tabelle 20** Statistische Signifikanz zwischen beiden 12-Monate-Gruppen

	Linker Anulus	Nucleus	Rechter Anulus
Oben	0,664	1,000	1,000
Mitte	0,521	0,486	0,979
Unten	0,235	1,000	1,000

Durch die statistischen Tests kann kein signifikanter Unterschied zwischen den Streuungen der immunopositiven Flächen der Läsion- und Implantat-Gruppen gleichen Alters festgestellt werden.

#### 4.5 Kollagen Typ I:

**Tabelle 21** Deskriptive Statistik der gegen Kollagen Typ I immunopositiven Gesamtflächen. Die Ergebnisse sind in den gleichen Farben wie die Boxplots der korrespondierenden Gruppen im Diagramm 12 dargestellt.

	Läsion-Gruppe		Implantat-Gruppe	
	3-Monate	12-Monate	3-Monate	12-Monate
Gültige Proben	9	9	4	6
Fehlende Proben	1	0	5	0
Minimum [mm <sup>2</sup> ]	4,6100	0,4300	2,3900	1,1600
Maximum [mm <sup>2</sup> ]	11,5000	15,7700	5,1500	11,5400
25 % [mm <sup>2</sup> ]	5,3200	1,0400	2,7100	1,4225
Median [mm <sup>2</sup> ]	7,3000	3,3200	3,9200	5,9250
75 % [mm <sup>2</sup> ]	9,5200	6,8000	4,9050	11,5400

„Fehlende Proben“ bezeichnet Proben von Tieren die zwar eingebettet wurden, jedoch im Laufe der weiteren Bearbeitung verloren gingen und nicht in die statistische Auswertung gelangten.

**Diagramm 14** Boxplot-Darstellung der Streuung der gegen Kollagen Typ I immunopositiven Gesamtflächen aller Gruppen

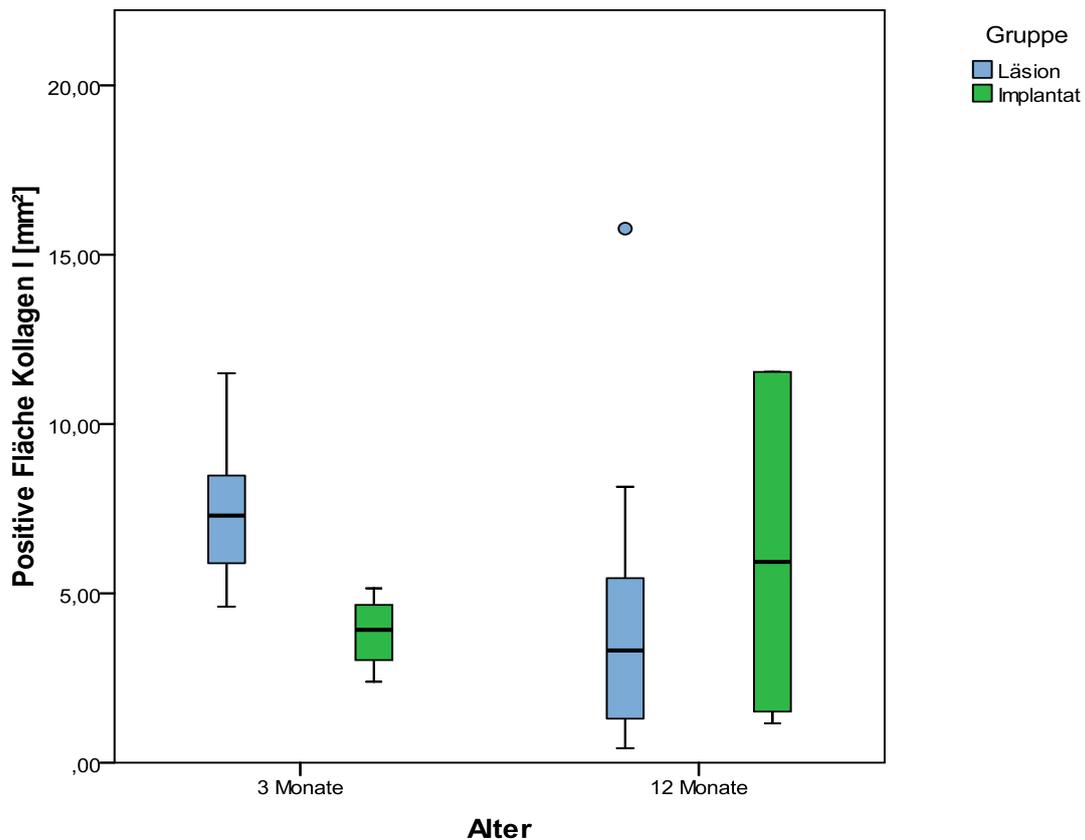


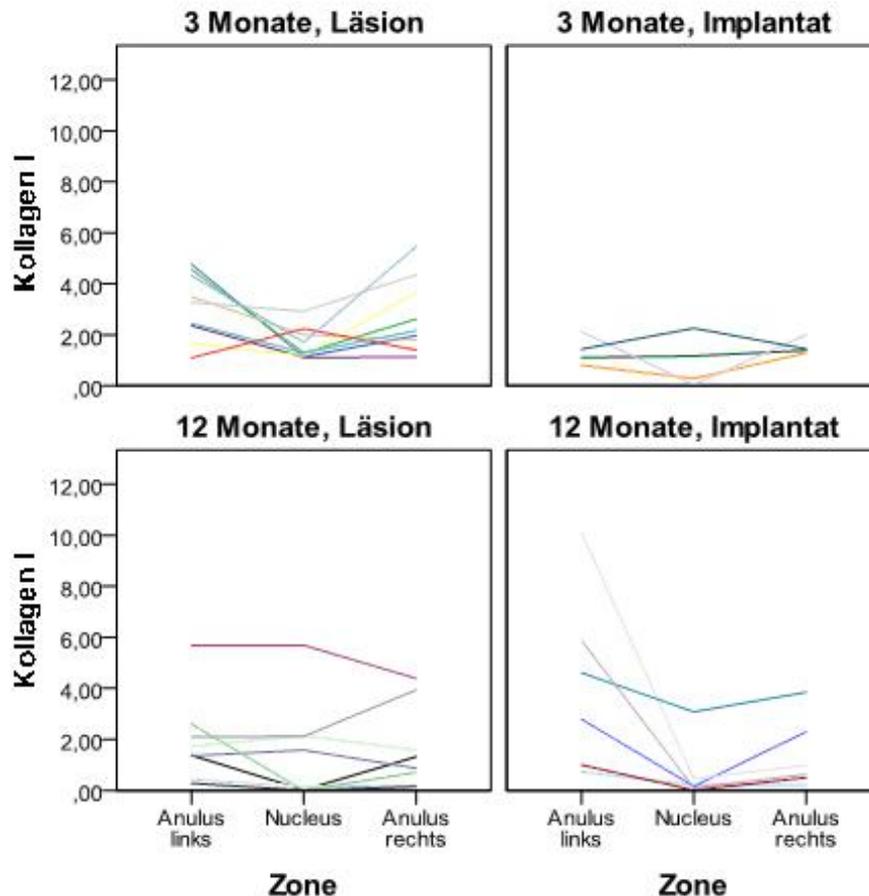
Tabelle 21 zeigt unterschiedliche Streuungen bei allen vier Gruppen. Der höchste Medianwert aller Gruppen liegt bei der 3-Monate-Läsion-Gruppe. Jedoch liegt das Maximum dieser Gruppe 0,04 mm<sup>2</sup> unter dem Maximum der 12-Monate-Implantat-Gruppe, welche die größte Streuung aller vier Gruppen zeigt. Bei den 3-Monate-Gruppen besitzt die Läsion-Gruppe die höheren Werte, wie im Diagramm 14 zu sehen ist. Bei den 12-Monate-Gruppen aber zeigt die Implantat-Gruppe die höheren Werte. Hier besitzt jedoch die Läsion-Gruppe als einzige Gruppe einen Ausreißer am Tier S53.

**Tabelle 22** Statistische Ergebnisse der gegen Kollagen Typ I immunopositiven Flächen der einzelnen Zonen innerhalb der Bandscheiben

		Linker Anulus	Nucleus	Rechter Anulus
3-Monate-Läsion	25 % [mm <sup>2</sup> ]	2,0150	1,1600	1,6050
	Median [mm <sup>2</sup> ]	3,2800	1,2900	2,1600
	75 % [mm <sup>2</sup> ]	4,4500	2,1250	4,0150
3-Monate-Implantat	25 % [mm <sup>2</sup> ]	0,8850	0,1025	1,3150
	Median [mm <sup>2</sup> ]	1,2750	0,7300	1,4200
	75 % [mm <sup>2</sup> ]	1,9575	1,9875	1,8625
12-Monate-Läsion	25 % [mm <sup>2</sup> ]	0,5850	0,0100	0,3250
	Median [mm <sup>2</sup> ]	1,3800	0,1500	0,8700
	75 % [mm <sup>2</sup> ]	2,3500	2,1300	2,7650
12-Monate-Implantat	25 % [mm <sup>2</sup> ]	0,9325	0,0775	0,4300
	Median [mm <sup>2</sup> ]	3,7000	0,1850	0,8100
	75 % [mm <sup>2</sup> ]	6,9275	1,1075	2,6875

Bei der Betrachtung der Medianwerte der drei Zonen aller Gruppen in Tabelle 22 kann man erkennen, dass bei drei der vier Gruppen die linke Anulus-Zone (Läsionszone) den höheren Medianwert besitzt. Nur bei der 3-Monate-Implantat-Gruppe liegt der Medianwert der rechten Anulus-Zone knapp über dem der linken Anulus-Zone. Von allen Gruppen besitzt die linke Anulus-Zone der 12-Monate-Implantat-Gruppe die höchsten Werte. Die Nucleuszonen weisen bei allen Gruppen die kleinsten Werte auf, außer bei der 3-Monate-Implantat-Gruppe. In dieser Gruppe zeigt die Nucleus-Zone ein höheres Maximum als die rechte Anulus-Zone. Die Nucleus-Zone der 3-Monate-Läsion-Gruppe zeigt die höchsten Werte aller anderen Nucleus-Zonen. Beide 12-Monate-Gruppen zeigen die kleinsten Werte in den Nucleus-Zonen, von diesen beiden Gruppen zeigt die Läsion-Gruppe die etwas kleineren Werte.

**Diagramm 15** Grafische Darstellung der Ergebnisse für Kollagen Typ I aller vier Gruppen. Jede Linie steht für ein Tier. Hier wird sichtbar, welche Zonen die größeren immunopositiven Flächen innerhalb der einzelnen Tiere besitzen.



Aus dem Diagramm 15 kann man entnehmen, dass bei der Mehrzahl der Tiere ein V-förmiges Färbungsmuster entsteht. Das Extremwert-Tier S53 der 12-Monate-Läsion-Gruppe erscheint hier als rosarote Linie relativ weit oberhalb der anderen, in der gleichen Gruppe. Bei diesem Tier sind die größeren immunopositiven Flächen im Nucleus und linken Anulus zu finden. Bei der 12-Monate-Implantat-Gruppe sind in dieser Grafik große Abstände zwischen den einzelnen Linien zu sehen, die weit nach oben reichen ohne dass die oberste Linie zum Ausreißer wird. In dieser Gruppe ist der linke Anulus mit Abstand die meist gefärbte Zone.

Kollagen Typ I kommt in allen Geweben des Säugetierorganismus vor. Diese Eigenschaft begrenzt die Aussagekraft der Kollagen Typ I-Konzentration als Degenerationsindikator. Vielmehr wird das Hineinreichen der Kollagen Typ I-Faser in nucleusnahe Gewebe als Indikator benutzt. Hierfür wird auf die Konzentration von Kollagen Typ I in den Übergangszonen im Vergleich zu Kollagen Typ II geachtet. Tabelle 23 zeigt die Statistik der Kollagen Typ I-Konzentration in den Übergangszonen aller Gruppen, der direkte Vergleich zu Kollagen Typ II erfolgt nach der statistischen Analyse von Kollagen Typ II in zusätzlichen Tabellen und Diagrammen.

## •3-Monate-Gruppen:

**Tabelle 23** Statistik der gegen Kollagen Typ I immunpositiven Flächen der Übergangszonen

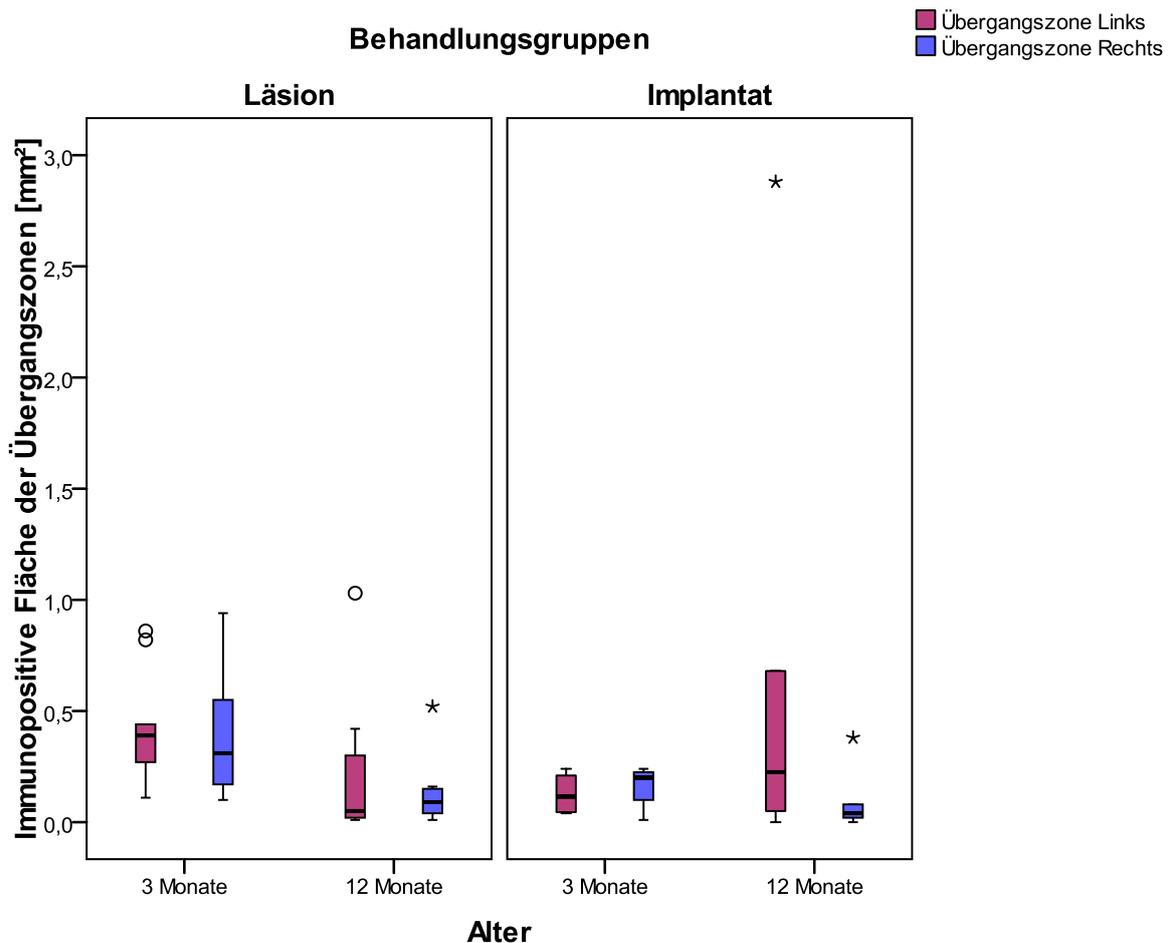
	<b>Läsion-Gruppe</b>		<b>Implantat-Gruppe</b>	
	Links	Rechts	Links	Rechts
<b>Minimum [mm<sup>2</sup>]</b>	0,110	0,100	0,040	0,010
<b>Median [mm<sup>2</sup>]</b>	0,390	0,310	0,115	0,200
<b>Maximum[mm<sup>2</sup>]</b>	0,440	0,940	0,240	0,240

## •12-Monate-Gruppen:

**Tabelle 24** Statistik der gegen Kollagen Typ I immunpositiven Flächen der Übergangszonen

	<b>Läsion-Gruppe</b>		<b>Implantat-Gruppe</b>	
	Links	Rechts	Links	Rechts
<b>Minimum [mm<sup>2</sup>]</b>	0,010	0,010	0	0
<b>Median [mm<sup>2</sup>]</b>	0,050	0,090	0,225	0,040
<b>Maximum[mm<sup>2</sup>]</b>	1,030	0,520	0,680	0,080

**Diagramm 16** Statistische Ergebnisse der gegen Kollagen Typ I immunopositiven Flächen der Übergangszonen. Grafische Darstellung der Ergebnisse aus den Tabellen 23 und 24



Die Übergangszonen zeigen, wie erwartet, niedrige Werte für Kollagen Typ I. Die Minima aller Gruppen sind entweder nahe oder gleich null. Die 3-Monate-Läsion-Gruppe zeigt eine ähnliche Streuung der Werte ihrer linken und rechten Übergangszone. Das Minimum beider Seiten liegt nah beieinander (0,11 und 0,10 mm<sup>2</sup>), diese sind somit auch die höchsten Minima aller untersuchten Gruppen. Der Median der linken Übergangszone (0,39 mm<sup>2</sup>) liegt etwas über dem Median der rechten Übergangszone (0,31 mm<sup>2</sup>). Unterschiede liegen bei der Länge der Interquartilsbreite einerseits und den Maxima andererseits. Die Interquartilsbreite der rechten Übergangszone ist doppelt so lang und ist außerdem von allen untersuchten Gruppen der einzige Fall, bei dem die rechte Übergangszone eine größere Streuung aufweist, als die linke Übergangszone. Während die linke Übergangszone zwei Ausreißer (S72 mit 0,82 mm<sup>2</sup> und S82 mit 0,86 mm<sup>2</sup>) aufweist, liegt das Maximum der rechten Übergangszone bei 0,94 mm<sup>2</sup> und liegt somit höher als die eben erwähnten Werte. Die 3-Monate-Implantat-Gruppe zeigt die kleinste Streuung aller Gruppen, wenn man beide Seiten zusammenzählt. Die Minima dieser Gruppe (jeweils 0,04 mm<sup>2</sup> und 0,01 mm<sup>2</sup>) liegen nah beieinander, die Maxima sind sogar gleich groß (beide 0,24 mm<sup>2</sup>). Die Medianwerte machen somit den größten Unterschied zwischen den Seiten dieser Gruppe aus und liegen bei 0,11 mm<sup>2</sup> auf der linken und 0,20 mm<sup>2</sup> auf der rechten Seite. Bei der 12-Monate-Läsion-Gruppe liegen die Minima auf der gleichen Höhe (0,01 mm<sup>2</sup>) und die Mediane sehr nah beieinander (links 0,05 mm<sup>2</sup> und rechts 0,09 mm<sup>2</sup>). Die Maxima (Ausreißer S53 mit 1,03 mm<sup>2</sup> links und Extremwert ebenfalls S53 mit 0,52 mm<sup>2</sup> rechts) liegen relativ weit auseinander. Die 12-Monate-Implantat-Gruppe zeigt die größten Unterschiede zwischen den Übergangszonen innerhalb der gleichen Gruppe. Zwar liegen beide Minima bei null, die Mediane aber (0,22 mm<sup>2</sup> links und 0,04 mm<sup>2</sup> rechts)

und viel mehr die Maxima (Extremwert S67 mit 2,88 mm<sup>2</sup> links und Extremwert S69 mit 0,38 mm<sup>2</sup> rechts) liegen so weit auseinander, wie bei keiner anderen untersuchten Gruppe.

Die statistischen Tests wurden auch für Kollagen Typ I durchgeführt:

**Tabelle 25** Statistische Signifikanz zwischen beiden 3-Monate-Gruppen

	Linker Anulus	Nucleus	Rechter Anulus
Oben	0,103	0,709	0,039
Mitte	0,050	0,330	0,148
Unten	0,011	0,140	0,483

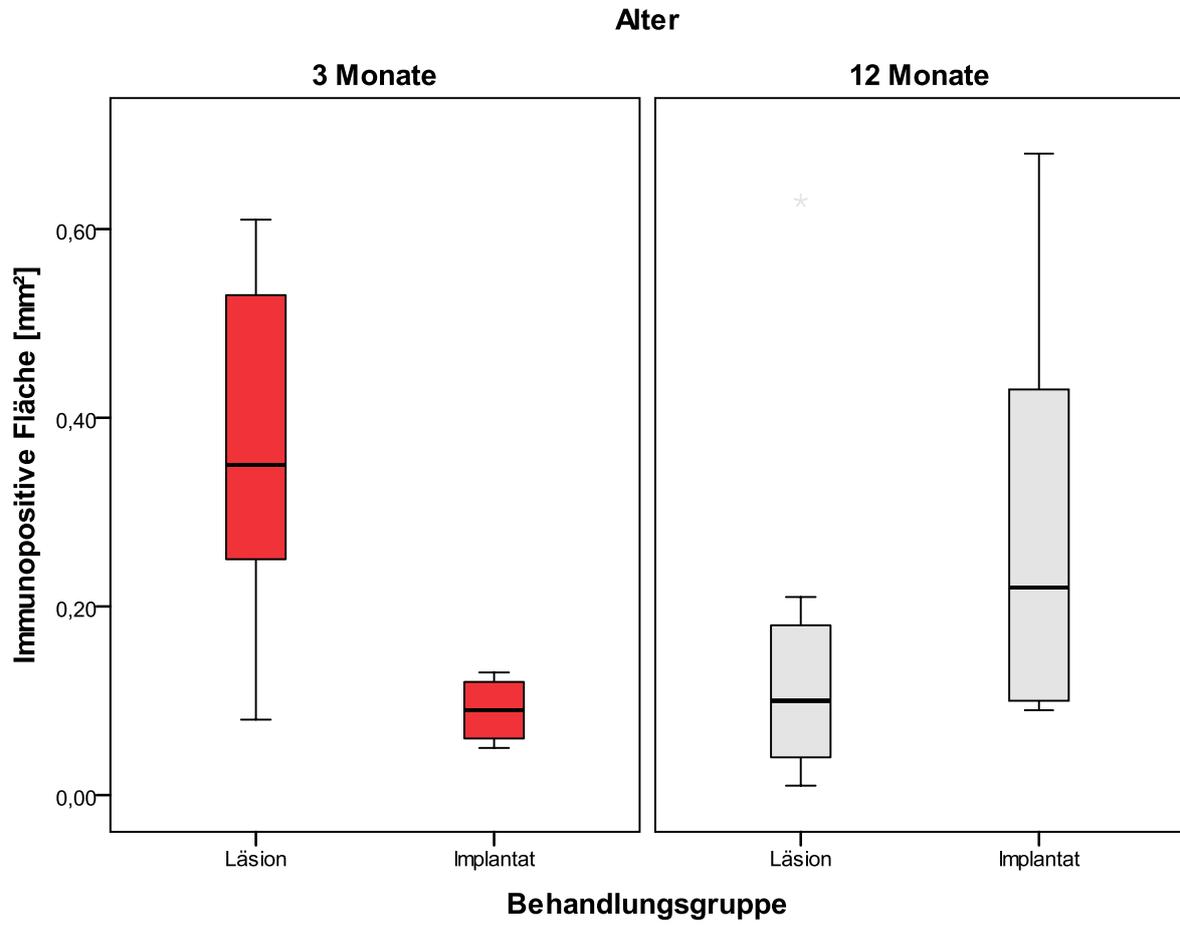
**Tabelle 26** Statistische Signifikanz zwischen beiden 12-Monate-Gruppen

	Linker Anulus	Nucleus	Rechter Anulus
Oben	0,474	0,185	0,977
Mitte	0,145	0,884	0,955
Unten	0,172	0,885	0,884

Die statistischen Tests ergaben einen signifikanten Unterschied zwischen beiden unteren linken-Anulus fibrosus-RoI und beiden oberen rechten-Anulus fibrosus-RoI der 3-Monate-Gruppen.

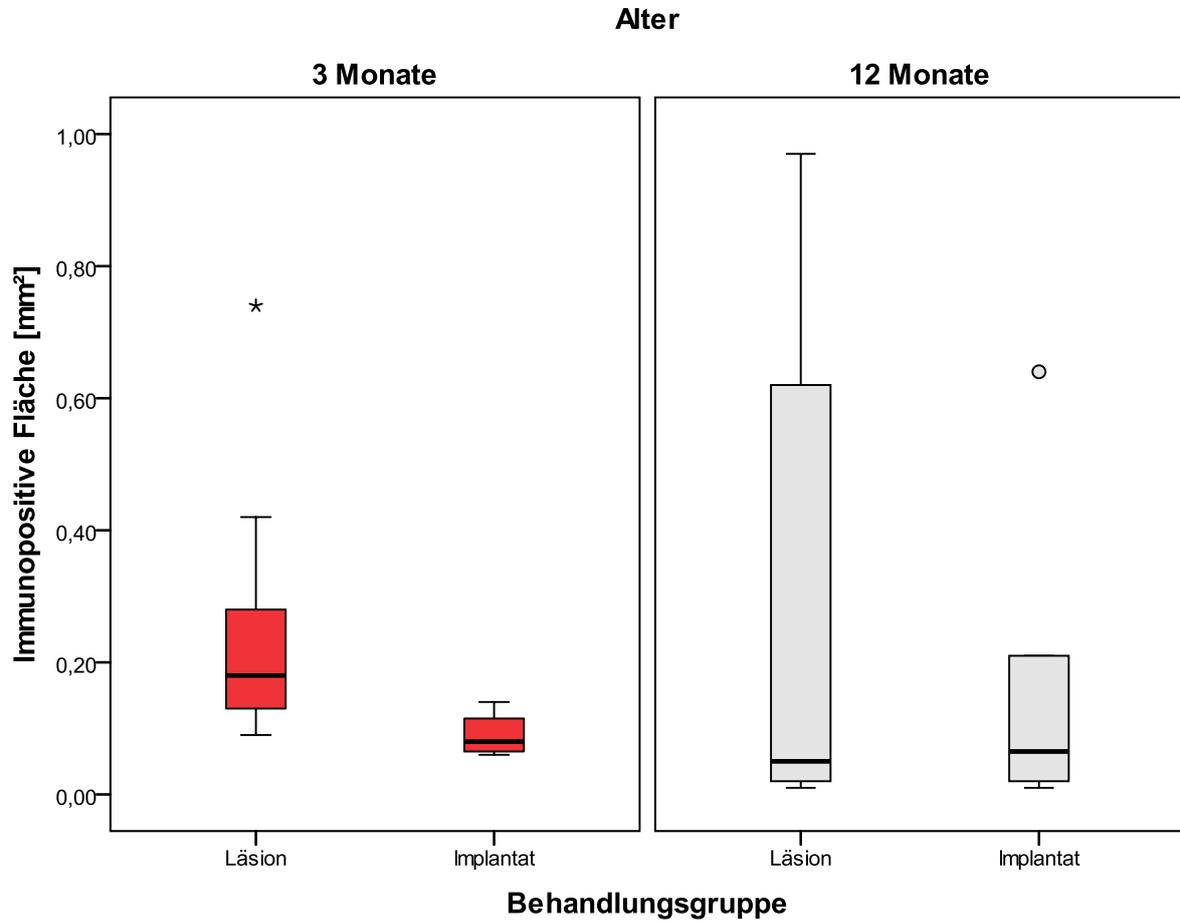
## Linker Anulus fibrosus, unten, Kollagen Typ I:

**Diagramm 17** Streuung der immunopositiven Flächen in der unteren, linken Anulus fibrosus-ROI. Bei den rot dargestellten 3-Monate-Gruppen wurde durch die statistischen Tests ein signifikanter Unterschied festgestellt.



## Rechter Anulus fibrosus, oben, Kollagen Typ I:

**Diagramm 18** Streuung der immunopositiven Flächen in der oberen, rechten Anulus fibrosus-ROI. Bei den rot dargestellten 3-Monate-Gruppen wurde durch die statistischen Tests ein signifikanter Unterschied festgestellt.



## 4.6 Kollagen Typ II:

**Tabelle 27** Deskriptive Statistik der gegen Kollagen Typ II immunopositiven Gesamtflächen. Die Ergebnisse sind in den gleichen Farben wie die Boxplots der korrespondierenden Gruppen im Diagramm 19 dargestellt.

	Läsion-Gruppe		Implantat-Gruppe	
	3-Monate	12-Monate	3-Monate	12-Monate
Gültige Proben	9	8	9	5
Fehlende Proben	0	1	0	1
Minimum [mm <sup>2</sup> ]	2,9100	5,2300	5,6500	6,9800
Maximum [mm <sup>2</sup> ]	11,1200	23,3000	22,2200	17,9400
25 % [mm <sup>2</sup> ]	4,1050	7,4300	11,2600	8,8550
Median [mm <sup>2</sup> ]	5,0200	15,4650	13,7400	10,9400
75 % [mm <sup>2</sup> ]	8,2000	21,8325	17,0650	16,8950

„Fehlende Proben“ bezeichnet Proben von Tieren die zwar eingebettet wurden, jedoch im Laufe der weiteren Bearbeitung verloren gingen und nicht in die statistische Auswertung gelangten.

**Diagramm 19** Boxplot-Darstellung der Streuung der gegen Kollagen Typ II immunopositiven Gesamtflächen aller Gruppen

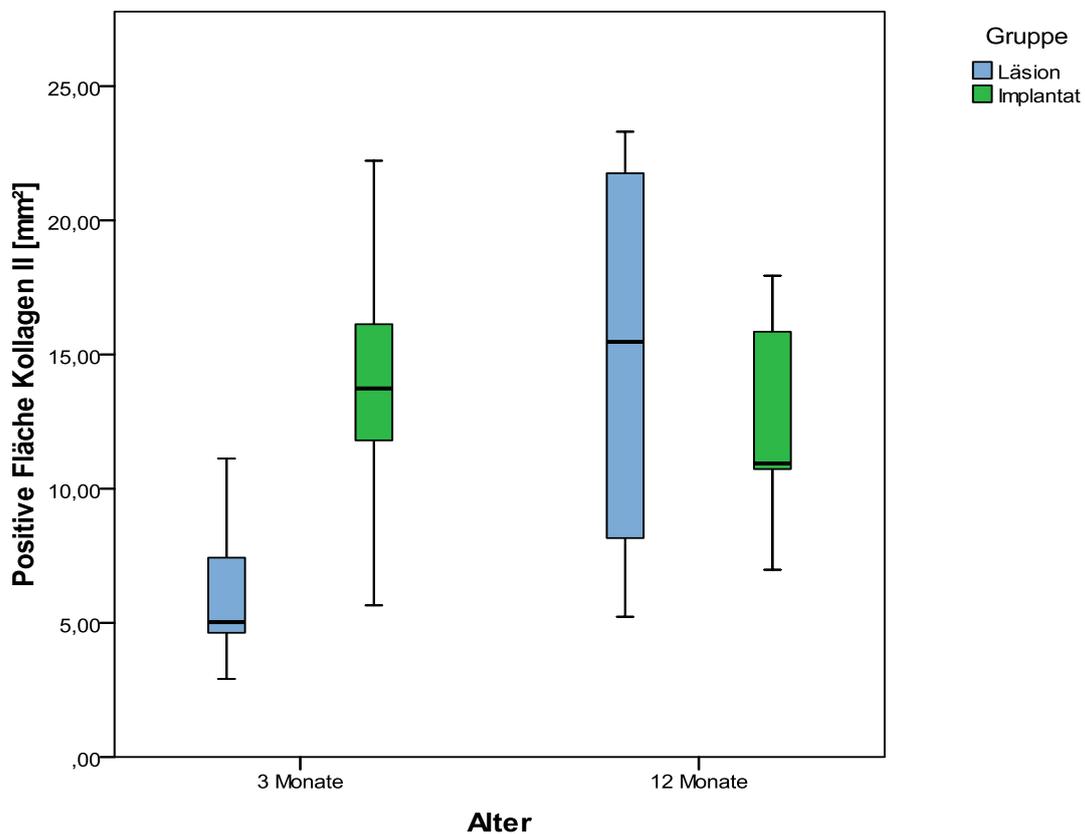


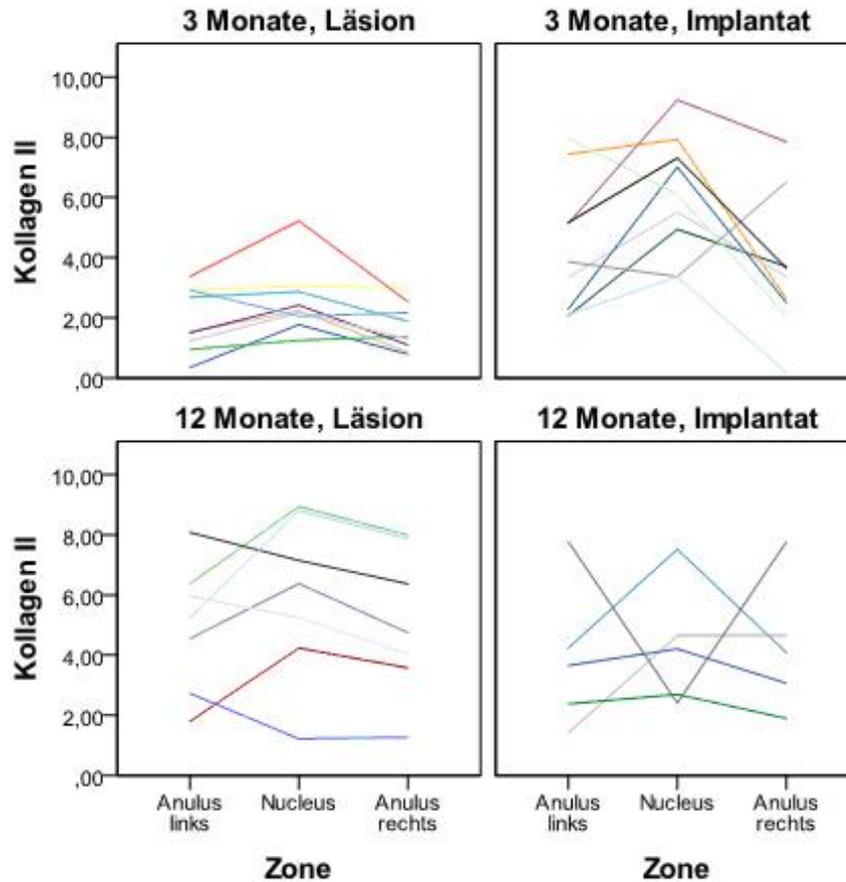
Tabelle 27 zeigt, dass die 3-Monate-Läsion-Gruppe die niedrigsten Werte und die kleinste Streuung aller Gruppen besitzt. Die größte Streuung und die höchsten Werte inklusive dem höchsten Medianwert sind bei der 12-Monate-Läsion-Gruppe zu finden. Von den Implantat-Gruppen besitzt die 12-Monate-Implantat-Gruppe die niedrigeren Werte sowie die kleinste Streuung. Weder Extremwerte noch Ausreißer werden bei diesem Antigen beobachtet. Als Nächstes werden die Ergebnisse in Zusammenhang mit ihren jeweiligen Entstehungszonen gebracht.

**Tabelle 28** Statistische Ergebnisse der gegen Kollagen Typ II immunpositiven Flächen der einzelnen Zonen innerhalb der Bandscheiben

		Linker Anulus	Nucleus	Rechter Anulus
3-Monate-Läsion	25 % [mm <sup>2</sup> ]	1,0900	1,9100	0,9800
	Median [mm <sup>2</sup> ]	1,5400	2,2300	1,3800
	75 % [mm <sup>2</sup> ]	2,9250	2,9650	2,3500
3-Monate-Implantat	25 % [mm <sup>2</sup> ]	2,200	4,1550	2,2800
	Median [mm <sup>2</sup> ]	3,8600	6,1000	3,3600
	75 % [mm <sup>2</sup> ]	6,3050	7,6200	5,1100
12-Monate-Läsion	25 % [mm <sup>2</sup> ]	2,7700	3,0325	1,8550
	Median [mm <sup>2</sup> ]	4,8950	5,8150	4,3950
	75 % [mm <sup>2</sup> ]	6,2675	8,3875	7,4950
12-Monate-Implantat	25 % [mm <sup>2</sup> ]	1,9000	2,5550	2,4850
	Median [mm <sup>2</sup> ]	3,6600	4,2100	4,0900
	75 % [mm <sup>2</sup> ]	6,0050	6,0850	6,2100

In Tabelle 28 sieht man, wie erwartet, dass bei fast allen Gruppen die Nucleus-Zonen stärker immunopositiv reagieren, als beide Anulus-Zonen. Die 3-Monate-Implantat-Gruppe hat ein Verhältnis der immunopositiven Flächen des Nucleus pulposus zu den immunopositiven Flächen beider Anuli fibrosi, von nahezu 2 zu 1 im Bereich der Medianen. Die 12-Monate-Implantat-Gruppe zeigt dagegen niedrigere Werte und einen geringen Unterschied zwischen den immunopositiven Flächen des Nucleus zu den Anuli, vor allem des rechten Anulus fibrosus. Die Nucleus-Zone der 12-Monate-Läsion-Gruppe zeigt auch hohe Werte. Die Anulus-Zonen zeigen bei dieser Gruppe aber ebenfalls hohe Werte, so dass der Unterschied zwischen denen und der Nucleus-Zone nicht so markant ausfällt, wie bei der 3-Monate-Implantat-Gruppe.

**Diagramm 20** Grafische Darstellung der Ergebnisse für Kollagen Typ II aller vier Gruppen. Jede Linie steht für ein Tier. Hier wird sichtbar, welche Zonen die größeren immunopositiven Flächen innerhalb der einzelnen Tiere besitzen.



In dieser Grafik fällt die große Streuung der Werte der immunopositiven Flächen auf. Die 3-Monate-Läsion-Gruppe ist die Gruppe mit der kleinsten Streuung. Ebenfalls in dieser Gruppe zu sehen ist die „A“-förmige Verteilung der Immunopositivität bei den meisten Proben, umgekehrt zu dem Muster der bei Kollagen Typ I zu sehen ist. Der geringe Unterschied zwischen den Zonen bei den 12-Monate-Gruppen ist in dieser Grafik ebenfalls gut zu erkennen. Das Tier S67 der 12-Monate-Implantat-Gruppe, hier als dunkelgraue Linie zu sehen, trägt mit seinen hohen Anulus-Werten und dem relativ niedrigen Nucleus-Wert wesentlich dazu bei, dass bei dieser Gruppe der Unterschied zwischen dem Nucleus und den Anuli der kleinste aller untersuchten Gruppen ist.

Für die Beurteilung der Endplatten wird die immunopositive Fläche der Endplatten als prozentualer Anteil der Gesamtfläche angegeben. Die oberen und unteren Endplatten jedes Tieres werden getrennt untersucht. Diagramm 21 zeigt die Verteilungen der immunopositiven Flächen der Endplatten ebenfalls als Prozentzahl der Gesamtfläche.

•Immunopositive Fläche in den Endplatten der 3-Monate-Gruppen als Prozentzahl der Gesamtfläche der Endplatten:

**Tabelle 29** Statistik der gegen Kollagen Typ II immunpositiven Flächen der Endplatten

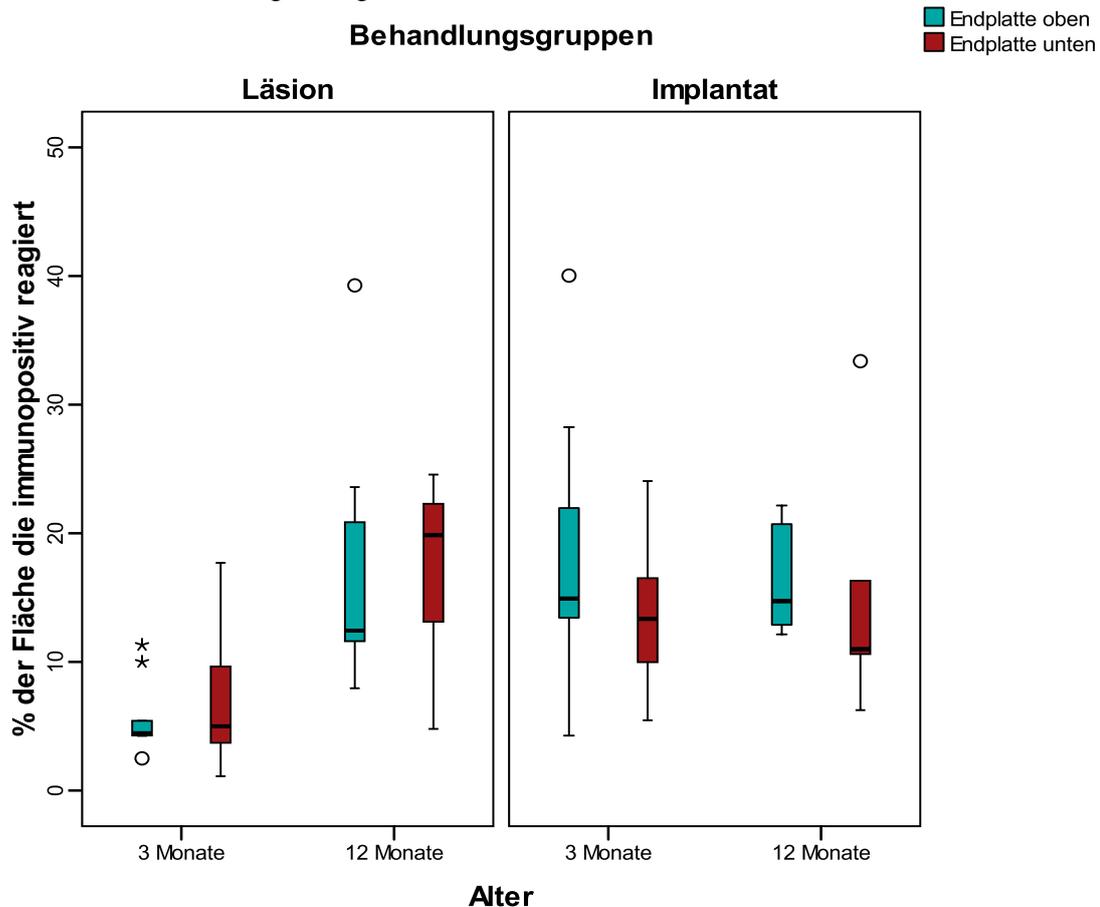
	<b>Läsion-Gruppe</b>		<b>Implantat-Gruppe</b>	
	Obere Endplatte	Untere Endplatte	Obere Endplatte	Untere Endplatte
<b>Minimum [%]</b>	2,50	1,11	4,27	5,46
<b>Median [%]</b>	4,46	5,00	14,93	13,34
<b>Maximum [%]</b>	11,32	17,70	40,03	24,06

•Immunopositive Fläche in den Endplatten der 12-Monate-Gruppen als Prozentzahl der Gesamtfläche der Endplatten:

**Tabelle 30** Statistik der gegen Kollagen Typ II immunpositiven Flächen der Endplatten

	<b>Läsion-Gruppe</b>		<b>Implantat-Gruppe</b>	
	Obere Endplatte	Untere Endplatte	Obere Endplatte	Untere Endplatte
<b>Minimum [%]</b>	7,95	4,79	12,14	6,25
<b>Median [%]</b>	12,43	19,85	14,72	10,99
<b>Maximum [%]</b>	39,27	24,56	22,16	33,38

**Diagramm 21** Statistische Ergebnisse der gegen Kollagen Typ II immunpositiven Flächen der Endplatten. Grafische Darstellung der Ergebnisse aus den Tabellen 29 und 30



Im Diagramm 21 sind die oberen und unteren Endplatten einer Gruppe zur besseren Veranschaulichung paarweise, aber in verschiedenen Farben dargestellt. Zu erkennen ist, dass die niedrigsten Werte der 3-Monate-Implantat-Gruppe zugeordnet werden. Hier zeigt sich die Streuung der oberen Endplatte als sehr gering, sie besitzt einen unteren Ausreißer am Tier S78, sowie zwei Extremwerte oberhalb der Box an den Tieren S74 und S75. Obwohl die Streuung der Werte der unteren Endplatte viel größer ist als die der oberen, liegen die Mediane eng aneinander bei ca. 5%. Im Vergleich dazu zeigt die 3-Monate-Implantat-Gruppe sowohl bei der oberen, als auch bei der unteren Endplatte eine sehr große Streuung ihrer Werte. Ähnlich wie bei der 3-Monate-Läsion-Gruppe, liegen beide Mediane relativ eng beieinander zwischen 13% und 15%. Bei dieser Gruppe aber liegen alle drei Quartile, insbesondere die der oberen Endplatte, viel höher als die der 3-Monate-Läsion-Gruppe. Beide 12-Monate-Gruppen besitzen eine ähnliche Streuung wie die der 3-Monate-Implantat-Gruppe. Von beiden 12-Monate-Gruppen besitzt die Läsion-Gruppe eine etwas größere Streuung. Die 12-Monate-Läsion-Gruppe zeigt eine ähnliche Interquartilsbreite ihrer oberen und unteren Endplatte, wobei die der unteren Endplatte geringfügig höher liegt. Der Medianwert der oberen Endplatte liegt bei 12,4%, während der der unteren Endplatte bei ca. 19% liegt. Die obere Endplatte besitzt als einzige in dieser Gruppe einen Ausreißer oberhalb der Box bei 39%, hierbei handelt es sich um das Tier S55. Die 12-Monate-Implantat-Gruppe zeigt sowohl bei der oberen, als auch bei der unteren Endplatte eine der 3-Monate-Implantat-Gruppe fast identische Interquartilsbreite. Unterschiede stellen die Längen der Whiskers dar, die bei der 12-Monate-Gruppe viel enger an den Boxen liegen und die Medianwerte, die bei der gleichen Gruppe weiter auseinander liegen, zwischen 11% und 14,7%. Die untere Endplatte dieser Gruppe zeigt einen Ausreißer am Tier S63, welches bei 33,3% liegt.

Die Expression von Kollagen Typ II wurde, wie bei Kollagen Typ I, in den Übergangszonen untersucht. Die folgende Tabelle zeigt die Medianwerte aller vier Gruppen:

•3-Monate-Gruppen:

**Tabelle 31** Statistik der gegen Kollagen Typ II immunpositiven Flächen der Übergangszonen

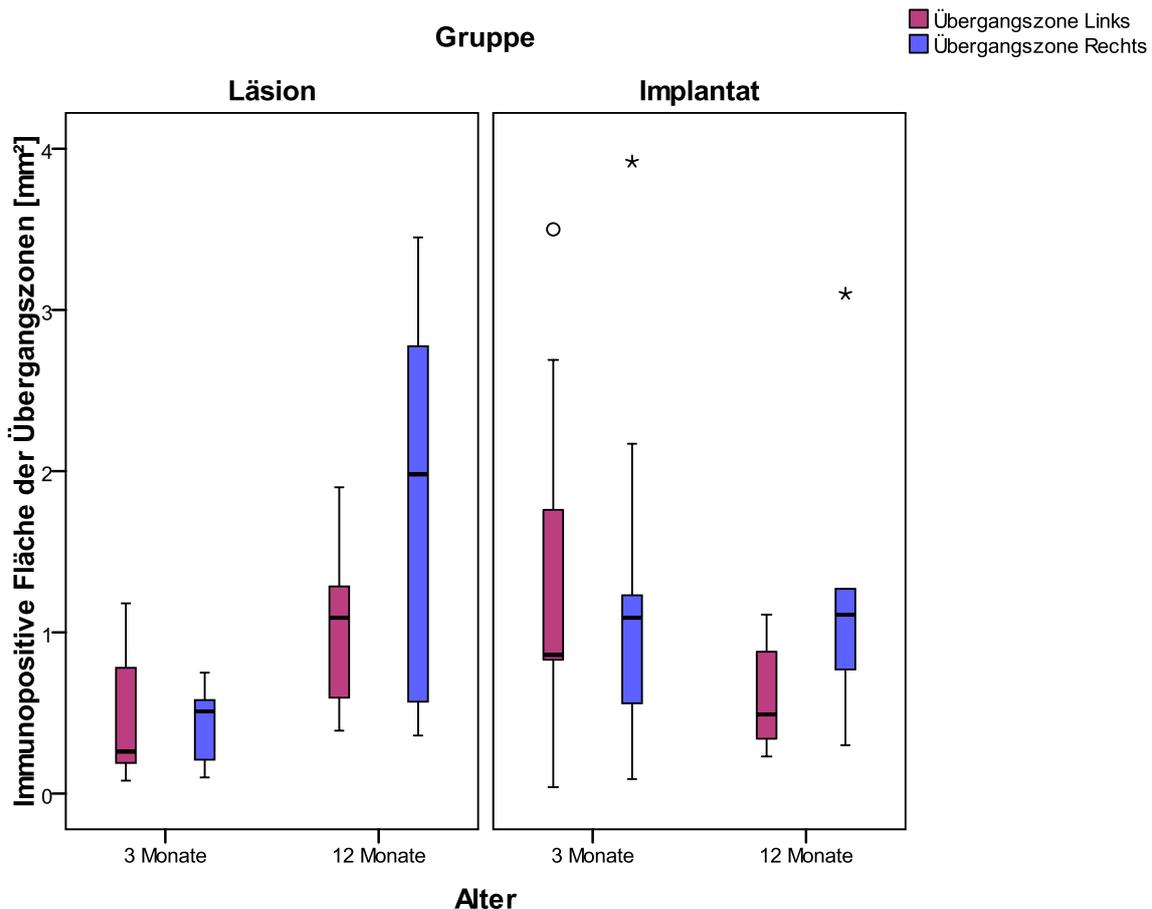
	<b>Läsion-Gruppe</b>		<b>Implantat-Gruppe</b>	
	Links	Rechts	Links	Rechts
<b>Minimum [mm<sup>2</sup>]</b>	0,080	0,100	0,040	0,090
<b>Median [mm<sup>2</sup>]</b>	0,260	0,510	0,860	1,090
<b>Maximum[mm<sup>2</sup>]</b>	1,180	0,750	3,500	3,920

•12-Monate-Gruppen:

**Tabelle 32** Statistik der gegen Kollagen Typ II immunpositiven Flächen der Übergangszonen

	<b>Läsion-Gruppe</b>		<b>Implantat-Gruppe</b>	
	Links	Rechts	Links	Rechts
<b>Minimum [mm<sup>2</sup>]</b>	0,390	0,360	0,230	0,300
<b>Median [mm<sup>2</sup>]</b>	1,090	1,980	0,490	1,110
<b>Maximum[mm<sup>2</sup>]</b>	1,900	3,450	1,110	3,100

**Diagramm 22** Statistische Ergebnisse der gegen Kollagen Typ I immunopositiven Flächen der Übergangszonen. Grafische Darstellung der Ergebnisse aus den Tabellen 31 und 32



Das Diagramm 22 zeigt grafisch die Streuungen der Werte der Übergangszonen aller Gruppen. Die 3-Monate-Läsion-Gruppe zeigt die kleinsten und niedrigsten Werte aller Gruppen, die sich auch in den niedrigen Medianwerten (zwischen 0,26 mm<sup>2</sup> der linken und 0,51 mm<sup>2</sup> der rechten Übergangszonen) widerspiegeln. Die 3-Monate-Implantat-Gruppe besitzt zwar Minimum-Werte die geringfügig niedriger sind als die der 3-Monate-Läsion-Gruppe, ihre Streuungen sind aber viel größer als die der Läsion-Gruppe. Zudem ist bei der linken Übergangszone ein Ausreißer und bei der rechten ein Extremwert zu finden. Es handelt sich dabei jeweils um die Tiere S92 und S93, die Werte zwischen 3,50 mm<sup>2</sup> und 4 mm<sup>2</sup> aufweisen. Die 12-Monate-Läsion-Gruppe zeigt sehr unterschiedliche Streuungen ihrer linken und rechten Übergangszonen. Während die Größe der Streuung ihrer linken Übergangszonen in der Größe, in etwa der Streuung der linken Übergangszonen der 3-Monate-Läsion-Gruppe ähnelt, liegen ihre Werte höher als die ihres 3-monatigen Homologes, was auch an der Lage des Medianwertes zu sehen ist. Die rechte Übergangszone der 12-Monate-Läsion-Gruppe zeigt die größte Streuung aller Gruppen, wenn man hierfür nur die normale Spannbreite und nicht die Ausreißer aus der 3-Monate-Implantat-Gruppe mitzählt. An der Lage des Medianwertes (1,98 mm<sup>2</sup>) macht sich dieser erhebliche Unterschied zu den anderen Gruppen bemerkbar. Die 12-Monate-Implantat-Gruppe dagegen zeigt überraschend kleine Streuungen, die niedriger liegen als die der 12-Monate-Läsion-Gruppe. Ihre linke Übergangszone besitzt eine Streuung und Quartilwerte die denen der 3-Monate-Läsion-Gruppe ähnlich sind, ihr Medianwert liegt bei 0,49 mm<sup>2</sup>. Die rechte Übergangszone dieser Gruppe zeigt sich etwas höher als die linke (Medianwert bei 1,11 mm<sup>2</sup>), und besitzt einen Extremwert am Tier S67, dessen Übergangszone eine 3,10 mm<sup>2</sup> große immunopositive Fläche zeigt.

Die Ergebnisse der statistischen Tests für Kollagen Typ II ergaben:

**Tabelle 33** Statistische Signifikanz zwischen beiden 3-Monate-Gruppen

	Linker Anulus	Nucleus	Rechter Anulus
Oben	0,006	0,021	0,018
Mitte	0,022	0,000	0,053
Unten	0,053	0,079	0,356

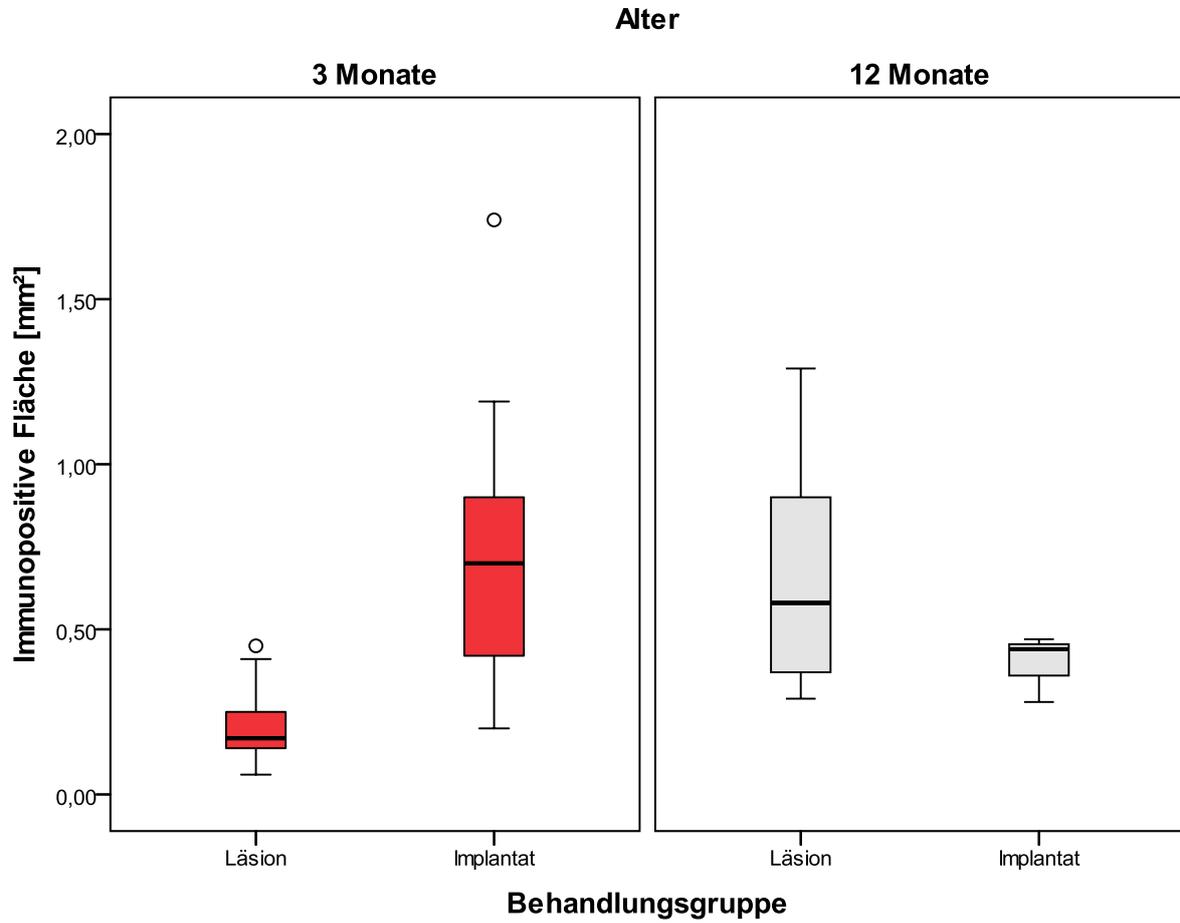
**Tabelle 34** Statistische Signifikanz zwischen beiden 12-Monate-Gruppen

	Linker Anulus	Nucleus	Rechter Anulus
Oben	0,263	0,598	0,713
Mitte	0,543	0,368	0,808
Unten	0,685	0,570	0,214

Durch die statistischen Tests wurde ein signifikanter Unterschied zwischen den Streuungen der immunopositiven Flächen der gesamten oberen Endplatte, dem linken mittleren Anulus und dem mittleren Nucleus pulposus-RoI der 3-Monate-Gruppen (siehe Tabelle 33) festgestellt.

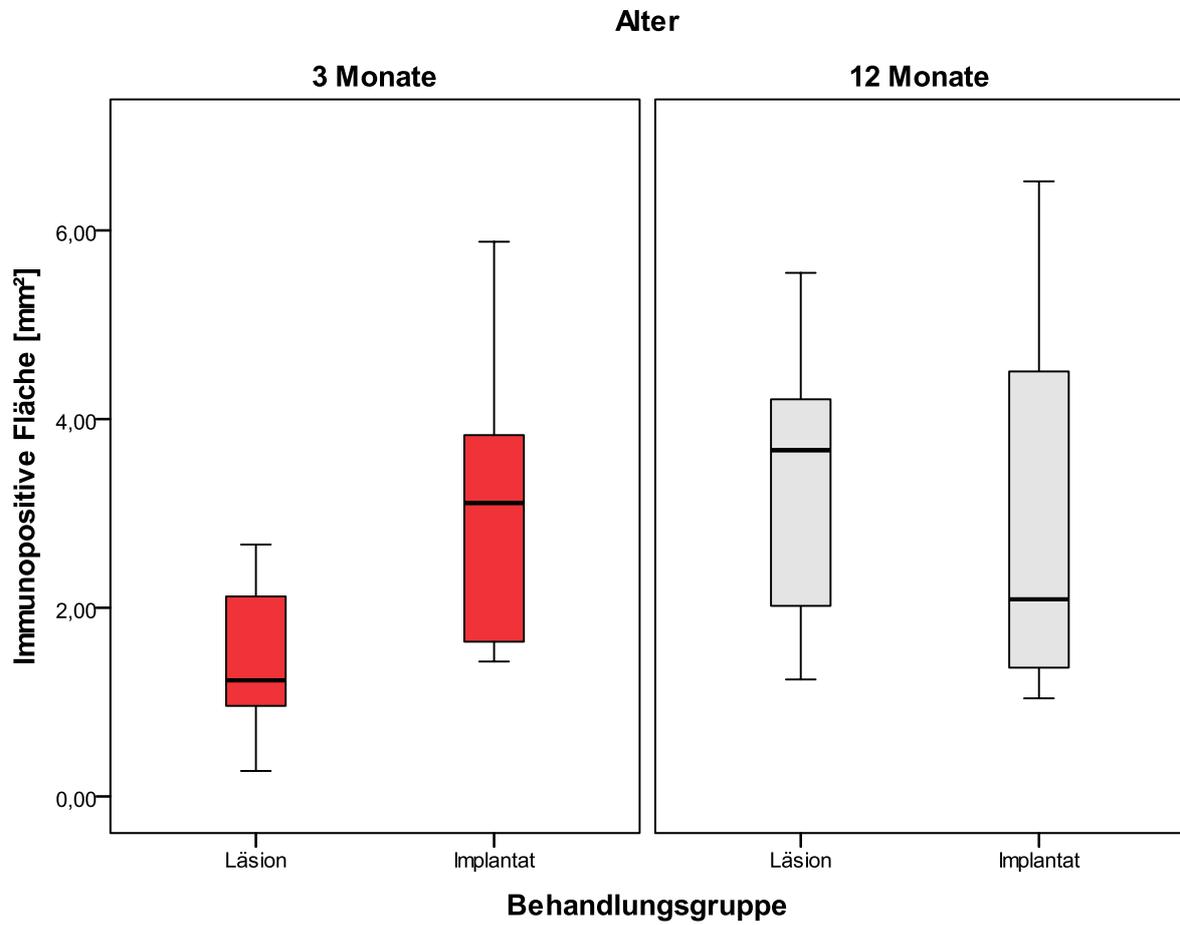
## •Linker Anulus fibrosus, oben, Kollagen Typ II:

**Diagramm 23** Streuung der immunopositiven Flächen in der oberen, linken Anulus fibrosus-ROI. Bei den rot dargestellten 3-Monate-Gruppen wurde durch die statistischen Tests ein signifikanter Unterschied festgestellt.



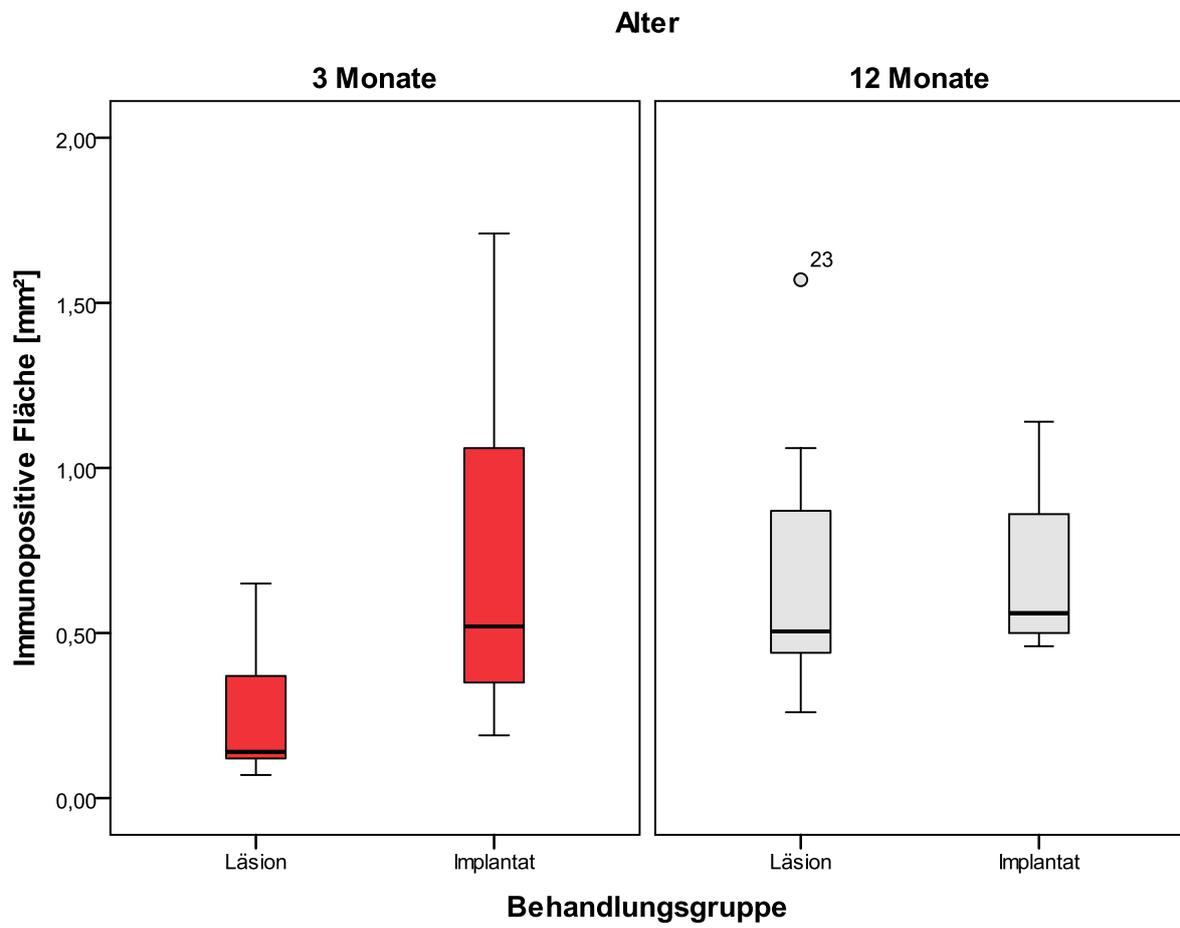
## •Linker Anulus fibrosus, Mitte, Kollagen Typ II:

**Diagramm 24** Streuung der immunopositiven Flächen in der mittleren, linken Anulus fibrosus-ROI. Bei den rot dargestellten 3-Monate-Gruppen wurde durch die statistischen Tests ein signifikanter Unterschied festgestellt.



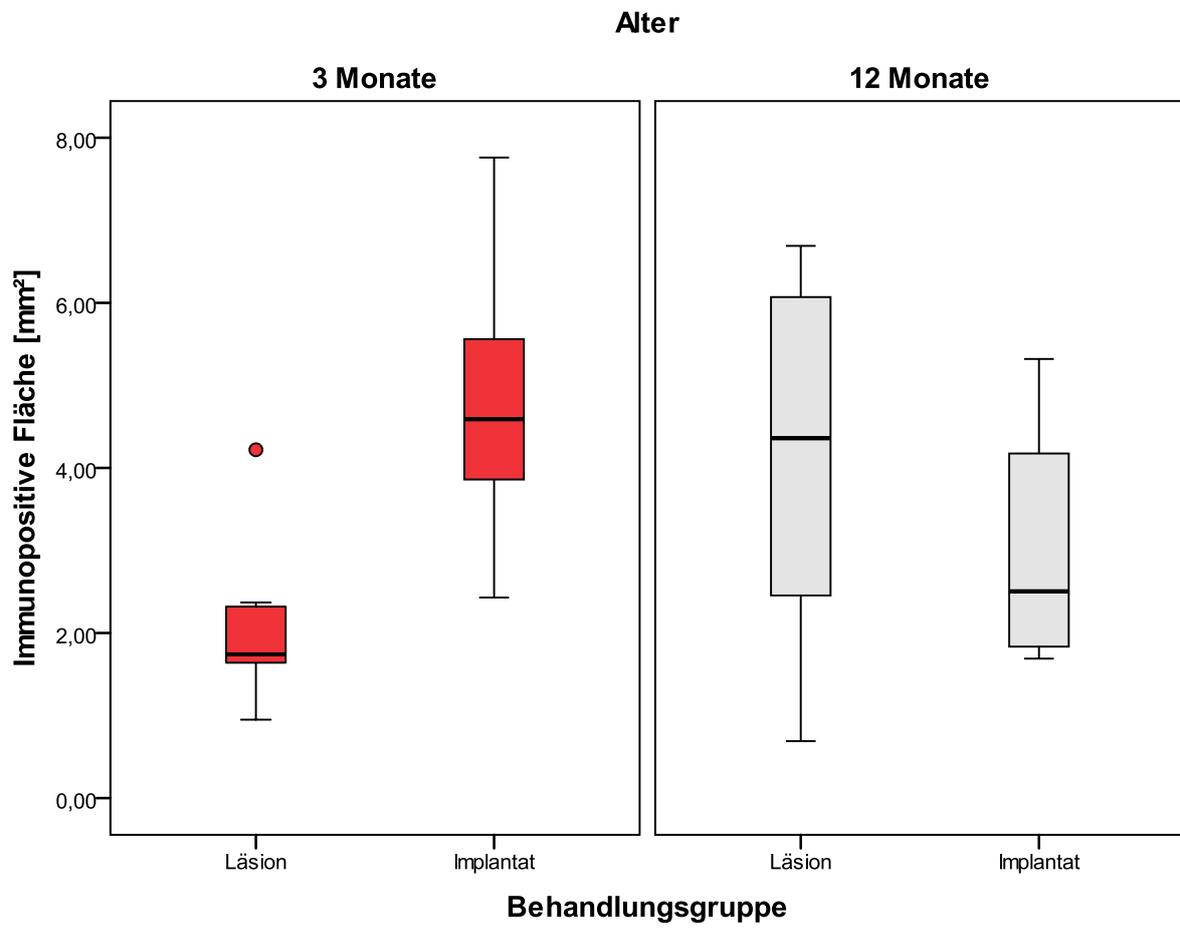
## •Nucleus pulposus, oben, Kollagen Typ II:

**Diagramm 25** Streuung der immunopositiven Flächen in der oberen, Nucleus pulposus-ROI. Bei den rot dargestellten 3-Monate-Gruppen wurde durch die statistischen Tests ein signifikanter Unterschied festgestellt.



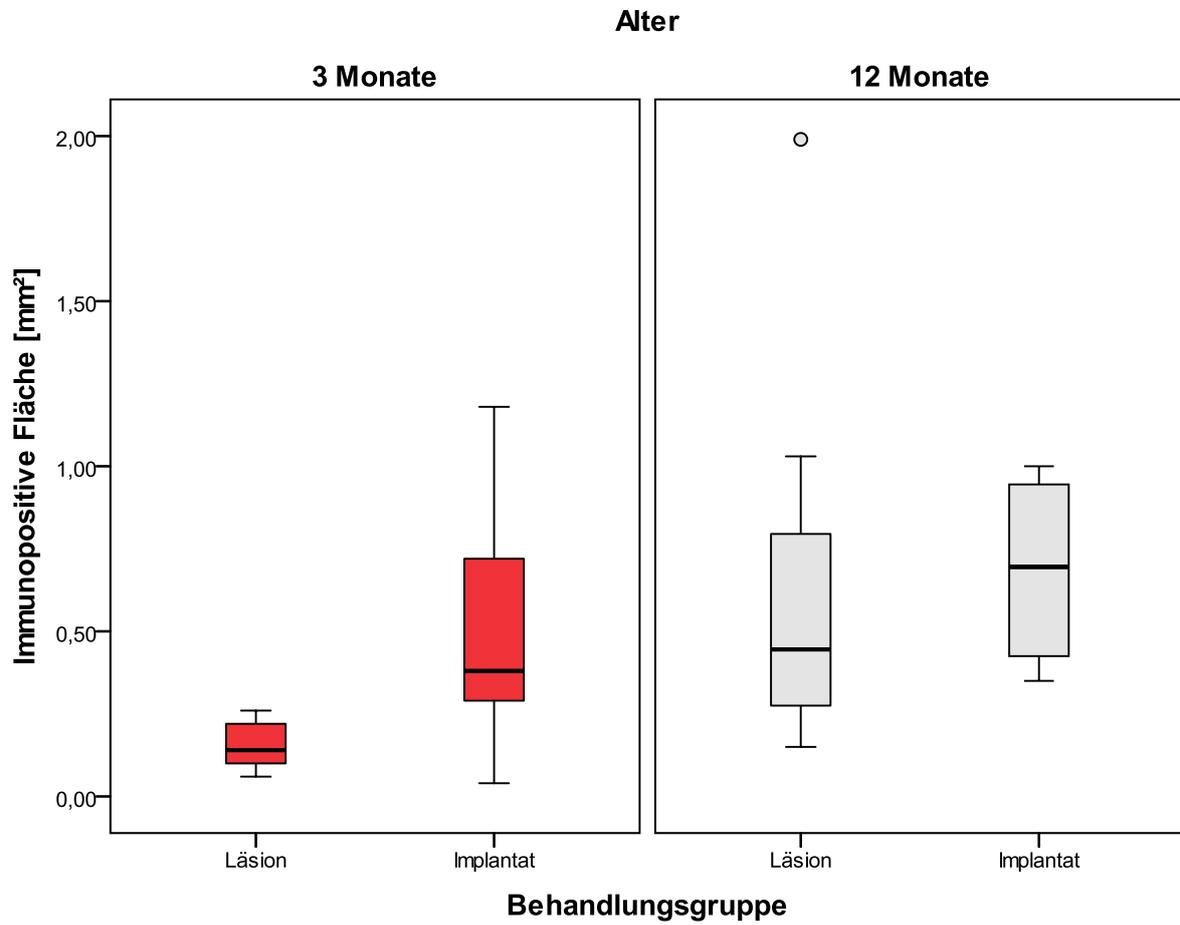
## •Nucleus pulposus, Mitte, Kollagen Typ II:

**Diagramm 26** Streuung der immunopositiven Flächen in der mittleren Nucleus pulposus-ROI. Bei den rot dargestellten 3-Monate-Gruppen wurde durch die statistischen Tests ein signifikanter Unterschied festgestellt.



**•Rechter Anulus fibrosus, oben, Kollagen Typ II:**

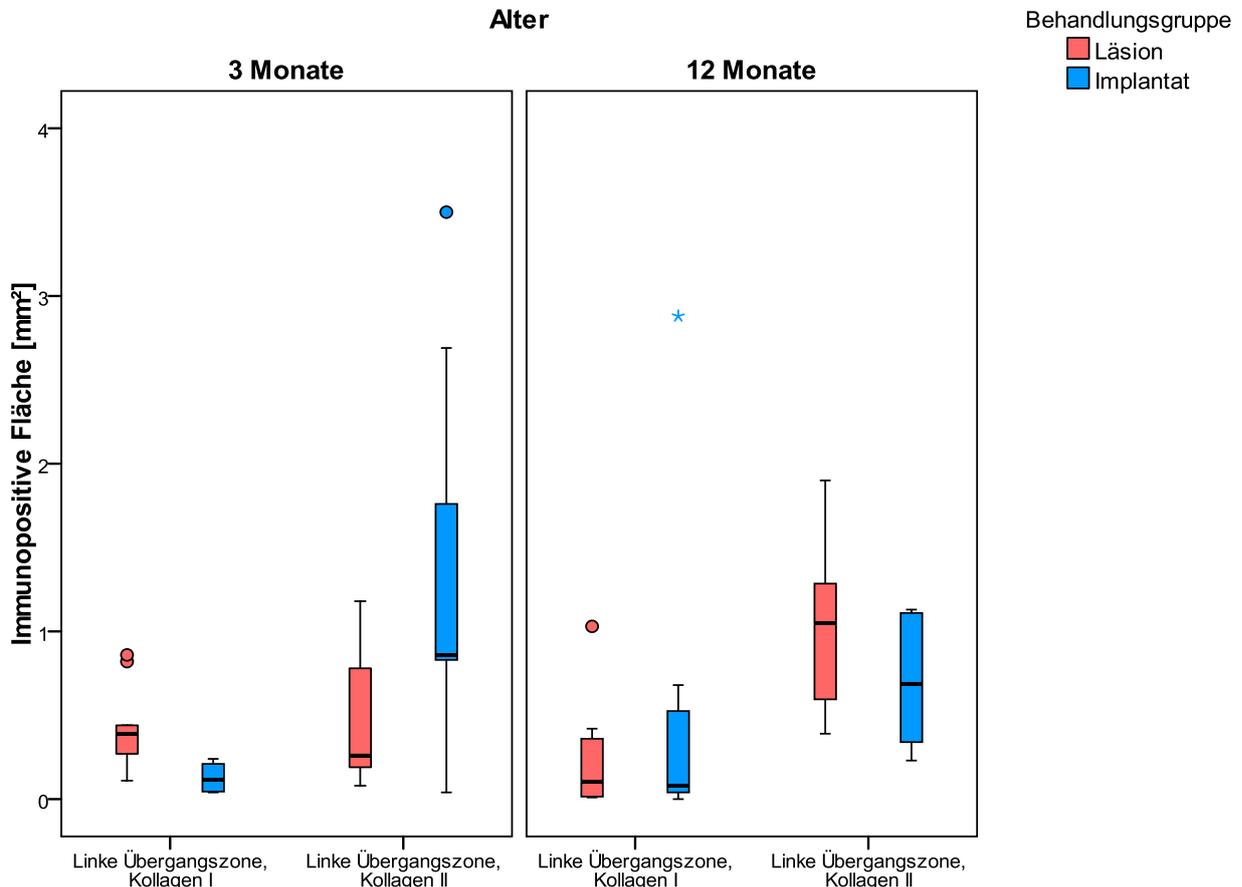
**Diagramm 27** Streuung der immunopositiven Flächen in der oberen, rechten Anulus fibrosus-ROI. Bei den rot dargestellten 3-Monate-Gruppen wurde durch die statistischen Tests ein signifikanter Unterschied festgestellt.



## 4.7 Kollagen Typ I und Typ II in Vergleich in den Übergangszonen

## •Linke Übergangszonen:

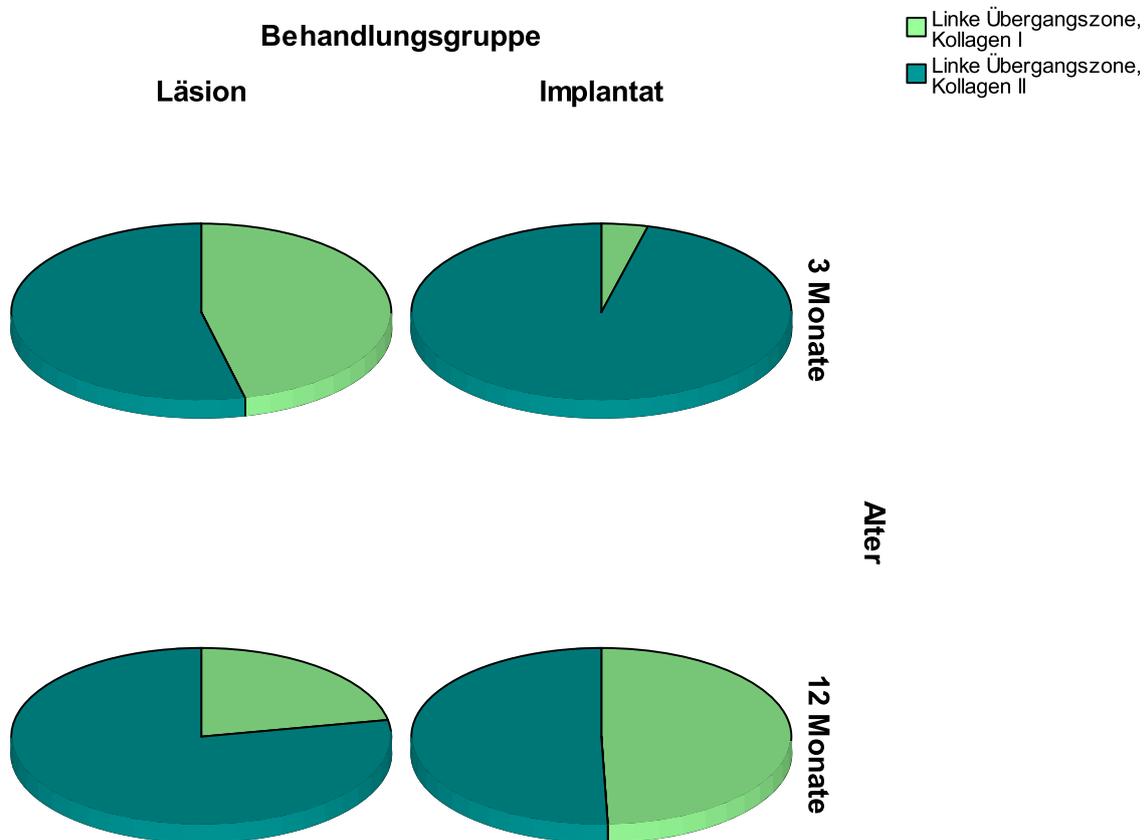
**Diagramm 28** Grafische Darstellung der Streuung der gegen Kollagen Typ I und Typ II immunopositiven Flächen der linken Übergangszonen aller vier Gruppen



Als Erstes werden die linken Übergangszonen miteinander verglichen. Bei den 3-Monate-Gruppen zeigen beide Behandlungsgruppen höhere Werte der Immunreaktion gegen Kollagen Typ II, als gegen Kollagen Typ I. Die Streuung der gegen Kollagen Typ I immunopositiven Fläche der 3-Monate-Läsion-Gruppe zeigt einen höheren Medianwert und ein höheres Minimum, als die Streuung der gegen Kollagen Typ II immunopositiven Fläche der gleichen Behandlungs- und Altersgruppe. Jedoch ist die Streuung der gegen Kollagen Typ II immunopositiven Flächen größer und ihr Maximum liegt sogar höher, als die beiden Ausreißer der gegen Kollagen Typ I immunopositiven Fläche der gleichen Behandlungs- und Altersgruppe. Die 3-Monate-Implantat-Gruppe zeigt einen deutlicheren Unterschied zwischen ihren gegen Kollagen Typ I und Typ II immunopositiven Flächen der linken Übergangszone. Die gegen Kollagen Typ I immunopositive Fläche zeigt bei dieser Gruppe eine sehr kleine Streuung zwischen 0,01 mm<sup>2</sup> und 0,24 mm<sup>2</sup>. Dagegen zeigt die gleiche Gruppe gegen Kollagen Typ II eine große Streuung mit höheren Werten. Schon der Medianwert dieses Antigens, der bei 0,86 mm<sup>2</sup> liegt, wäre in der gegen Kollagen Typ I Streuung der gleichen Gruppe ein Extremwert. Die 12-Monate-Gruppen zeigen im Prinzip ein ähnliches Streuungsmuster wie die 3-Monate-Gruppen (größere Streuung und höhere Werte gegen Kollagen Typ II als gegen Typ I), jedoch in unterschiedlicher Ausprägung und mit einigen Unterschieden. Die Streuung der gegen Kollagen Typ I immunopositiven Flächen der 12-Monate-Läsion-Gruppe bleibt wie bei der 3-Monate-Gruppe, relativ klein und mit niedrigen

Werten zwischen  $0,01 \text{ mm}^2$  und der Ausreißer bei  $1,03 \text{ mm}^2$ . Gegen Kollagen Typ II dagegen zeigt die gleiche Gruppe eine viel größere Streuung und höhere Werte. Selbst der Medianwert dieses Antigens liegt bei  $1,09 \text{ mm}^2$ , das heißt, über dem Maximum und Ausreißer der gegen Kollagen Typ I immunopositiven Fläche. Auch das Minimum dieses Antigens, das bei  $0,39 \text{ mm}^2$  liegt, ist höher als das obere Quartil der Streuung von Kollagen Typ I. Bei den Implantat-Gruppen sind die Unterschiede überraschenderweise weniger ausgeprägt. Die Implantat-Gruppe zeigt eine umgekehrte Entwicklung in Bezug auf die Konzentration von Kollagen Typ I und Typ II als die Läsion-Gruppe. Bei der 12-Monate-Implantat-Gruppe zeigt die Streuung von Kollagen Typ I Werte zwischen  $0 \text{ mm}^2$  und  $0,68 \text{ mm}^2$ , das heißt, immer noch etwas niedriger als die Streuung der Werte von Kollagen Typ II der gleichen Gruppe, die zwischen  $0,23 \text{ mm}^2$  und  $1,11 \text{ mm}^2$  liegen. Jedoch zeigt die Streuung von Kollagen Typ I einen Extremwert in dieser Gruppe bei  $2,88 \text{ mm}^2$ . In anderen Worten zeigt diese Gruppe ihren höchsten Wert gegen Kollagen Typ I und nicht gegen Typ II.

**Diagramm 29** Torten-Grafik zur Darstellung der Proben der linken Übergangszonen bei denen sowohl Kollagen Typ I als auch Typ II untersucht wurde.



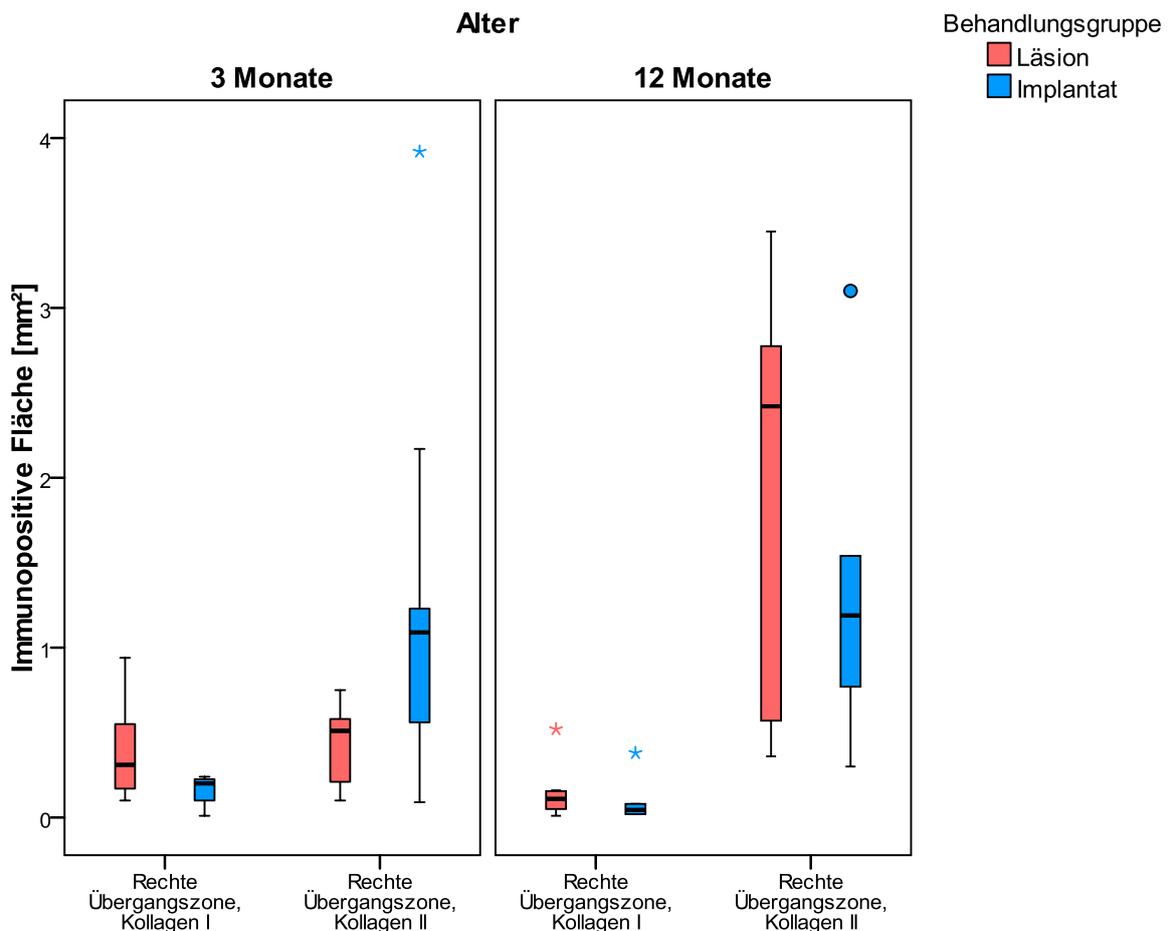
Für die Herstellung der Torten-Grafik wurden nur die Tiere herangezogen, bei denen sowohl Kollagen Typ I als auch Kollagen Typ II untersucht wurden. Grund für diese Maßnahme ist die Art der Darstellung, da hier in einer einzigen Grafik beide Antigene zusammen dargestellt werden und nicht die Streuung ihrer Werte unabhängig voneinander, wie bei den Boxplots.

In der Tortengrafik ist zu erkennen, dass bei allen Gruppen Kollagen Typ II die größere immunopositive Fläche zeigt. Wie schon bei der Beschreibung der Boxplots erwähnt wurde, ist eine entgegengesetzte Entwicklung der Immunpositivität gegen Kollagen Typ I und Typ

II bei den zwei Behandlungsgruppen zu erkennen. Die Läsion-Gruppe zeigt 3 Monate nach der Operation ein Verhältnis von Kollagen Typ II zu Typ I von nahezu 1:1. Nach 12 Monaten aber hat sich die gegen Kollagen Typ I immunopositive Fläche dieser Behandlungsgruppe bis auf ein Verhältnis von Kollagen Typ II zu Typ I von 3,5:1 verkleinert. 3 Monate nach der Operation zeigt die Implantat-Gruppe dagegen ein Verhältnis von Kollagen Typ II zu Typ I von etwa 14:1. Nach 12 Monaten allerdings, hat sich bei der gleichen Behandlungsgruppe ein Verhältnis von fast 1:1 eingestellt.

•Rechte Übergangszonen:

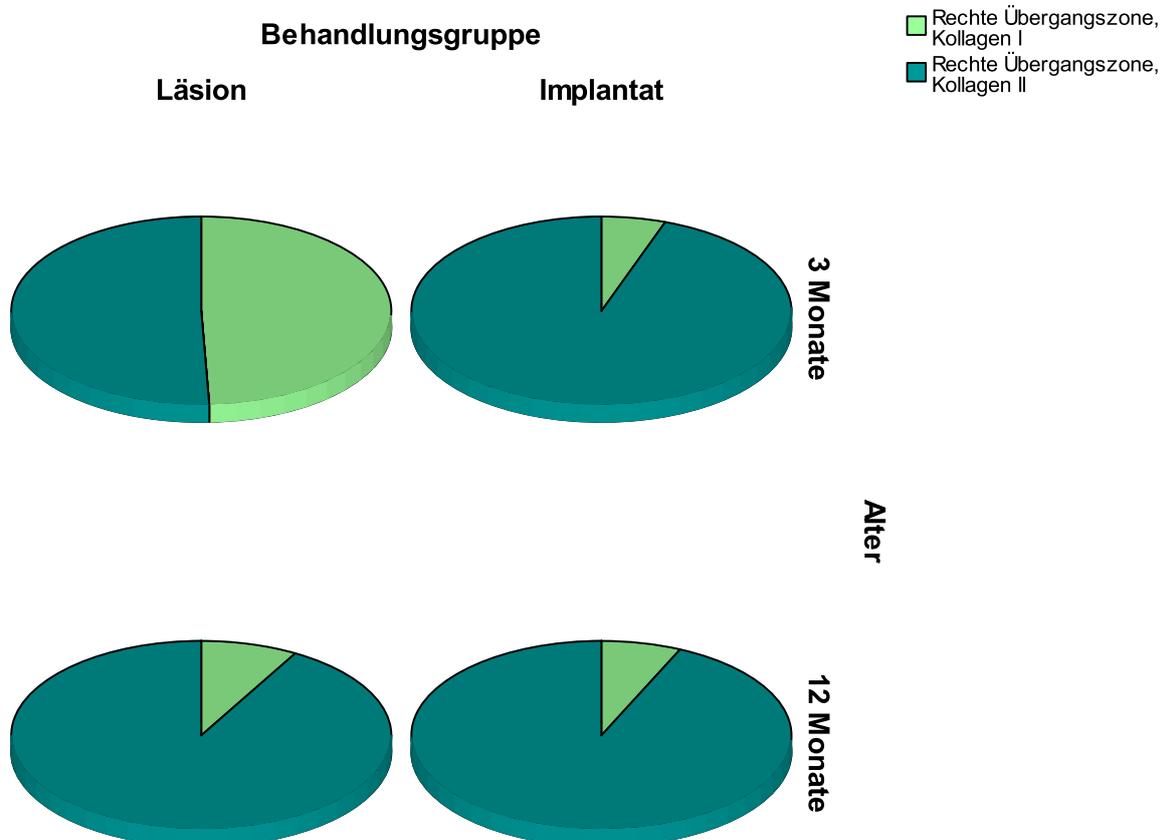
**Diagramm 30** Grafische Darstellung der Streuung der gegen Kollagen Typ I und Typ II immunopositiven Flächen der linken Übergangszonen aller vier Gruppen



Die 3-Monate-Läsion-Gruppe zeigt in ihren rechten Übergangszonen nahezu die gleichen Werte für Kollagen Typ I und Typ II. Beide haben ein Minimum von 0,10 mm<sup>2</sup>, aber ein Maximum für Kollagen Typ I von 0,94 mm<sup>2</sup> und für Kollagen Typ II von 0,75 mm<sup>2</sup>. Die 3-Monate-Implantat-Gruppe dagegen zeigt einen markanten Unterschied zwischen beiden Antigenen. Die gesamte Streuung der gegen Kollagen Typ I immunopositiven Flächen liegt zwischen 0,01 mm<sup>2</sup> und 0,24 mm<sup>2</sup> und ist um einen vielfachen Wert kleiner, als die Streuung der gegen Kollagen Typ II immunopositiven Flächen, die zwischen 0,09 mm<sup>2</sup> und 2,17 mm<sup>2</sup> liegt und zudem noch einen Extremwert bei 3,92 mm<sup>2</sup> besitzt. Nach 12 Monaten zeigt die Läsion-Gruppe eine deutliche Verminderung der immunopositiven Fläche gegen Kollagen Typ I und eine noch deutlichere Vergrößerung der gegen Kollagen Typ II immunopositiven Fläche. Diese Gruppe zeigt gegen Kollagen Typ I schon bei 0,52 mm<sup>2</sup> einen Extremwert, während Kollagen Typ II bei der gleichen Gruppe erst bei 0,36 mm<sup>2</sup> sein Minimum besitzt

und sein Maximum, welches außerdem keinen Ausreißer oder Extremwert darstellt, bei 3,45 mm<sup>2</sup> liegt. Die 12-Monate-Implantat-Gruppe zeigt für Kollagen Typ I niedrige Werte, die denen der 12-Monate-Läsion-Gruppe ähneln. Ein Minimum bei 0 mm<sup>2</sup> und der Median, der bei 0,04 mm<sup>2</sup> liegt, spiegeln die kleine Streuung der Werte dieser Gruppe gegen Kollagen Typ I wieder. Schon bei 0,38 mm<sup>2</sup> besitzt diese Gruppe einen Extremwert. Fast auf gleicher Höhe wie dieser Extremwert, liegt das Minimum der gegen Kollagen Typ II immunopositiven Fläche der gleichen Gruppe. Die Streuung der gegen Kollagen Typ II immunopositiven Fläche dieser Gruppe zeigt viel höhere Werte, als gegen Kollagen Typ I. Ihr Minimum liegt bei 0,3 mm<sup>2</sup> und ihr Median bei 1,11 mm<sup>2</sup>. Zusätzlich zeigt diese Gruppe einen Ausreißer bei 3,1 mm<sup>2</sup>, was dieser Streuung ein ähnliches Erscheinungsbild wie das der 12-Monate-Läsion-Gruppe verleiht.

**Diagramm 31** Torten-Grafik zur Darstellung der Proben bei denen sowohl Kollagen Typ I als auch Typ II untersucht wurde.



Die Tortengrafik der rechten Übergangszone zeigt bei der Läsion-Gruppe eine ähnliche Entwicklung wie bei der Linken. Anfänglich ist nach 3 Monaten ein nahezu 1:1 Konzentrationsverhältnis von Kollagen Typ I zu Typ II zu sehen. Nach 12 Monaten haben sich aber die immunopositiven Flächen so verändert, dass nun das Verhältnis von Kollagen Typ I zu Typ II bei etwa 1:10 liegt. Die Implantat-Gruppen zeigen dagegen in dieser Grafik keine markante Veränderung des Konzentrationsverhältnisses beider Kollagenarten. Sowohl nach 3, als auch nach 12 Monaten nach der Operation bleibt bei dieser Behandlungsgruppe ein Verhältnis von Kollagen Typ I zu Typ II von ungefähr 1:11. Es ist nur minimal ein größerer Anteil an Kollagen Typ I bei der 12-Monate-Implantat-Gruppe zu erkennen.

## 4.8 Zusammenfassung der Ergebnisse der Untersuchungen

**Tabelle 35a** Überblick der Ergebnisse aller Untersuchungen dieser Studie.  $\checkmark$ : die Implantat-Gruppe zeigt weniger Hinweise von Degeneration als die Läsion-Gruppe;  $\times$ : die Implantat-Gruppe zeigt mehr oder gleich hohe Hinweise einer Degeneration als die Läsion-Gruppe; n.b.: nicht beurteilbar.

Untersuchung		Gesamtfläche	Zonen	Zusätzliche Untersuchungen
Antigen				
<b><math>\alpha</math>-SMA</b>	3 Monate	n.b.	n.b.	
	12 Monate	$\checkmark$	$\checkmark$	
<b>Keratansulfat</b>	3 Monate	n.b.	$\times$	
	12 Monate	n.b.	$\times$	
<b>MMP 13</b>	3 Monate	$\times$	n.b.	Verteilungsquotient: n.b.
	12 Monate	$\checkmark$	$\checkmark$	$\checkmark$
<b>PGP 9.5</b>	3 Monate	$\times$	$\times$	
	12 Monate	$\checkmark$	$\checkmark$	
<b>Kollagen Typ I</b>	3 Monate	-	n.b.	
	12 Monate	-	$\checkmark$	
<b>Kollagen Typ II</b>	3 Monate	$\checkmark$	$\checkmark$	Endplatten: $\checkmark$
	12 Monate	$\times$	$\times$	$\times$

**Tabelle 36b** Ergebnisse der Untersuchung von Kollagen Typ I und Typ II in den Übergangszonen.

	Linke Übergangszone	Rechte Übergangszone
3 Monate	$\checkmark$	$\checkmark$
12 Monate	$\times$	$\checkmark$

Die Ergebnisse zeigen bei der Mehrheit der Untersuchungen, dass bei den Implantat-Gruppen die Indizien einer Bandscheibendegeneration weniger ausgeprägt sind, als bei den Läsion-Gruppen.

Die Immunlokalisierung von  $\alpha$ -SMA in den 3-Monate-Gruppen zeigte kein eindeutiges Ergebnis. Außer einem Extremwert, zeigt jedoch die 3-Monate-Läsion-Gruppe kleinere immunopositive Flächen als die gleichaltrige Implantat-Gruppe. Nach 12 Monaten kehrt sich diese Lage um und die Läsion-Gruppe zeigt eine fast zehnfach größere Fläche als nach 3 Monaten, während die Implantat-Gruppe in der gleichen Größenordnung bleibt wie nach 3 Monaten. Die Ergebnisse der verschiedenen Zonen zeigen bei den 3-Monate-Gruppen eine größere Streuung bei der Implantat-Gruppe. Diese Gruppe zeigt aber auch viele Nullwerte, vor allem in der rechten Anulus-Zone. Bei den 12-Monate-Gruppen besitzt die Läsion-Gruppe eindeutig bei allen Zonen die größeren immunopositiven Flächen. Die statistischen Tests zeigten jedoch bei der Untersuchung dieses Antigens keinen signifikanten Unterschied zwischen den RoIs.

Die Immunlokalisation von Keratansulfat zeigt nach 3 Monaten eine größere Streuung der immunopositiven Flächen der Läsion-Gruppe, allerdings nur wegen des Ausreißers S76. Eine Tendenz, größere immunopositive Flächen zu zeigen, als die Implantat-Gruppe, könnte aufgrund der Lage des Medianwertes abgeleitet werden (er liegt bei der Läsion-Gruppe höher als bei den Implantat-Gruppen). Nach 12 Monaten sind die Streuungen der immunopositiven Flächen beider Behandlungsgruppen höher. Hier zeigt die Implantat-Gruppe die größere Streuung und ein höheres Maximum, jedoch auch niedrigere Quartile und ein viel niedrigeres Minimum als die Läsion-Gruppe. Diese beiden Aspekte machen eine konkrete Aussage über einen höheren oder niedrigeren Degenerationsgrad nicht möglich. Bei den einzelnen Zonen zeigt sich der Nucleus pulposus als die Zone mit den größten immunopositiven Flächen. Die statistischen Tests zeigen bei diesem Antigen keinen signifikanten Unterschied zwischen den Behandlungsgruppen.

Die Immunlokalisierung von MMP 13 zeigt Unterschiede zwischen den Zeit- und Behandlungsgruppen. Die 3-Monate-Gruppen weisen eine um ein Vielfaches kleinere Streuung ihrer Werte als die 12-Monate-Gruppen auf. Bei den 3-Monate-Gruppen ist kein großer Unterschied zwischen den unteren Quartilen zu sehen. Jedoch liegen die obere Quartile, wie Median und Maximum, bei der Implantat-Gruppe wesentlich höher als bei der Läsion-Gruppe. Nur eine Probe (Extremwert) der Läsion-Gruppe liegt weit höher als alle anderen Werte der Implantat-Gruppe. Die 12-Monate-Gruppen zeigen untereinander eine ähnliche Streuung, wenn man die Quartile aus der Betrachtung ausschließt. Hier zeigt aber wieder die Läsion-Gruppe einen Extremwert, der weit höher als alle Werte der Implantat-Gruppe liegt. Die Ergebnisse der drei verschiedenen Zonen zeigen den linken Anulus als die Zone mit den größten immunopositiven Flächen. Sowohl nach 3 als auch nach 12 Monaten zeigen die Implantat-Gruppen größere Werte. Der Verteilungsquotient wurde ermittelt, als Versuch die Metalloproteinasenaktivität in den Bandscheiben objektiv zu beurteilen. Der Verteilungsquotient zeigt, dass bei den 3-Monate-Gruppen die Implantat-Gruppe die höheren Werte aufweist, mit der einzigen Ausnahme eines Extremwertes in der 3-Monate-Läsion-Gruppe. Bei den 12-Monate-Gruppen ist der Unterschied erheblich, die Implantat-Gruppe zeigt viel höhere Werte und einen Extremwert dazu. Bei der Liniengraphik auf Seite 51 werden die bisher besprochenen Ergebnisse wieder nachvollziehbar. Erkennbar sind die niedrigen V-förmigen Ergebnisse der 3-Monate-Gruppen und die höheren, weiter gestreuten Linien der 12-Monate-Gruppen, die in einem Fall bei der Läsion-Gruppe sogar einen deutlichen A-förmigen Verlauf nimmt, was wiederum mit dem niedrigen Verteilungsquotient der Gruppe vereinbar ist. Bei diesem Antigen werden erstmals signifikante Unterschiede

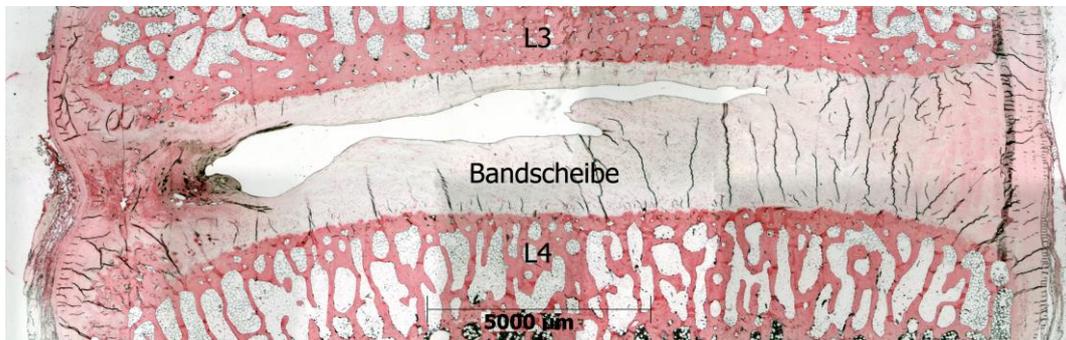
zwischen gleichaltrigen Behandlungsgruppen festgestellt. Bei vier RoIs der 12-Monate-Gruppen und zwar bei der oberen Nucleus und allen drei rechten Anulus-RoIs, wird ein Signifikanzniveau unter 5% festgestellt.

Die Immunlokalisierung von PGP 9.5 zeigt bei der Analyse der Gesamtflächen nach 3 Monaten wesentlich größere immunopositive Flächen bei der Implantat-Gruppe als bei der Läsion-Gruppe. Obwohl die Läsion-Gruppe gleich zwei Extremwerte besitzt, ist die Streuung der Implantat-Gruppe viel größer und reicht auch mit einem normalen Maximum viel höher in der Werteskala. Nach 12 Monaten sieht die Verteilung der Implantat-Gruppe ganz anders aus als nach 3 Monaten. Die Verteilung der Gruppe ist sehr kompakt geworden und zeigt Werte zwischen 0,05 und 0,16 mm<sup>2</sup>. Dabei sind in der Grafik die Minima, der Median und die Quartile optisch kaum voneinander zu trennen. Der höchste Wert dieser Gruppe ist ein Ausreißer bei 0,25 mm<sup>2</sup>. Die Läsion-Gruppe zeigt nach 12 Monaten eine durchaus ähnliche Streuung ihrer Werte wie nach 3 Monaten. Hier befindet sich ein Extremwert der etwa 3mal höher liegt, als der Ausreißer der Implantat-Gruppe. Die Statistik der einzelnen Zonen zeigt wieder gemäß den Erwartungen eine höhere Konzentration an PGP 9.5 in den Läsion-Zonen. Die Zonen-Grafik bestätigt die Ergebnisse der gesamten Bandscheiben. Sowohl die hohen Werte der 3-Monate-Implantat-Gruppe, als auch der Extremwert der 12-Monate-Läsion-Gruppe, sind gut zu erkennen. Die statistischen Tests ergaben keinen signifikanten Unterschied zwischen den RoIs bei diesem Antigen.

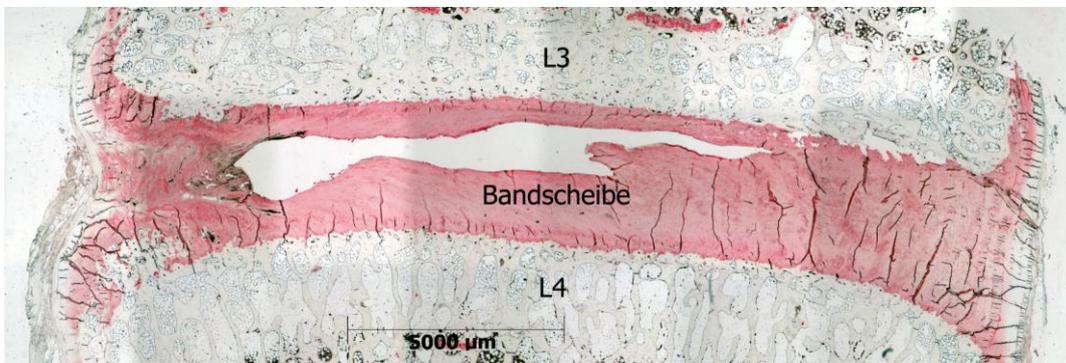
Da Kollagen vom Typ I ubiquitär im Säugetierorganismus vorkommt und sowohl eine Zunahme der Konzentration (Gewebe-reparatur) als eine Abnahme (Gewebe-verlust) vielseitig interpretiert werden kann, wird von einer direkten Aussage auf der Basis seiner Konzentration in der gesamten Bandscheibe abgesehen. Jedoch lässt die Tatsache, dass Kollagen Typ I in der Bandscheibe hauptsächlich in den Anulus-Zonen vorkommt und im Nucleus pulposus kaum zu finden sein sollte, eine gewisse Aussage über die Degeneration der Bandscheibe zu. Die Zonen-Werte und die Grafik zeigen, dass bei den 3-Monate-Gruppen die Läsion-Gruppe die höheren Werte besitzt, vor allem bei den Anulus-Zonen. Die Implantat-Gruppe zeigt eine kleinere Streuung, die außerdem etwas niedriger liegt als die der Läsion-Gruppe. Die 12-Monate-Gruppen zeigen größere Streuungen als die 3-Monate-Gruppen und eine höhere Konzentration von Kollagen Typ I in beiden Anulus-Zonen als im Nucleus bei den meisten Proben. Die 12-Monate-Implantat-Gruppe besitzt außerdem eine höhere Konzentration an Kollagen Typ I in der Läsion-Zone (linker Anulus fibrosus) als in den anderen beiden Zonen der gesamten Proben. Ein Signifikanzniveau unter 5% wird bei den 3-Monate-Gruppen im unteren linken Anulus und im oberen rechten Anulus durch die statistischen Tests festgestellt.

Die Immunlokalisierung von Kollagen Typ II zeigt nach 3 Monaten eine höhere Streuung der immunopositiven Flächen bei der Implantat-Gruppe. Nach 12 Monaten hat sich die Streuung der Implantat-Gruppe relativ wenig verändert, sie ist lediglich kompakter geworden. Die Streuung der Läsion-Gruppe ist aber nach 12 Monaten sowohl in der Höhe, als auch in der Länge gewachsen und ähnelt der Streuung der 3-Monate-Implantat-Gruppe stark. Die Zonen-Grafik (Diagramm 20, Seite 72) zeigt bei der großen Mehrheit der Individuen die erwartete A-förmige Verteilung der immunopositiven Fläche. Die Ergebnisse der Beurteilung der Gesamtflächen sind bei dieser Grafik gut nachvollziehbar. Die Verläufe der Linien bei der 3-Monate-Implantat-Gruppe fallen etwas konvexer aus, als die Linien der 3-Monate-Läsion-Gruppe, die etwas flacher ausfallen. Beide 12-Monate-Gruppen zeigen eine hohe Variabilität in der Ausprägung der Linienverläufe. Für Kollagen Typ II werden in einer Extra-Auswertung die immunopositiven Flächen der Endplatten beurteilt. Die Ergebnisse der Endplatten spiegeln die Ergebnisse der Gesamtflächen und Zonen weitgehend wieder. Wie bei allen anderen Antigenen werden bei Kollagen Typ II die statistischen Tests ebenfalls durchgeführt,

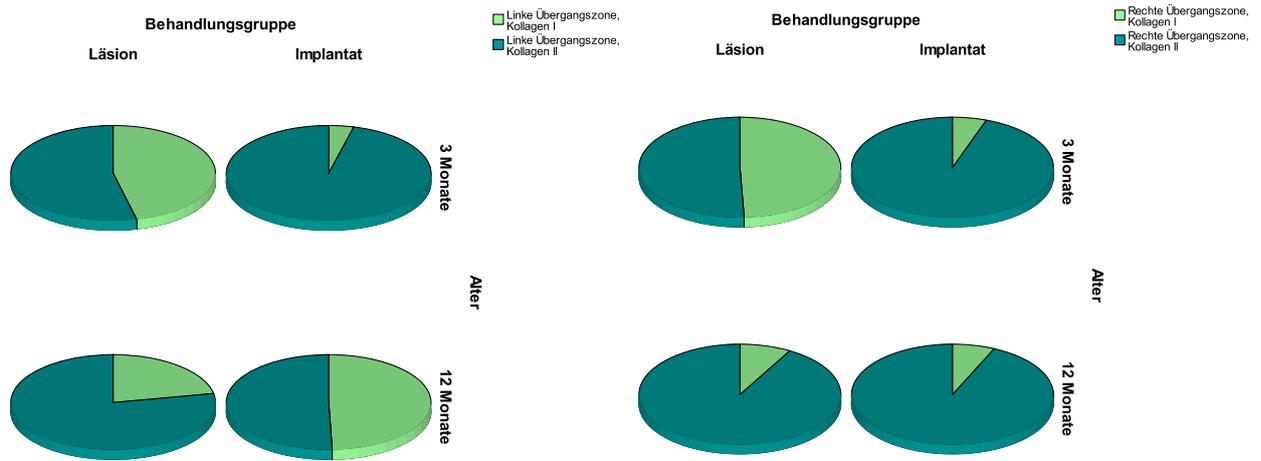
mit dem Ergebnis, dass zwischen den 3-Monate-Gruppen bei der gesamten oberen Endplatte, bei der Läsionszone und beim Nucleus pulposus ein signifikanter Unterschied besteht. Die 12-Monate-Gruppen zeigen dagegen keinen signifikanten Unterschied.



**Abbildung 25 und Abbildung 26** Zwei Proben aus der Bandscheibe des gleichen Tieres (S70) gefärbt mit Anti-Kollagen Typ I (oben) und Anti-Kollagen Typ II (unten)



Das Vorkommen von Kollagen Typ I und Typ II in den Übergangszonen (Abb. 25 und 26) wird anhand zweier verschiedener grafischer Darstellungen beurteilt: Eine klassische Boxplot-Darstellung und eine Torten-Grafik, für die nur diejenigen Tiere herangezogen werden, die für die Markierung beider Antigene gleichzeitig benutzt werden konnten. Das Diagramm 28 auf Seite 83 zeigt hervorragende Werte für die 3-Monate-Implantat-Gruppe, das heißt, der Kollagen Typ II-Anteil ist um ein Vielfaches größer, als der Kollagen Typ I-Anteil. Die Läsion-Gruppe zeigt höhere Werte an Kollagen Typ II, als an Kollagen Typ I. Trotzdem sind ihre Werte im Vergleich mit der Implantat-Gruppe an Kollagen Typ I höher und an Kollagen Typ II niedriger. Nach 12 Monaten ist das Bild genau umgekehrt. Hier zeigt die Läsion-Gruppe höhere Werte an Kollagen Typ II und dazu kleinere Werte an Kollagen Typ I als die Implantat-Gruppe. Das Tortendiagramm auf Seite 84 (siehe auch Abbildung 26) bestätigt diese Entwicklung der Gruppen und zeigt sie sogar noch stärker ausgeprägt. Die rechte Übergangszone zeigt im Diagramm 30 auf Seite 85 ebenfalls wesentlich größere Kollagen Typ II-immunopositive Flächen bei der Implantat-Gruppe nach 3 Monaten. Die Läsion-Gruppe zeigt dagegen höhere Kollagen Typ I-Werte, als Typ II Werte. Dieser Zustand ändert sich aber nach 12 Monaten erheblich. Nach 12 Monaten zeigt die Implantat-Gruppe zwar geringere Werte an Kollagen Typ I, dafür zeigt die Läsion-Gruppe höhere Werte an Kollagen Typ II. Es sind aber bei keinem der Antigene markante Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen festzustellen. Das Tortendiagramm auf Seite 86 (siehe auch Abbildung 27) zeigt diese Entwicklung auch sehr deutlich. Während nach 3 Monaten die Läsion-Gruppe ein fast 1:1 Verhältnis von Kollagen Typ I zu Typ II besitzt, ändert sich dieser Zustand nach 12 Monaten zu einem Verhältnis von etwa 1:10. Die Implantat-Gruppen zeigen sowohl nach 3, als auch nach 12 Monaten ein Verhältnis von etwa 1:11 zugunsten von Kollagen Typ II.



**Abbildung 27 (links) und 28 (rechts)** Verhältnis von Kollagen Typ I (Hellgrün) zu Kollagen Typ II (Türkisgrün) in den linken Übergangszonen (Abb. 28 vom Diagramm 29, Seite 84) und der rechten Übergangszone (Abb. 29 vom Diagramm 31, Seite 86).

## 5. Diskussion

Die vorliegende Studie war Teil eines Projektes, das als Ziel hatte, die Effektivität eines posterioren, dynamischen Stabilisationssystems an einem ovinen Degenerationsmodell zu überprüfen. Dieses experimentelle System der Firma SYNTHES<sup>®</sup> arbeitet nach dem gleichen Prinzip wie das schon etablierte Dynesys-System der Firma ZIMMER SPINE<sup>®</sup>, welches heutzutage in der Humanmedizin Verwendung findet. Die These der Studie, dass dieses experimentelle Implantat dazu beiträgt eine fortgeschrittene Bandscheibendegeneration aufzuhalten und ihr entgegenzuwirken, soll anhand von immunhistochemischen Färbemethoden und computergestützter, digitaler Bildanalyse in dieser Studie erprobt werden. Zusätzlich zu den immunhistochemischen Untersuchungen wurden im Rahmen dieses Projektes auch radiologische, biomechanische und histologische Untersuchungen an den Proben durch andere Doktoranden durchgeführt.

### 5.1 Ovines Tiermodell

Die Benutzung von Schafen als Tiermodell für Wirbelsäulenstudien verfügt über verschiedene Vorteile gegenüber anderen Tiermodellen, wie z.B. Hunden, Kälbern oder Schweinen (Alini und Mitarbeiter 2008; Singh und Mitarbeiter 2005). Hunde werden aufgrund fehlender mechanischer Ähnlichkeit (Gewicht) und ethischer Bedenken nicht als geeignetes Tiermodell für Bandscheibenstudien angesehen (Eitel und Mitarbeiter 1981). Aus dem gleichen Grund und wegen erhöhten Haltungskosten verzichtet man auf die Verwendung von Primaten. Die Wirbelsäule von Kälbern frakturiert wegen mangelnder Verknöcherung schneller, als die des Menschen und ausgewachsene Schweine besitzen neben einem, im Vergleich zum Menschen, viel höheren Gewicht, einen anderen Heilungsprozess (Alini und Mitarbeiter 2008; Rapoff und Mitarbeiter 2003).

Das Gewicht der Tiere, die Anatomie ihrer Wirbelsäule und die ähnlichen biochemischen Gegebenheiten machen Schafe zum geeigneten Tiermodell für Bandscheibenstudien (Kandziora und Mitarbeiter 2001; Wilke 1996; Adams 1995). Zusätzlich sind die Operationstechniken in gleicher Weise wie beim Menschen an Schafen durchführbar, da ihre Wirbelsäule Dimensionen aufweist, die die Benutzung des gleichen Instrumentariums und der gleichen Implantate ermöglicht, wie sie bei Menschen auch Verwendung finden (Guder und Mitarbeiter 2009; Kandziora und Mitarbeiter 2001). Ein weiterer Vorteil der Benutzung von Schafen ist die Möglichkeit der Zusammenstellung von homogenen Versuchsgruppen gleichen Alters, gleicher Größe und gleichen Gewichts, was eine standardisierte Versuchsgrundlage ermöglicht (Brill 1992).

Auf der Grundlage der Literatur und früherer Erfahrungen der Arbeitsgruppe mit Schafen als Bandscheibendegenerationsmodell kann, auch unter Berücksichtigung des Tierschutzes, das Schaf als ein geeignetes Bandscheibendegenerationsmodell für die in vivo Evaluation eines posterioren, dynamischen Stabilisationssystems gelten (Guder und Mitarbeiter 2009; Koch 2005; Kandziora und Mitarbeiter 2001).

## 5.2 Anzahl der Tiere, chirurgische Eingriffe und Beobachtungszeiträume

Die Gruppengröße von zehn Tieren pro Gruppe wurde gewählt, um ausreichende Informationen über den Degenerationsablauf der Wirbelsäulen mit und ohne dynamische Stabilisation (SoFi-System von SYNTHES®) zu bekommen. Ein Kompromiss zwischen Auswertbarkeit der Ergebnisse sowie Kosten von Instrumentarien und Haltung als auch ethischer Bedenken bezüglich Tierschutzes, wurde bei dieser Gruppenzahl angestrebt. Wegen der geringen Zahl ist es schwierig, Rückschlüsse auf die gesamte Spezies zu ziehen. Stattdessen wurde versucht, zwischen den vier möglichst homogenen Gruppen einen Vergleich anzustellen und Ergebnisse zu beschreiben.

Bei den Operationsverfahren handelt es sich um etablierte Methoden zur Induktion eines Degenerationsmodells durch partielle Nukleotomie einerseits (Guder und Mitarbeiter 2009) und zum Einbringen eines posterioren, dynamischen Stabilisationsimplantats auf der Basis von Pedikelschrauben andererseits (Jahng und Mitarbeiter 2004). Alle Eingriffe wurden durch einen erfahrenen Wirbelsäulenspezialisten durchgeführt und die Instrumente und Methoden waren dieselben, wie sie auch in der humanen Wirbelsäulenchirurgie Verwendung finden.

Durch die partielle Nukleotomie wurde ein Bandscheibenprolaps simuliert, der laut Literatur als etabliertes Bandscheibendegenerationsmodell dient (Guder und Mitarbeiter 2009; Melrose und Mitarbeiter 2002). Der Zeitraum von 3 Monaten wurde gewählt, um erste Anzeichen der Degeneration vorfinden zu können (Hoogendoorn und Mitarbeiter 2008; Singh und Mitarbeiter 2005). Zudem wird bei histologischen Studien der Zeitraum von 3 Monaten als ausreichend angesehen, um Anzeichen einer Degeneration feststellen zu können (Koch 2005). Der zweite Zeitraum von 12 Monaten wurde gewählt, um die Degeneration als Prozess betrachten zu können und die Reaktion des Gewebes auf das Implantat über einen längeren Zeitraum ebenfalls zu erfassen (Guder und Mitarbeiter 2009; Melrose und Mitarbeiter 2002).

## 5.3 Gewinnung, Aufarbeitung und Färbung der Proben

Die Proben wurden in der frontalen Ebene geschnitten, um somit gewährleisten zu können, dass in jedem Schnitt alle Zonen möglichst gleichermaßen zu finden sind. Alle Vorbehandlungen folgten etablierten Standards, wie man sie auch bei anderen Studien mit ovinen Degenerationsmodellen findet (Guder und Mitarbeiter 2009; Koch 2005).

Die Antigene wurden passend zu den zu untersuchenden Degenerationsparametern ausgewählt (Melrose und Mitarbeiter 2002, Roughley 2004, Lyons und Mitarbeiter 1981, Brown und Mitarbeiter 1997, Urban und Roberts 2003). Mit Hilfe der Literatur wurden die am besten geeigneten Antikörper gewählt.

### 5.3.1 EDTA und Immunhistochemie

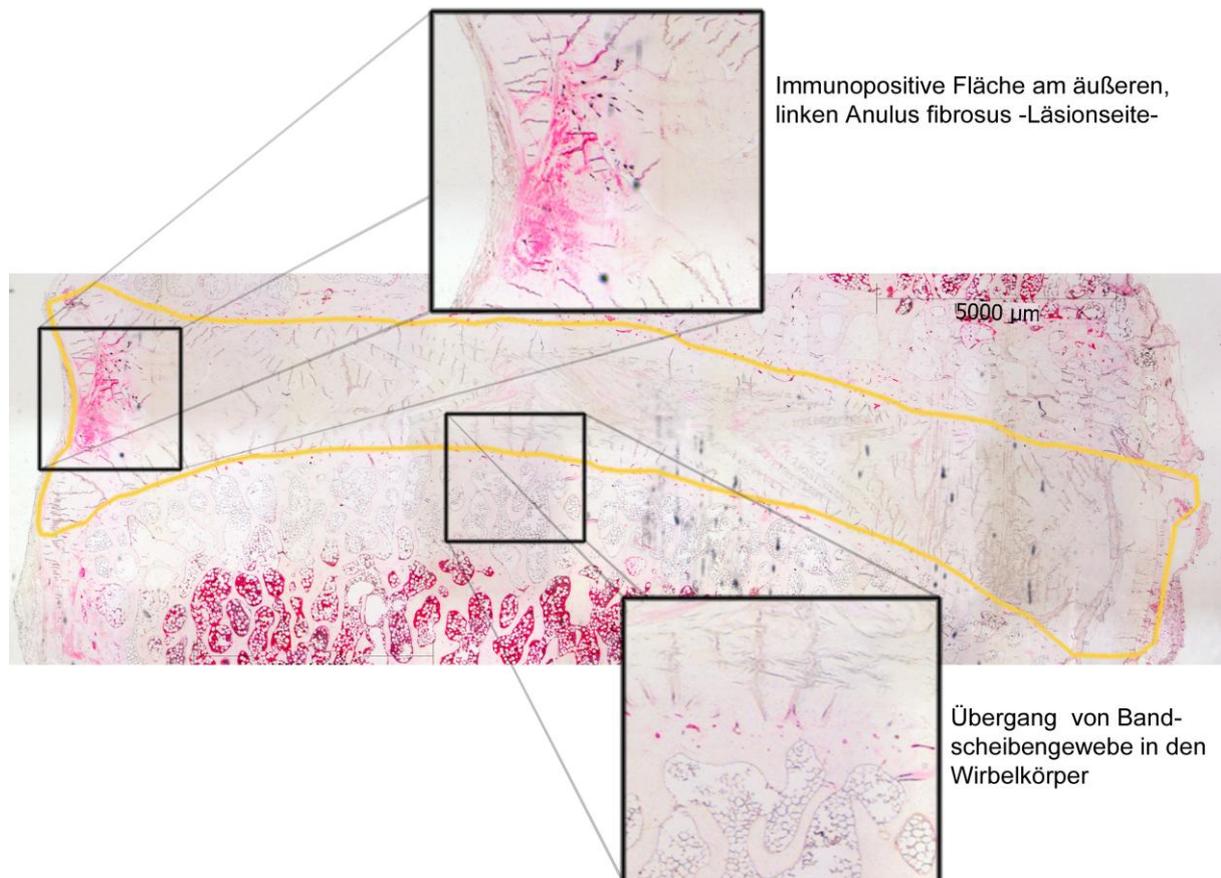
Die Dekalzifizierung oder Entkalkung des Knochengewebes ist ein unverzichtbarer Schritt um die Proben als Paraffinschnitte zu schneiden und immunhistochemisch zu untersuchen. Die Einbettung der Proben in Paraffin hat gegenüber Gefrierschnitten den Vorteil, dass die Strukturen besser zu erkennen sind und Riss-Artefakte vermieden werden (Meier-Ruge und Bruder 2008). Für eine gute immunhistochemische Analyse sind sehr dünne Schnitte notwendig (2µm - 4µm). Dadurch sind die Strukturen besser erkennbar und deutlicher voneinander abzugrenzen (Curran und Gregory 1980). Die Einbettung in Paraffin erlaubt es, solch dünne Schnitte zu gewinnen. Damit die Paraffinblöcke mit dem Mikrotom in 2µm bis

4µm dünne Schnitte geschnitten werden können, müssen die Proben mit EDTA entkalkt werden.

2011 führten dos Santos und Mitarbeiter einen Vergleich mit drei verschiedenen Entkalkungsmitteln durch. 5% Salpetersäure in 4% Formalin, 4.13% EDTA und 5% Trichloressigsäure waren diese drei Entkalkungsmittel, welche miteinander und mit den Kontrollproben ohne Entkalkungsmittel verglichen wurden. EDTA erwies sich als die beste Alternative, mit einer exzellenten Bewahrung der Gewebemorphologie und keinen bemerkbaren Beeinträchtigungen der Reaktivität des Gewebes.

#### 5.4 Digitale Pixelanalyse

Die Methode der Pixelanalyse stellt eine schnelle und effiziente Alternative zu der traditionellen, „manuellen“ Zählungs-Methode dar (Loughlin und Mitarbeiter 2007; Inman und Mitarbeiter 2005; Matkowskyj und Mitarbeiter 2000; Demirkaya und Mitarbeiter 1999). Die Pixelanalyse bietet zudem Vorteile bezüglich der kurzen Dauer der Analyse, der Objektivität und der Reproduzierbarkeit und der Integration neuartiger Untersuchungskriterien, wie der Farbintensität-Antigen-Korrelation (Watanabe und Mitarbeiter 1996). Die Abbildung 29 veranschaulicht die wichtigsten Schritte der digitalen Bildanalyse: die Abgrenzung des zu untersuchenden Gewebes und die Festlegung der immunopositiven Flächen.



**Abbildung 29** Wichtige Anteile der digitalen Analyse: die Demarkation der Bandscheibenfläche (gelbe Linie), die immunopositiven Flächen und die Unterscheidung zwischen Bandscheibengewebe und Wirbelknochen

## 5.5 Probengewinnung und Analysemethoden

Die in der vorliegenden Studie benutzten Analysemethoden boten Vor- und Nachteile zur objektiven Beurteilung des Degenerationsgrades in der Bandscheibe (Choudhury und Mitarbeiter 2010; Demirkaya und Mitarbeiter 1999; Watanabe und Mitarbeiter 1996; Manek und Mitarbeiter 1993). Immunhistochemie ist eine sehr sensitive Methode zum Nachweis von Makromolekülen und Botenstoffen, die sich in Studien über die Degeneration der Bandscheibe schon etabliert hat. Für diese Studie wurde das Wissen zu verschiedenen Aspekten der Bandscheibendegeneration und den damit verbundenen Makromolekülen aus der Literatur entnommen. Eine praktische, computergesteuerte und zugleich optische Analysemethode, stellt die Pixelanalyse dar. Durch die Verbindung von Immunhistochemie und Pixelanalyse wurde in der vorliegenden Studie eine objektive, effiziente und reproduzierbare Methode zur Erfassung der Bandscheibendegeneration verwendet, wie von Inman und Mitarbeitern 2005 und Matkowskyj und Mitarbeitern 2000 beschrieben. Zudem bietet die verwendete Software KS 400 Version 3.0 (Carl Zeiss Vision GmbH, Eching, Deutschland) eine flexible Programmierbarkeit um das Auswertungssystem an die Proben, sowie an die Art der Untersuchung und an die verschiedenen Parameter gezielt anpassen zu können.

Die gewonnenen Daten der verschiedenen Gruppen wurden miteinander verglichen, um feststellen zu können, bei welchen Gruppen die immunopositiven Flächen größer waren. Um die Beurteilung der Messungen möglichst objektiv durchführen zu können, wurden die ganzen Gruppen in die Beurteilungen miteinbezogen. In anderen Worten, es wurden die Boxplots oder die Streuung der Gruppen miteinander verglichen. Die Messwerte im Falle von Ausreißer, oder Minimum- beziehungsweise Maximum-Werten, wurden erwähnt, um die Lage oder Spannbreite der gesamten Gruppe besser beschreiben zu können. Zusätzlich wurden auf diese Weise Ausreißer und Extremwerte in die Beurteilung und Beschreibung miteinbezogen, aber ohne dass sie große Auswirkung auf die gesamte Gruppe haben konnten. Nachteil dieser Methode ist ihr rein deskriptiver Charakter (Bol 2004). Die Ergebnisse der vorliegenden Studie können demzufolge nicht auf andere Gruppen oder Tierpopulationen übertragen werden, wie es bei der induktiven Statistik der Fall ist. Ein Versuch, diesen Nachteil abzuschwächen, wurde durch die statistischen Tests vorgenommen. Dadurch wurde die Informationsqualität getestet (Bortz 2005; Siegel 1985). Das Signifikanzniveau des Unterschiedes zwischen zwei gleichaltrigen Gruppen wurde ermittelt und wenn es unter 5% lag ( $p\text{-Wert} \leq 0,05$ ), als Bestätigung zu der gegebenen Beurteilung herangezogen.

Die unterschiedliche Anzahl der Tiere pro Gruppe ist ebenfalls ein Nachteil der vorliegenden Studie. Dadurch wird die Vergleichbarkeit zwischen den Gruppen begrenzt. Der Hauptgrund für den Probenverlust war technisches und/oder menschliches Versagen während der Vorbereitung und Verarbeitung der Proben. Die ersten Probenverluste geschahen bereits während des postoperativen Zeitraums und bei den Untersuchungen am MRT. Fünf Tiere gingen als Folge von Narkosezwischenfällen verloren. Einige Proben waren selbst nach mehrwöchiger Entkalkung in EDTA nicht am Mikrotom zu schneiden. Ein Grund dafür liegt wahrscheinlich in den Kalzifizierungen (osteophytisches Wachstum), welche vor allem bei den 12-Monate-Gruppen zu sehen waren. Diese Kalzifizierungen geschahen möglicherweise als Reaktion des Körpers gegen die Läsion und gegen das eingesetzte Implantat. Die gewonnenen Proben wurden zuerst mit Anti- $\alpha$ -SMA, dann mit Anti-Keratansulfat, Anti-MMP 13, Anti-PGP 9.5, Anti-Kollagen Typ I und Anti-Kollagen Typ II (in dieser Reihenfolge) gefärbt. Durch die oben genannten Verluste standen für den Vergleich der beiden Kollagentypen nicht alle Proben zur Verfügung. Das Fehlen an gesunden Kontrolltieren ist ein weiterer Kritikpunkt dieser Studie. Um das Töten von weiteren Tieren zu vermeiden,

wurde lediglich auf die Ergebnisse der Literatur zurückgegriffen um Leitwerte für die Degeneration heranzuziehen (Melrose und Mitarbeiter 2002; Roughley 2004; Lyons und Mitarbeiter 1981; Urban und Roberts 2003; Brown und Mitarbeiter 1997; Roberts und Mitarbeiter 1991). In der vorliegenden Studie wurde also, nachdem die Tiere einer partiellen Nukleotomie unterzogen worden waren, davon ausgegangen, dass bei allen Tieren Anzeichen einer fortgeschrittenen Degeneration zu finden war. Die Behandlungsgruppen wurden deshalb miteinander verglichen, um feststellen zu können, bei welcher von beiden diese Anzeichen höher waren. Die Ergebnisse konnten die These der Studie bestätigen, wenn die Degenerationsanzeichen bei der Läsion-Gruppe höher waren, andernfalls widerlegen wenn die Anzeichen bei der Implantat-Gruppe höher oder gleich hoch waren, oder nicht beurteilbar sein, wenn sowohl Anzeichen eines höheren, als auch eines niedrigeren Degenerationsgrades in derselben Behandlungsgruppe zu finden waren.

## 5.6 Posteriores, dynamisches Stabilisationssystem

Als therapeutische Alternative zur Fusion wurde die posteriore, dynamische Stabilisation entwickelt (Schwarzenbach und Mitarbeiter 2005). Prototyp dieser Systeme ist das Dynesys-Implantat von ZIMMER SPINE<sup>®</sup>, welches bereits in verschiedenen Studien auf seine Effektivität getestet wurde. Diese Studien verzeichneten sowohl positive Ergebnisse wie Verbesserungen des Patientenzustandes, als auch negative Ergebnisse meistens aufgrund von Schraubenlockerungen die operativ nachversorgt werden mussten (Vaga und Mitarbeiter 2009; Ricart und Serwier 2008; Bothman und Mitarbeiter 2008; Putzier und Mitarbeiter 2004). Auf der gleichen Basis wurde das experimentelle System von der Firma SYNTHES<sup>®</sup> (Solothurn, Schweiz) entwickelt.

Diese Studie testet mittels Immunhistochemie die Effektivität des dynamischen Systems an einem ovinen Bandscheibendegenerationsmodell. Dafür wurde in der Literatur nach nachweisbaren Veränderungen in der Bandscheibe recherchiert, die durch die Degeneration hervorgerufen werden und vierzig Schafe mit und ohne Implantat nach 3 und 12 Monaten immunhistochemisch auf diese Anzeichen der Degeneration untersucht.

## 5.7 $\alpha$ -SMA

In verschiedenen Studien wurde die Präsenz von  $\alpha$ -SMA in der Bandscheibe belegt (Hastreiter und Mitarbeiter 2004; Schneider und Mitarbeiter 1999). Da  $\alpha$ -SMA zuerst wegen seiner Präsenz in den Smooth Muscle Cells von Gefäßen zum Nachweis von Angiogenese benutzt wurde, wurde auch für diese Studie  $\alpha$ -SMA als möglicher Indikator für Angiogenese in Betracht gezogen, wie in der Studie von Lienau und Mitarbeitern 2005. In letzter Zeit wurde aber bewiesen, dass  $\alpha$ -SMA in der Bandscheibe auch ohne Bezug zu Blutgefäßen vorkommt. Es wurde aber dennoch ebenfalls belegt, dass das Vorkommen von  $\alpha$ -SMA in degenerierten Bandscheiben höher ist, als in gesunden und dieses Vorkommen sich proportional zum Degenerationsgrad erhöht (Hastreiter und Mitarbeiter 2004; Melrose und Mitarbeiter 2002; Schneider und Mitarbeiter 1999). Aus diesem Grund wurde  $\alpha$ -SMA als Indikator für den Degenerationsgrad der Bandscheibe, jedoch nicht als Indikator der Angiogenese verwendet. Vielmehr kann das Vorkommen von  $\alpha$ -SMA auf die Bereitschaft des Gewebes zur Angiogenese hindeuten (Hastreiter und Mitarbeiter 2004; Schneider und Mitarbeiter 1999).

In der Studie von Hastreiter und Mitarbeiter aus dem Jahr 2004 wurde belegt, dass es bei den degenerierten Bandscheiben zu einem signifikanten Anstieg der Immunreaktivität gegen  $\alpha$ -SMA im Vergleich zu den Kontrollproben kam (Hastreiter und Mitarbeiter 2004). Die eben erwähnte Studie, wie die Mehrheit der vergleichbaren Analysen, befasste sich in erster Linie mit der Zelldichte im Nucleus pulposus und Anulus fibrosus und der Quantifizierung der Zellen die gegen  $\alpha$ -SMA immunopositiv reagierten. Diese Art der Untersuchung setzt eine histologische sowie eine immunhistochemische Untersuchung des Gewebes voraus. Im Gegensatz dazu konzentrierte sich die vorliegende Studie auf die immunhistochemische Untersuchung von  $\alpha$ -SMA ohne Färbung oder Berücksichtigung der Zellen. Eine Studie von James Melrose aus dem Jahr 2002, zeigte die Entwicklung der Vaskularisation von ovinen Bandscheiben nach zugefügter Inzision, anhand des immunhistochemischen Nachweises von  $\alpha$ -SMA. Diese Studie zeigte bei den Läsiongruppen eine Zunahme der Vaskularisation nach 3, 6 und 12 Monaten. Nach 26 Monaten wurde eine Abnahme der Vaskularisation festgestellt. Die Erfassung der Daten wurde aber in dieser Studie anhand der Prozentzahl der immunopositiven Zellen durchgeführt und nicht anhand von immunopositiven Flächen. Die Mehrheit der Zellen, die auf  $\alpha$ -SMA immunopositiv reagierten, wurde im Zusammenhang mit Blutgefäßen in unmittelbarer Nähe der Läsion nachgewiesen. Dieses Ergebnis wurde als Hinweis interpretiert, dass die Neoangiogenese aktiv an der Reparatur des Bandscheibengewebes beteiligt ist. In der vorliegenden Studie wurden, ähnlich wie bei der Studie von Melrose, die größeren immunopositiven Flächen in der Läsionszone nachgewiesen. Als weitere Übereinstimmung stellt sich die Tatsache dar, dass die 12-Monate-Gruppen die größeren immunopositiven Flächen aufwiesen. Es bleibt deshalb die Frage offen, bei welcher der Behandlungsgruppen der vorliegenden Studie die Neoangiogenese nach 26 Monaten am stärksten zurückgegangen wäre. Auf diese Weise könnte geklärt werden, bei welcher Gruppe die Reparation des Gewebes am effektivsten war und ob die höhere Angiogenese nach 12 Monaten lediglich ein Hinweis auf eine höhere Degeneration darstellt, oder ob es auch als ein Hinweis auf intensivere Reparationsprozesse wahrgenommen werden kann.

Die statistischen Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigen weitgehende Übereinstimmungen mit der Aussage der Literatur die besagt, dass die höchste Expression von  $\alpha$ -SMA 12 Monate nach einer Bandscheibenläsion zustande kommt (Melrose und Mitarbeiter 2002). Von den 3-Monate-Gruppen zeigt die Läsion-Gruppe den höchsten Einzelwert, was zugunsten der These der vorliegenden Studie sprechen würde. Jedoch handelt es sich dabei um einen Extremwert. Die Streuung der Läsion-Gruppe besitzt eine sehr geringe Spannbreite und fängt zwar geringfügig höher als das Minimum der Implantat-Gruppe an, hört aber ohne Berücksichtigung des Extremwertes unter der Streuung der Implantat-Gruppe auf. Die große Spannbreite der Streuung der Implantat-Gruppe erschwert eine konkrete Aussage über den Degenerationsgrad der Proben dieser Gruppe im Vergleich zu der Läsion-Gruppe. Die 12-Monate-Gruppen unterscheiden sich dagegen erheblich. Die Streuung der Läsion-Gruppe ist um ein Vielfaches größer als die der Implantat-Gruppe. Aufgrund dieses Ergebnisses kann man feststellen, dass es bei den Läsion-Tieren zu einer höheren  $\alpha$ -SMA Ausschüttung nach 12 Monaten kam und dadurch die Bereitschaft zur Angiogenese höher war, als bei der Implantat-Gruppe. Dieser Befund unterstützt die These der Studie. Bei der Betrachtung der einzelnen Zonen wird die Nucleus-Zone besonders beachtet. Die 3-Monate-Gruppen zeigen in dieser Zone nur Nullwerte. Die 12-Monate-Gruppen zeigen immunopositive Flächen und diese sind bei der Läsion-Gruppe größer. Die Tatsache, dass im Nucleus pulposus eine höhere Bereitschaft zur Angiogenese bei der Läsion-Gruppe festgestellt wurde, spricht ebenfalls für die These der Studie. Die Liniengrafik (siehe Diagramm 2) unterstützt diese Feststellungen. Die „V“-Form der meisten Linien zeigt, dass die Anulus-Zonen eine höhere Bereitschaft zur Vaskularisation besitzen, als der Nucleus pulposus (Melrose und Mitarbeiter 2002).

Die statistischen Tests konnten allerdings keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen feststellen. Die Ergebnisse bleiben deshalb auf einer rein deskriptiven Ebene.

## 5.8 Keratansulfat

Keratansulfat ist, zusammen mit Chondroitinsulfat, Teil des wichtigsten osmotisch-aktiven Moleküls der Bandscheibenmatrix Aggrecan (Roughley 2004). In der akuten Phase der Bandscheibendegeneration wird weniger osmotisch-aktives Aggrecan nachweisbar, dafür mehr Keratansulfat. Nicht nur in der Matrix der Bandscheibe ist dieser Anstieg der Keratansulfat-Konzentration nachweisbar, sondern auch im Blutserum (Kuiper und Mitarbeiter 1998). Diese momentane Erhöhung der Keratansulfat-Konzentration ist auf die erhöhte Zersetzung von Aggrecan in seinen Bestandteilen zurückzuführen. Bei chronisch degenerierten Bandscheiben wird allerdings in der Literatur von einer Verminderung der Proteoglykan-Konzentration berichtet (Akhtar und Mitarbeiter 2005). Dieser Rückgang der Proteoglykan-Konzentration in der Bandscheibe, ist auf die anhaltende Enzymaktivität und die Unfähigkeit der Bandscheibenmatrix die Balance zwischen Degradation und Produktion von Proteoglykanen aufrecht zu erhalten, zurückzuführen. Für die vorliegende Studie wurde deshalb die Expression von Keratansulfat als Degenerationsindikator in der Bandscheibe untersucht.

Die Werte der 3-Monate-Gruppen zeigen untereinander eine ähnliche Streuung. Der höchste Wert liegt in der Läsion-Gruppe, jedoch handelt es sich dabei um einen Ausreißer der relativ knapp über dem Maximum-Wert der Implantat-Gruppe liegt. Aus diesem Grund kann auf der Basis dieser Messung keine Aussage über die Wirkung des Implantates gemacht werden. Die Werte der 12-Monate-Gruppen liegen sichtlich höher als die Werte der 3-Monate-Gruppen. Laut Literatur ist dies ein Anzeichen dafür, dass die Degeneration bei den 12-Monate-Gruppen dabei ist zurückzugehen (Hadjipavlou und Mitarbeiter 2008; Akhtar und Mitarbeiter 2005; Roughley und Mitarbeiter 2004). Die Beurteilung der Werte der 12-Monate-Gruppen erweist sich dennoch ebenfalls als schwierig. Die Streuungen beider Behandlungsgruppen liegen in etwa der gleichen Höhe. Somit kann auch in diesem Fall keine klare Aussage gemacht werden.

Laut Literatur ist im Nucleus pulposus die größte Menge an Keratansulfat zu erwarten (Hadjipavlou und Mitarbeiter 2008; Roughley und Mitarbeiter 2004; Urban 2002; Kuiper und Mitarbeiter 1998; Scott und Mitarbeiter 1989), diese Darlegung kann in der vorliegenden Studie am besten anhand der Liniengrafik (siehe Diag. 4) bestätigt werden. Bei der 3-Monate-Läsion-Gruppe weisen die meisten Linien einen „A“-förmigen Verlauf auf. Bei allen anderen Gruppen ist dieses Verhalten nicht erkennbar. Dieser Befund spricht dafür, dass aus der Sicht der Keratansulfat-Analyse, die 3-Monate-Läsion-Gruppe weniger Anzeichen einer Degeneration als die Läsion-Gruppe zeigt (Akhtar und Mitarbeiter 2005).

Die statistischen Tests ergaben keinen signifikanten Unterschied zwischen den gleichaltrigen Behandlungsgruppen. Es ist also nicht möglich anhand der vorliegenden Keratansulfat-Untersuchung eine Aussage über den Einfluss des Implantates auf die Wasserbindungsqualität der Bandscheiben zu machen.

## 5.9 MMP 13

Bei MMP 13 handelt es sich um ein Enzym, das zur Degradation von Matrix-Elementen ausgeschüttet wird. Dieses Enzym reagiert sehr sensibel mit einer drastischen Erhöhung seiner Konzentration auf degenerative Prozesse in der Matrix (Le Maitre und Mitarbeiter 2004).

Die Expression von MMP 13 in der Bandscheibe wurde bereits mittels PCR-Analyse und mittels Immunhistochemie untersucht. Die PCR-Analyse untersuchte Veränderungen der Genexpression von MMP 13 in der Bandscheibenmatrix von Neuseeland-Kaninchen mit mechanisch induzierter Bandscheibendegeneration durch Kompression (Omlor und Mitarbeiter 2006; Guehring und Mitarbeiter 2005). Diese Studien zeigten bei den Kontrollgruppen keine nachweisbare Genexpression für MMP 13. Die Degeneration-Gruppen zeigten dagegen die erwartete Hochregulierung der Genexpression für MMP 13, welche zudem bei den ältesten Versuchsgruppen (60 Tage) am höchsten war. Interessant ist die Tatsache, dass eine weitere Studie der gleichen Arbeitsgruppe mittels der gleichen Untersuchungsmethoden eine Herunterregulierung der Genexpression von MMP 13 nachweisen konnte, indem nach 28 Tagen Kompression eine Distraction induziert wurde (Guehring und Mitarbeiter 2006). Diese Tatsache dient als Beweis der innigen Verbindung zwischen Bandscheibendegeneration und MMP 13-Ausschüttung. Den direkten immunhistochemischen Nachweis von MMP 13 in der Bandscheibe zur Degenerationsgradbeurteilung verwendeten 2007 Chubinskaya und Mitarbeiter in einer Studie an Sandratten. Jedoch wurden in dieser Studie die Schwanzwirbel der Ratten als Untersuchungsobjekt verwendet. Ein weiterer Unterschied zu der vorliegenden Studie bestand in der Auswertung der Proben. Die Bewertung basierte auf dem Vorhandensein, der Abwesenheit und der Quantität von MMP 13 in der Mehrheit der Zellen einer Probe. Die Ergebnisse zeigten keine Immunopositivität für MMP 13 im Nucleus pulposus, während im Anulus fibrosus MMP 13 vorhanden war. Zudem wurde die niedrigste Immunopositivität bei der Kontrollgruppe festgestellt, während sie bei der nur-Läsion-Gruppe am höchsten war. Diese Ergebnisse korrelieren mit denen der vorliegenden Studie insofern, als dass auch hier die Nucleus-Zone, die kleinsten immunopositiven Flächen zeigt. Weiterhin waren auch in der vorliegenden Studie die ältesten Gruppen die mit der höchsten Immunopositivität für MMP 13.

Die Immunlokalisierung von MMP 13 zeigte nach drei Monaten unerwarteter Weise höhere Werte bei der Implantat-Gruppe. Obwohl die Läsion-Gruppe einen höheren Extremwert als das Maximum der Implantatgruppe zeigte, ist ihre Streuung ohne diesen einen Wert sehr klein und kompakt. Außerdem lagen alle ihre statistischen Werte (Minimum, Maximum und Quartile) unter denen der Implantat-Gruppe. Daran kann man erkennen, dass nach drei Monaten die Implantat-Gruppe eine höhere Konzentration an MMP 13 zeigte und somit die These der Studie widerlegt. Nach zwölf Monaten waren, wie erwartet, höhere Konzentrationen an MMP 13 festzustellen, was auf das Fortschreiten der Degeneration zurückzuführen ist (Hadjipavlou und Mitarbeiter 2008; Le Maitre und Mitarbeiter 2004; Lyons und Mitarbeiter 1981). Die 12-Monate-Läsion-Gruppe zeigte eine etwas kleinere Streuung, die aber etwas höher lag als die der Implantat-Gruppe. Nur der Maximalwert der Implantat-Gruppe lag höher als die Streuung der Läsion-Gruppe. Bei diesem Maximum handelt es sich aber um ein einziges Tier (S67), welches dann vergleichbar mit dem Extremwert der 12-Monate-Läsion-Gruppe behandelt wird. Nach 12 Monaten wird also hinsichtlich der MMP 13 Konzentration in der gesamten Bandscheibe die These der Studie belegt.

Im Fall von MMP 13 lieferte die Verteilung der Konzentration innerhalb der verschiedenen Zonen der Bandscheibe eine bessere Einsicht in die Abbauprozesse der Matrix. Bei fast allen

Gruppen ist die Nucleus-Zone die Zone, mit den niedrigsten Werten und es ist außerdem deutlich ein „V“-förmiger Verlauf der Linien zu erkennen. Nur die 12-Monate-Implantat-Gruppe zeigte in der rechten Anulus-Zone noch niedrigere Werte als in ihrer Nucleus-Zone. Um dieser Beurteilung ein weiteres Kriterium hinzuzufügen, wird der Verteilungsquotient (Tab. 14) herangezogen. Bei den 3-Monate-Gruppen zeigt die Implantat-Gruppe den höheren Quotient-Wert. Die Höhe dieses Quotienten bei der Implantat-Gruppe beruht aber mit Sicherheit darauf, dass die Implantat-Gruppe höhere MMP 13-Werte in den Anulus-Zonen aufweist. Aus diesem Grund kann eine positive Beurteilung zugunsten der Implantat-Gruppe nicht mit Sicherheit gemacht werden. Bei den 12-Monate-Gruppen zeigt die Implantat-Gruppe eindeutig eine größere Spannbreite und weist höhere Werte einschließlich eines Extremwertes auf. Dies könnte möglicherweise bedeuten, dass die 12-Monate-Implantat-Gruppe eher in der Lage war, die Ausschüttung von MMP 13 auf die Läsion-Zone zu begrenzen, als die Läsion-Gruppe. Somit ließe sich nach zwölf Monaten eine Tendenz der Implantat-Gruppe, weniger Degeneration zu zeigen als die Läsion-Gruppe, feststellen.

Die gesamte rechte Anulus-Zone und die obere Nucleus-RoI zeigten bei den 12-Monate-Gruppen bei den statistischen Tests einen Signifikanzwert kleiner als 0,05. Dadurch ist der Unterschied zwischen diesen Gruppen in diesen Zonen als nicht zufallsbedingt einzustufen (Bortz 2005).

#### 5.10 PGP 9.5

PGP 9.5 ist ein Neuronenmarker (Manek und Mitarbeiter 1993). In der Bandscheibe wird mit dem Fortschreiten der Degeneration, Nervenzellproliferation von der Peripherie aus beobachtet, die mit Schmerzen verbunden sein kann (Freemont und Mitarbeiter 1997). In der vorliegenden Studie wurde die Neoinnervation anhand des Vorkommens von PGP 9.5 in den Bandscheiben untersucht. Da die Neoinnervation proportional zum Degenerationsgrad in den betroffenen Bandscheiben wächst (Melrose und Mitarbeiter 2002; Brown und Mitarbeiter 1997; Freemont und Mitarbeiter 1997), wurde sie in der vorliegenden Studie als ein weiterer Indikator für den Grad der Bandscheibendegeneration gewählt.

Eine quantitative Analyse der Innervation der Bandscheibe mittels Immunfluoreszenz gegen PGP 9.5 am ovinen Modell, wurde 2003 in einer Studie von Fagan und Mitarbeitern durchgeführt. Hierfür wurden alle Bandscheiben der Lendenwirbel von 15 gesunden Merinoschafen mit einer ähnlichen Prozedur untersucht, wie in der vorliegenden Studie. Für die Bewertung wurden die immunopositive Nervenfasern, ihre Form und die Tiefe ihrer Lokalisation angegeben. Die Ergebnisse zeigten, dass die Nervenfasern bis zu einer maximalen Tiefe von 3 Lamellen des äußeren Anulus fibrosus hineinreichten. In einem einzigen Fall reichten die Nervenfasern bis zur siebten Lamelle. Zudem zeigte die Studie keine Unterschiede zwischen den verschiedenen Wirbelsäulensegmenten in Bezug auf ihre Innervation. Nahezu die gleichen Methoden verwendete 2004 die Arbeitsgruppe von Willenegger, um die Innervation der Bandscheiben von ausgewachsenen Hunden verschiedener Rassen und verschiedenen Alters zu bestimmen. Da Hunde, ebenso wie der Mensch, unter dolenten Diskopathien leiden können, war die Feststellung und Quantifizierung von Nervengewebe in der Bandscheibe ein wichtiger Schritt, um die Mechanismen der diskogenen Rückenschmerzen zu verstehen (Luttgen 1993). Die Studie von Willenegger zeigte das gleiche Ergebnis wie die Studie von Fagan, in Bezug auf die Lokalisation der Nervenfasern. Weiterhin ergab die Analyse von Willenegger eine innige Verbindung zwischen Nervenfasern und Blutgefäßen. Andere Spezies bei denen ein ähnliches Innervationsmuster in den Bandscheiben gefunden wurde, sind Sandratten und Kaninchen. Ein Vergleich der

Innervation zwischen Bandscheiben, denen eine Läsion zugefügt wurde und gesunden Bandscheiben wurde bereits 2002 in einer Studie von Melrose und Mitarbeitern angestellt. Diese Studie wurde ebenfalls an Merinoschafen durchgeführt und verwendete den immunhistochemischen Nachweis von PGP 9.5 bei Läsion- und Kontroll-Tiergruppen nach 3, 6, 12 und 26 Monaten post operationem. Diese Studie bewies die Einsprossung von Nervenfasern in die Bandscheiben der Läsion-Gruppen, die etwa doppelt so tief wie die der intakten Gruppen in das Bandscheibengewebe hineinreichten. Außerdem konnte bei dieser Studie festgehalten werden, dass nach 12 Monaten die Neoinnervation ihr Maximum erreicht hatte. Eine genaue Übertragung dieser Tatsache auf die vorliegende Studie ist aber nur bedingt möglich, denn obwohl die Versuchstiere und die Methoden sehr ähnlich sind, war die zugefügte Läsion unterschiedlich. Bei der Studie von Melrose handelte es sich um eine etwa 4 mm tiefe Inzision und nicht um eine partielle Nukleotomie wie in dieser Studie. Dieser Unterschied ist möglicherweise der Grund, warum sich bei der vorliegenden Studie Proben befinden, die nach 3 Monaten eine größere immunopositive Fläche aufweisen, als die der 12-Monate-Gruppen. Weiterhin zeigte sich bei der Studie von Melrose die höhere Blutgefäß- und Nervenfaserdichte in den Zonen nahe der Läsion, wo die Einsprossungen auch am tiefsten ins Matrixgewebe hineinreichten. In der vorliegenden Studie war die Läsion größer und reichte tiefer ins Gewebe hinein. Dieser Aspekt könnte das Hineinwachsen von Blutgefäßen und Nervenfasern bis in den Nucleus so begünstigt haben, dass ihr Wachstumsmaximum nicht mit 12 Monaten sondern früher erreicht werden konnte.

Im Vergleich zu den anderen Antigenen sind die Messwerte von PGP 9.5 in der vorliegenden Studie relativ klein (siehe Abbildung 33). Die 3-Monate-Gruppen widerlegen die These dieser Studie, indem die Implantat-Gruppe als einzige aller vier Gruppen, relativ hohe Werte zeigt. Nach 12 Monaten kehrt sich diese Lage jedoch um. Obwohl beide 12-Monate-Gruppen wieder kleine Streuungen zeigten, ist noch zu erkennen, dass die Streuung der Läsion-Gruppe eine größere Spannbreite besitzt und auch höher reicht als die Implantat-Gruppe. Zusätzlich zeigt die 12-Monate-Läsion-Gruppe einen Extremwert, der höher liegt als der Ausreißer der Implantat-Gruppe. Somit wird die These der Studie durch die Ergebnisse der 12-Monate-Gruppen bestätigt. Die Ergebnisse der Zonen-Untersuchung stimmten mit der Literatur überein. Bei der Mehrheit der Proben war im Nucleus keine immunopositive Fläche nachweisbar (Urban und Roberts 2003; Brown und Mitarbeiter 1997). Es waren aber trotzdem bei den 3-Monate-Gruppen und vor allem in der Implantat-Gruppe vereinzelt hohe Werte in den Nuclei festzustellen. Die 12-Monate-Gruppen zeigen dagegen die erwarteten „V“-förmigen Verläufe der Proben. Hier zeigt die Implantat-Gruppe in der Nucleus pulposus-Zone nur Nullwerte, im Gegensatz zur Läsion-Gruppe. Es wurde also in dieser Studie, durch die Untersuchung von PGP 9.5 in den verschiedenen Zonen der Bandscheibe, die Tendenz festgestellt, dass die Tiere mit Implantat nach 3 Monaten mehr und nach 12 Monaten weniger der Neoinnervation in der Bandscheibe unterlagen, als die Tiere die nur die Läsion aufwiesen.

Durch die statistischen Tests wurde bei dieser Färbung kein signifikanter Unterschied zwischen den gleichaltrigen Gruppen identifiziert, somit bleibt der Wert dieser Ergebnisse auf einer deskriptiven Ebene und wird nicht durch die statistischen Tests bestätigt.

### 5.11 Kollagen Typ I

Da Kollagen Typ I ubiquitär im Organismus vorkommt, kann aus seiner Konzentration keine direkte Aussage über den Zustand der Bandscheibe getroffen werden. Die Literatur berichtet nur von einem Anstieg der Konzentration an Kollagen Typ I in den frühen Phasen der Degeneration (Bernard und Mitarbeiter 2000; Kääpä und Mitarbeiter 1995). Es ist außerdem

belegt worden, dass Kollagen Typ I im Nucleus pulposus und in den Endplatten spärlich bis gar nicht vertreten ist, während die äußeren Lamellen der Anuli fibrosus fast ausschließlich aus Kollagen Typ I bestehen (Guiot und Mitarbeiter 2000; Roberts und Mitarbeiter 1991; Beard und Mitarbeiter 1980; Eyre und Muir 1977). Es wird also von einer Beurteilung der Gesamtflächen abgesehen und direkt die Verteilung von Kollagen Typ I in den verschiedenen Zonen der Bandscheibe beurteilt.

Die zwei Hauptkollagenarten in der Bandscheibe, Kollagen Typ I und Typ II, wurden bereits mehrfach anhand der Immunhistochemie untersucht. Die Studie von Roberts und Mitarbeiter von 1991, welche dieser Arbeitsgruppe den Volvo Award in Basic Sciences einbrachte, ist sicherlich der Anhaltspunkt für alle Arbeiten, die sich mit dem immunhistochemischen Nachweis von Kollagen in der Bandscheibe befassen. Kollagen Typ I und Typ II sind in der Bandscheibe nicht nur quantitativ wichtig, sie verleihen der Bandscheibe außerdem ihre Druck- und Zugfestigkeit und stellen das Gerüst der Matrix dar (Roberts und Mitarbeiter 1991). Aus diesem Grund ist in jeder biochemischen Analyse der Bandscheiben eines Tieres oder eines Menschen mit einer Kollagen Typ I und/oder Typ II-Untersuchung zu rechnen. Ein weiterer, häufig untersuchter Kollagentyp, ist Kollagen vom Typ IV, der als Gefäßmarker verwendet wird. Zur Analyse des Kollagens in der Bandscheibe wird hauptsächlich die Immunhistochemie und die PCR mRNA-Analyse herangezogen (Iwashina und Mitarbeiter 2006). Die vorliegende Studie zeigte als Ergebnis der Kollagen-Untersuchung die Größe der immunopositiven Flächen für Kollagen Typ I und Typ II. Diese Methode ermöglichte die Datenerhebung und graphische Darstellung der Ergebnisse in der gleichen Art und Weise, wie bei den anderen Antigenen der Studie.

Bei gesunden oder wenig degenerierten Bandscheiben wäre laut Literatur ein „V“-förmiger Verlauf der Linien-Grafik (Tabelle 15) zu erwarten (Hoogendoorn und Mitarbeiter 2008; Hadjipavlou und Mitarbeiter 2008). Bei der 3-Monate-Läsion-Gruppe zeigen die meisten Tiere den „V“-förmigen Linienverlauf. Andererseits liegt die Streuung dieser Gruppe höher, als die der Implantat-Gruppe. Diese beiden sich widersprechenden Erkenntnisse machen es unmöglich, eine konkrete Aussage über den Degenerationsgrad der beiden Gruppen zu treffen. Bei den 12-Monate-Gruppen dagegen zeigt die Implantat-Gruppe ausschließlich „V“-förmige Verläufe bei allen Linien. Außerdem ist die Streuung, abgesehen von der Läsionszone (linker Anulus), bei der Implantat-Gruppe kleiner als bei der Läsion-Gruppe. Mit anderen Worten zeigt die Implantat-Gruppe niedrigere Werte in der Nucleus-Zone und höhere Werte in der Läsionszone, als die Läsion-Gruppe. Dieses Ergebnis unterstützt die These der vorliegenden Studie, da in den Nuclei der Tiere mit dem Implantat weniger Kollagen Typ I zu finden war, als bei den Tieren ohne Implantat.

Die statistischen Tests ergaben bei den 3-Monate-Gruppen signifikante Unterschiede zwischen ihren unteren, linken und ihren oberen, rechten Anulus fibrosus-RoI. Da aber bei den 3-Monate-Gruppen keine eindeutige Aussage möglich war, bleiben die Ergebnisse der Untersuchung auf Kollagen Typ I auf die deskriptive Ebene begrenzt.

## 5.12 Kollagen Typ II

Kollagen Typ II kommt laut Literatur im Nucleus pulposus und in den Endplatten als Hauptkollagenart vor (Roberts und Mitarbeiter 1991; Beard und Mitarbeiter 1980 und 1981). Die Übergangszonen enthalten höhere Mengen an Kollagen Typ II, als an Kollagen Typ I (Urban und Roberts 2003; Guiot und Mitarbeiter 2000; Roberts und Mitarbeiter 1991). Studien belegen, dass bei der Frühphase der Bandscheibendegeneration, eine durch

Genexpression induzierte Zunahme der Menge an Kollagen Typ II registriert wird. Diese Menge klingt dann in Folge von gesteigerten Abbauprozessen und Produktion von degenerierten Kollagen-Ketten ab (Hoogendoorn und Mitarbeiter 2008; Raj 2008; Bernard und Mitarbeiter 2000).

Eine ähnliche Untersuchungsmethode wie die der vorliegenden Arbeit wurde bereits in einer Studie an Ratten durchgeführt. Zhang und Mitarbeiter führten 2008 eine Studie an jungen und adulten Ratten durch, bei der verschiedene Degenerationsparameter, unter ihnen die Expression von Kollagen Typ II, Hinweise vermitteln sollten, ob die Altersdegeneration bei der Ratte die gleichen Mechanismen durchläuft wie beim Menschen. Der Prozess der Probengewinnung und Färbung war bei beiden Studien vergleichbar. Die Auswertung zeigt aber den Unterschied, dass bei der vorliegenden Studie die Ergebnisse als Fläche angegeben wurden, während es sich bei der Studie von Zhang und Mitarbeitern höchstwahrscheinlich um digital ermittelte Farb-Intensitätswerte handelte. Hierfür werden durch die digitale Bilderfassungssoftware Farbwerte angegeben, die die Farbtintensität ausdrücken können. Eine Gemeinsamkeit beider Studien liegt allerdings in der statistischen Auswertung. Der Signifikanzwert bezüglich Kollagen Typ II im Nucleus und in den Endplatten der Studie von Zhang, ähnelt dem Wert des Nucleus und der oberen Endplatte der vorliegenden Studie bei den 3-Monate-Gruppen und zeigt bei der Studie von Zhang, dass der Unterschied in der Kollagen Typ II Expression bei jungen Tieren signifikant höher ist, als bei adulten Tieren.

In der vorliegenden Studie zeigte die Untersuchung von Kollagen Typ II in den Gesamtflächen bei den 3-Monate-Gruppen eine höhere Konzentration dieses Moleküls in der Implantat-Gruppe. Obwohl die Streuung dieser Gruppe eine größere Spannbreite besitzt als die der Läsion-Gruppe, liegt sogar das Minimum der Implantat-Gruppe höher als der Median der Läsion-Gruppe und bestätigt die These der Studie. Nach zwölf Monaten allerdings zeigt die Läsion-Gruppe eine ähnliche Streuung, wie die eben besprochene 3-Monate-Implantat-Gruppe, welche aber eine etwas größere Spann- und Interquartilsbreite aufweist. Die 12-Monate-Implantat-Gruppe besitzt eine kleinere Streuung, die zwar mit höher gelegenen Minimum und 25er Quartil anfängt, jedoch relativ weit unter der Streuung von der 12-Monate-Läsion-Gruppe aufhört. Ein Grund für die kleine Streuung dieser Gruppe könnte die geringe Probenanzahl sein. Dessen ungeachtet wird aufgrund dieser Ergebnisse angenommen, dass die Konzentration an Kollagen Typ II nach zwölf Monaten die These der Studie widerlegt. Die Untersuchung in den verschiedenen Zonen zeigte, den Beschreibungen aus der Literatur entsprechend, höhere Werte in den Nuclei pulposi als in den beiden Anuli fibrosi (Hoogendoorn und Mitarbeiter 2008; Beard und Mitarbeiter 1981). Dies ist auch in der Linien-Grafik (Diag. 20) durch „A“-förmige Verläufe der Linien bei den meisten Tieren zu sehen. Die Ergebnisse der 3-Monate-Gruppen zeigen vor allem in der Nucleus-Zone höhere Konzentrationen an Kollagen Typ II bei der Implantat-Gruppe. Der Unterschied zwischen den Nucleus- und Anulus-Zonen ist bei der Implantat-Gruppe markanter, was in der Liniengrafik an den höheren Spitzen der Linien zu erkennen ist. Dieses Ergebnis bestätigt die These der Studie, da bei der Implantat-Gruppe eine höhere Kollagen Typ II-Konzentration in den Nuclei pulposi der zu dieser Gruppe gehörenden Tiere festgestellt wurde. Die 12-Monate-Gruppen zeigen, wie die 3-Monate-Implantat-Gruppe ebenfalls hohe Werte. Der Unterschied liegt darin, dass die Verläufe der Linien bei den 12-Monate-Gruppen etwas flacher ausfallen als bei der 3-Monate-Implantat-Gruppe. Diese Eigenschaft ist auch auf dem Liniendiagramm zu erkennen. Hier zeigen die 12-Monate-Gruppen untereinander geringe Unterschiede. Der Unterschied zwischen Nucleus- und Anulus-Zone ist bei beiden 12-Monate-Gruppen fast gleich. Aufgrund der geringen Anzahl von gültigen Proben bei der Implantat-Gruppe kann auch keine sichere Aussage über die Streuung gemacht werden. Trotzdem zeigt der Vergleich mit den vorhandenen Proben keinen markanten Unterschied zwischen den 12-Monate-

Gruppen und zeigt somit aus der Sicht der Kollagen Typ II-Konzentration in der Bandscheibe keinen erkennbaren Einfluss des Implantats auf die Bandscheibendegeneration.

Die Ergebnisse der Untersuchung der Endplatten spiegeln die aus der Gesamtflächen- und Zonen-Untersuchung erlangten Resultate weitgehend wieder. Durch diese Untersuchung wurden nach 3 Monaten Hinweise für eine Regeneration bei der Implantat-Gruppe festgestellt, wobei größere immunopositive Flächen als bei der Läsion-Gruppe gefunden wurden. Bei den 12-Monate-Gruppen wurden jedoch kleinere immunopositive Flächen bei der Implantat-Gruppe festgestellt, was auf keine positive Wirkung des Implantats gegen die Bandscheibendegeneration hindeutet.

Die statistischen Tests ergaben für dieses Antigen einen signifikanten Unterschied zwischen den gesamten oberen Endplatten-RoIs, den mittleren, linken Anuli, und dem Nucleus pulposus-RoI der 3-Monate-Gruppen. Somit werden bei den 3-Monate-Gruppen, bei welchen die Untersuchungen auf eine regenerative Wirkung des Implantats hindeuteten, die Ergebnisse durch die statistischen Tests bestätigt.

### 5.13 Vergleich von Kollagen Typ I und Typ II in den Übergangszonen

Übergangszonen sind in der Wirbelsäulenmedizin die Bereiche direkt um den Nucleus pulposus, die den Übergang von diesem zum Anulus fibrosus kennzeichnen (Roberts und Mitarbeiter 1991; Beard und Mitarbeiter 1980). Hier ist laut Literatur in gesunden Bandscheiben eine höhere Konzentration an Kollagen Typ II als an Kollagen Typ I zu finden (Beard und Mitarbeiter 1980). In degenerierten Bandscheiben hingegen ändert sich dieses Verhältnis zugunsten von Kollagen Typ I (Urban und Roberts 2003; Guiot und Mitarbeiter 2000; Kääpä und Mitarbeiter 1995). In der vorliegenden Studie wurde der Vergleich zwischen Kollagen Typ I und II in den Übergangszonen als ein weiterer Parameter zur Degenerationsbeurteilung verwendet.

Die Übergangszonen der Läsionsseite, das heißt die linken Übergangszonen, wurden zuerst analysiert, um so eine bessere Übersicht bei der Darstellung der Ergebnisse zu erreichen. Bei den 3-Monate-Gruppen zeigt die Läsion-Gruppe sehr ähnliche Streuungen von Kollagen Typ I und II. Unter Berücksichtigung beider Ausreißer bei der Kollagen Typ I Untersuchung, wäre dessen Streuung mit der von Kollagen Typ II fast gleich groß. Die Implantat-Gruppe dagegen zeigt eine etwas kleinere Kollagen-Typ I-Streuung und eine viel größere und höhere Kollagen Typ-II Streuung, die zudem noch einen Ausreißer ausweist. Die Torten-Grafik (siehe Diagramm 29 auf Seite 84) veranschaulicht diesen Unterschied sogar noch besser. Diese erste Beurteilung zeigt, dass bei den 3-Monate-Gruppen die Kollagen-Verhältnisse der Implantat-Gruppe näher am physiologischen Standard liegen und bestätigt somit die These der Studie. Die 12-Monate-Gruppen zeigen dagegen ganz andere Verhältnisse zwischen beiden Kollagenarten. Nach 12 Monaten zeigt die Läsion-Gruppe selbst unter Berücksichtigung des Ausreißers bei Kollagen Typ I eine höhere Streuung ihrer Kollagen Typ II-Werte, als ihrer Kollagen Typ I-Werte. Die Implantat-Gruppe zeigt zwar auch eine höhere Streuung von Kollagen Typ II, der Unterschied ist hier aber kleiner und wirkt aufgrund eines Extremwertes von Kollagen Typ I noch etwas kleiner. Die Tortengrafik (siehe Diagramm 31 auf Seite 86) veranschaulicht diese Verhältnisse. Da für die Erstellung dieser Grafik nur die Proben einbezogen wurden, bei denen beide Antikörper untersucht wurden, sieht die Verteilung etwas anders aus, als bei den Boxplots. Hier zeigt die Implantat-Gruppe ein nahezu 1:1 Verhältnis von Kollagen Typ I zu Typ II in der linken Übergangszone 12 Monate post operationem und gibt somit keinen Hinweise für eine Regeneration der degenerierten Bandscheiben.

Die rechten Übergangszonen zeigen nach 3 Monaten das gleiche Bild wie die linken Übergangszonen der gleichaltrigen Gruppen. Die 12-Monate-Gruppen zeigen auf der Boxplot-Darstellung ein Verhältnis von Kollagen Typ II zu Typ I von etwa 20:1 bei beiden Behandlungsgruppen. Die Tortengrafik zeigt dagegen eine etwas unspektakuläre Darstellung mit Verhältnissen von 10:1, ebenfalls zugunsten von Kollagen Typ II. Es ist dennoch bei der Tortengrafik zu erkennen, dass das Verhältnis zugunsten von Kollagen Typ II bei der 12-Monate-Implantat-Gruppe minimal höher ist. Somit zeigen die Messungen in den rechten Übergangszonen Hinweise für eine Wirkung des Implantats gegen die Bandscheibendegeneration.

#### 5.14 Klinische Relevanz

Die Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchungen zeigten, dass das dynamische Implantat (SoFi-System, SYNTHES<sup>®</sup>) in der Lage war, die meisten Auswirkungen einer Bandscheibendegeneration bei der Mehrzahl der Tiere dieser Studie erfolgreich zu begrenzen. Aus insgesamt 30 untersuchten Kriterien, waren bei 7 davon keine genaue Aussage machbar, bei 9 Punkten zeigten die Implantat-Gruppen keine Tendenz zur Verbesserung ihres Degenerationsgrades verglichen mit den Degeneration-Gruppen, während bei 14 Punkten eine Tendenz zur Verbesserung des Degenerationsgrades bei den Implantat-Gruppen im Vergleich zu den Degeneration-Gruppen festgestellt wurde. Die Statistik ergab bei 2 Immunmarkierungen einen signifikanten Unterschied zwischen den Behandlungsgruppen, und zwar bei der Markierung mit Anti-MMP 13 im ganzen rechten Anulus fibrosus und oberen, mittleren Nucleus und bei der Markierung mit Anti-Kollagen Typ II in der gesamten oberen Endplatte und dem mittleren linken Anulus, sowie im mittleren Nucleus pulposus. Eine statistische Signifikanz fand sich bei Untersuchungen, die als Ergebnis Hinweise auf einen Einfluss des Implantats gegen die Bandscheibendegeneration lieferten.

Die dynamische Stabilisation von Wirbelsäulensegmenten bei Bandscheibendegeneration gehört zu den standardisierten Methoden der Bandscheibenchirurgie. Das Dynesys-System von ZIMMER SPINE<sup>®</sup>, auf dessen Prinzip auch das hier getestete, dynamische System basiert, findet schon seit Jahren Anwendung bei Menschen (Bothmann und Mitarbeiter 2008; Ricart und Serwier 2008). Hauptvorteil dieser Implantate ist die Erhaltung der Beweglichkeit des betroffenen Segmentes, was eine schnelle Degeneration der anschließenden Segmente verhindern soll (Lee und Mitarbeiter 2008; Schwarzenbach und Mitarbeiter 2005). Gleichzeitig wird die Bandscheibe des betroffenen Segmentes so stabilisiert und entlastet, dass eine Regeneration des Gewebes angestrebt werden kann (Welch und Mitarbeiter 2007). Die Nachteile dieses Systems liegen vor allem in der Lockerung der Pedikelschrauben. Es sind Fälle beschrieben worden, bei denen trotz richtiger Platzierung der Pedikelschrauben, die Patienten keine Zustandsverbesserung erlebten (Würgler-Hauri und Mitarbeiter 2008).

Die Schmerzen, die bei den menschlichen Patienten im Vordergrund aller Symptome stehen, können an einem ovinen Modell, wenn überhaupt, nur indirekt anhand der Neoinnervation abgeschätzt werden (Freemont und Mitarbeiter 1997). Die Untersuchung auf die Neoinnervation mittels PGP 9.5-Immunolokalisation, ergab sowohl bei der Untersuchung der Gesamtflächen, als auch der einzelnen Zonen nach 3 Monaten keine zufriedenstellende Wirkung des Implantats auf die Bandscheibendegeneration. Allgemein ist zu bemerken, dass es nach 3 Monaten bei den meisten der untersuchten Parameter keine Anzeichen von Regeneration bei den Implantat-Gruppen zu verzeichnen war.

Die Metalloproteinasenaktivität, die in der vorliegenden Studie anhand der MMP 13-Immunlokalisation beurteilt wurde und die Neoinnervation waren nach 3 Monaten bei der Implantat-Gruppe höher, als bei der Läsion-Gruppe und deuteten somit auf einen höheren Degenerationsgrad bei der Implantat-Gruppe. Die Bereitschaft zur Angiogenese, die in der vorliegenden Studie anhand der  $\alpha$ -SMA-Immunlokalisierung bewertet wurde, war bei den 3-Monate-Gruppen nicht beurteilbar. Nach 12 Monaten zeigten diese eben erwähnten Parameter, sowohl bei der Gesamtflächen- als auch bei der Zonen-Untersuchung, Hinweise für eine regenerative Wirkung des Implantats. Von diesen Parametern wurde bei der Metalloproteinasenaktivität der Unterschied zwischen den 12-Monate-Gruppen durch die statistischen Tests als signifikant beurteilt. Die Immunlokalisierung von Keratansulfat ergab als einziger Parameter auch nach 12-Monaten kein zufriedenstellendes Ergebnis für die Wirkung des Implantats als Therapie gegen die Bandscheibendegeneration.

Das Vorkommen der beiden wichtigsten Kollagentypen wurde ebenfalls untersucht. Da die Konzentration des ubiquitär vorkommenden Kollagen Typ I wenig Aussagekraft über den Degenerationszustand der Bandscheibe besitzt, wurde seine Verteilung direkt in den verschiedenen Zonen analysiert (Raj 2008; Urban und Roberts 2003; Guiot und Mitarbeiter 2000; Kääpä und Mitarbeiter 1995). Nach der Zonen-Untersuchung von Kollagen Typ I in den 3-Monate-Gruppen konnte keine sichere Aussage über den Degenerationsgrad der Behandlungsgruppen gemacht werden. Die 12-Monate-Gruppen aber lieferten Hinweise für regeneratives Verhalten bei der Implantat-Gruppe, indem nur bei dieser Gruppe in den Nuclei weniger Kollagen Typ I vorhanden war, als in den Anulus-Zonen. Dieser Anstieg von Kollagen Typ I im Nucleus pulposus wurde als Regenerationsversuch des Organismus aufgefasst (Duance und Mitarbeiter 1998). Kollagen Typ II wurde ebenfalls untersucht. Diese Untersuchung ergab nach 3 Monaten, sowohl bei der Gesamtflächen- als auch bei der Zonen- und Endplatten-Untersuchung Hinweise für Regeneration bei den Implantat-Gruppen. Bei diesem Kollagentyp waren sowohl die Gesamtmenge, als auch die Verteilung in den Zonen, Untersuchungskriterien. Nach 12 Monaten aber zeigte die Untersuchung auf Kollagen Typ II keine Hinweise einer Regeneration. Es wurde also festgestellt, dass nach 3 Monaten die Implantat-Gruppe sowohl in den Nuclei pulposi, als auch in den gesamten Bandscheiben einen höheren Anteil an Kollagen Typ II aufwies, als die Läsion-Gruppe. Damit behielten die Bandscheiben der Implantat-tragenden Tiere bessere Zugfestigkeit, als die Tiere der Läsion-Gruppe (Raj 2008; Roberts und Mitarbeiter 1991). Der Unterschied zwischen den Behandlungsgruppen der zu diesem Ergebnis führte, wurde auch statistisch durch die Tests bestätigt. Nach 12 Monaten war diese Tendenz allerdings nicht mehr festzustellen, da beide Behandlungsgruppen sehr ähnliche Streuungen in ihren Werten aufwiesen. Zuletzt wurde das Vorkommen beider Kollagentypen in den Übergangszonen miteinander verglichen, da physiologischerweise in diesem Bereich beide Kollagentypen in unterschiedlichen Konzentrationen nebeneinander vorkommen (Beard und Mitarbeiter 1980). Die linken Übergangszonen zeigten nach 3 Monaten Anzeichen von Regeneration bei der Implantat-Gruppe, jedoch keine Anzeichen nach 12 Monaten. Die rechten Übergangszonen der Implantat-Gruppen beider Altersgruppen zeigten dagegen die Tendenz weniger Degeneration vorzuweisen, als die Läsion-Gruppen.

2005 entwickelten Omlor und Mitarbeiter ein Bandscheibendegenerationsmodell an Kaninchen, bei dem ein Wirbelsegment mittels vertikaler Titanschrauben, die in den Wirbelkörper eingebracht werden, durch ein extern eingesetztes Kompressionsinstrument komprimiert und degeneriert wurde. In dieser Studie wurden die Bandscheiben auf ihren Gehalt an Kollagen Typ I und II untersucht. Der Quantifizierung von Kollagen Typ I-immunopositiven Zellen wurde keine Relevanz gewidmet. Vielmehr wurde die Architektur der Anulus fibrosus-Fasern anhand dieser Färbung beschrieben. Das Fortschreiten der

Degeneration äußerte sich in einem Verlust der Lamellenorganisation des Anulus. Kollagen Typ II wurde dagegen quantitativ erfasst. Nach einem Tag war die Menge an immunopositiven Zellen mit der Kontrollgruppe identisch, während nach 28 Tagen eine statistisch signifikante Abnahme der immunopositiven Zellen festgestellt wurde. Weitere 28 Tage später, wurde eine ebenso signifikante Abnahme registriert. Diese Ergebnisse korrelieren mit den Ergebnissen der vorliegenden Studie bei den 3-Monate-Gruppen. Es ist jedoch zu bemerken, dass obwohl die Zeitspanne relativ ähnlich ist, aufgrund der verschiedenen Art der Läsion und der Tierspezies, ein Vergleich beider Ergebnisse nur bedingt möglich ist.

Ein Jahr später ergänzte die gleiche Arbeitsgruppe dieses Degenerationsmodell, indem sie nach der Kompressionszeit bei einer Gruppe dieser Tiere den Druck beendete (Kontrollgruppe), während bei einer weiteren Gruppe ein Distraktionsinstrument, anstatt des Kompressionsinstrumentes eingesetzt wurde. Beide Gruppen wurden dann erst nach weiteren 28 Tagen Studienzeit eingeschläfert (Guehring und Mitarbeiter 2006). Diese Studie setzte wieder die immunhistochemische Untersuchung von Kollagen Typ II ein, jedoch nicht die von Kollagen Typ I. Die Ergebnisse zeigten eine signifikant höhere Anzahl an Kollagen Typ II-immunopositiven Zellen bei der Distraktion-Gruppe, als bei der Kontrollgruppe. Die Kompression-Gruppe zeigte die niedrigsten Werte. Eine sehr ähnliche Studie von Kroeber und Mitarbeiter aus dem Jahr 2005 hatte sich mit der Erfassung der diskalen Distraktion an dem gleichen Degenerationsmodell beschäftigt. Diese Gruppe analysierte zudem noch die Anschlußsegmente, jedoch ohne eine immunhistochemische Untersuchung durchzuführen. Die radiologischen, histologischen und biomechanischen Untersuchungen ergaben keine Auswirkungen auf die Anschlußsegmente durch die kontrollierte Distraktion. Dass diese kontrollierte Distraktion gezielt von therapeutischem Nutzen sein kann, untersuchte die gleiche Gruppe unter der Leitung von Unglaub 2006 am exakt gleichen Degenerationsmodell. Diese Studien konnten den Zusammenhang zwischen Belastung und Degeneration, sowie zwischen Entlastung und Regeneration der Bandscheibe nachweisen. Später wurde jedoch in einer Follow up-Studie am Menschen belegt, dass eine übermäßige segmentale Distraktion, die Degeneration der Anschlußsegmente in der gleichen Art und Weise wie die Fusion induzieren kann (Kaito und Mitarbeiter 2010). Dies ist allerdings eine radiologische Untersuchung, ohne histologische oder immunhistologische Methoden.

Das Dynesys-System der Firma ZIMMER SPINE® wurde in einer Studie mit Pavianen geprüft. Diese Studie verlief jedoch ohne Degenerationsmodell, das heißt, den Tieren wurde lediglich das Dynesys-Implantat eingesetzt, ohne das ein weiterer Eingriff in die Bandscheibe durchgeführt wurde (Cunningham und Mitarbeiter 2010). Die Untersuchungsparameter dieser Studie waren die Motilität des behandelten Segmentes und die Stabilität der Pedikelschrauben. Die Ergebnisse zeigten, dass das behandelte Segment durch Dynesys erfolgreich stabilisiert wurde und nach Explantation des Dynesys die Motilität des Segmentes wiedererlangt wurde. Eine Lockerung der Schrauben wurde bei 25% der Tiere festgestellt. Die Follow up-Studien an menschliche Patienten zeigten sowohl zufriedenstellende Ergebnisse für das Dynesys, als auch Ergebnisse die mit denen einer Fusion vergleichbar sind (Würgler-Hauri und Mitarbeiter 2008; Putzier und Mitarbeiter 2005).

Um die Effektivität des Implantats besser beurteilen zu können wären längerfristige Studien notwendig, so dass die Entwicklung und Weiterentwicklung dieser Parameter kontrolliert werden können. Auf diese Weise wäre es möglich die Prozesse, die bei einer einhergehenden Reparatur der Matrix stattfinden, von denen, die nur auf die Degeneration an sich deuten, abzugrenzen. Ein Beispiel dafür ist die Angiogenese. Nach 3 Monaten könnte eine höhere Angiogeneserate auf eine höhere Bereitschaft des Gewebes, sich zu reparieren, hindeuten und

somit als ein regenerativer Prozess beurteilt werden, während langfristig gesehen die Vaskularisation mit Neoinnervation deutliche Anzeichen eines höheren Degenerationsgrades sind. Um die Effektivität des dynamischen Implantats vollständig zu untersuchen, wären die Untersuchungen der Anschlußsegmente unentbehrlich. Auf diese Weise könnte beurteilt werden, ob das Implantat tatsächlich das betroffene Segment entlastet, ohne die Anschlußsegmente dafür zu überbelasten, was den Hauptnachteil einer Fusion darstellt.

Darüber hinaus ist es notwendig zu erwähnen, dass die Übertragung der aus Tieren gewonnenen Daten auf den Menschen nur eingeschränkt möglich ist (Sheng und Mitarbeiter 2010).

#### 5.14.1 Relevanz für die Tiermedizin

Diese Ergebnisse zeigen, dass die posteriore, dynamische Stabilisierung eines Wirbelsäulensegmentes zur Therapie gegen Bandscheibendegeneration bei Tieren eine ernstzunehmende Alternative zu den bisherigen Methoden darstellt. Vor allem die Ergebnisse der Neoangiogenese, Neoinnervation und Metalloproteinaseaktivität ermutigen zur Benutzung eines dynamischen, posterioren Implantates, wie es das getestete System darstellt. Ein verbreitetes Problem bei Hunderassen mit Zwergwuchs (sogenannten chondrodystrophen Rassen wie dem Dackel), oder auch bei großen molosoiden Hunderassen mit krüppelten Schwänzen, ist die Bandscheibendegeneration oder Prolaps (Sterna und Burzykowski 2008; Poma und Mitarbeiter 2002). Die Standardbehandlung bei solchen Fällen reicht von der chirurgischen Laminektomie bis hin zur Elektroakupunktur (Hayashi und Mitarbeiter 2007). Bei anderen Wirbelsäulenveränderungen, wie etwa dem Wobbler-Syndrom, wird in der Tiermedizin mit einer Fusion der Wirbelkörper therapiert (Voss und Mitarbeiter 2006; Bruecker und Mitarbeiter 1989). Andere Stabilisations-Methoden finden ebenfalls in der tiermedizinischen Wirbelsäulen Chirurgie Benutzung (Voss und Montavon 2004; Beaver und Mitarbeiter 1996). Die dynamische Stabilisierung stellt somit eine Alternative zu den Standardmethoden in der Tiermedizin dar. Bis dato sind aber nur Daten von rigiden Implantaten als Therapie gegen Wirbelsäulenbeschwerden bei Hunden mit zervikaler Spondylomyelopathie oder vertebraler Instabilität zu finden, diese allerdings mit guten Ergebnissen (Aikawa und Mitarbeiter 2007; Dixon und Mitarbeiter 1996).

#### 5.15 Ergebnisse im Kontext des Gesamtprojekts

Die vorliegende Studie war Teil eines Projektes, welches die in vivo Evaluation des experimentellen, posterioren, dynamischen Stabilisationssystems als Ziel hatte. Zu diesem Zweck wurden die Proben durch andere Untersucher auch biomechanisch und histologisch untersucht.

##### 5.15.1 Biomechanik

Noch bevor die Wirbelsäulensegmente ins Histologie Labor gelangten, wurden alle im biomechanischen Labor auf ihre Range of Motion (ROM) und ihre Neutrale Zone (NZ) hin untersucht (Trojanowski 2009). Dafür wurden sie in einer speziellen Testungseinrichtung (Zwick Materialprüfmaschine, Modell Zwick 1455, Zwick GmbH & Co.KG, Ulm) eingebracht, mit einer speziellen Gerätschaft fixiert und unter kontrollierter Kraft gebeugt und gestreckt. Die Ergebnisse dieser Untersuchung waren in Grad angegeben und stellten

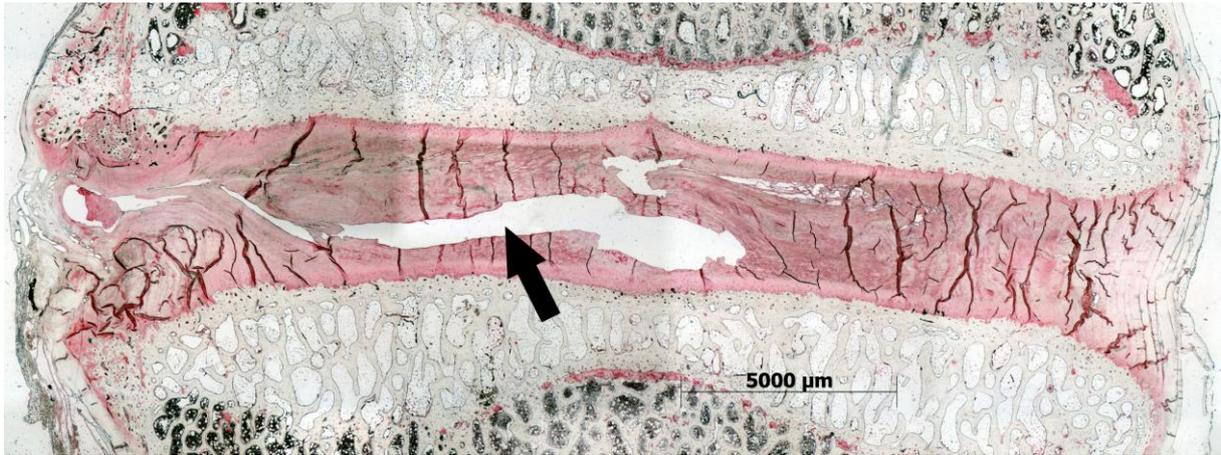
einerseits das ROM und andererseits die NZ der untersuchten Segmente dar. Beurteilt wurden die Gruppen in der gleichen Art und Weise wie die vorliegende Studie getrennt nach Behandlungsgruppen (Degeneration und Implantat hier PDSS genannt) und nach Zeitgruppen (3 und 12 Monaten post operationem). Für den statistischen Teil der Untersuchung wurde, wie bei der Histologie, das statistische Analyseprogramm SPSS 14.0 (SPSS Deutschland GmbH, München) verwendet. Der Unterschied zwischen den Verteilungen der Untersuchungsgruppen wurde in der gleichen Art und Weise auf ihre Signifikanz ( $p \leq 0.05$ ) getestet.

Ein Unterschied stellte allerdings das Ziel dieser Untersuchung dar. Die Biomechanik befasste sich mit der Analyse der Beweglichkeit der Versuchsobjekte und nicht mit der Degeneration. In anderen Worten testete die biomechanische Untersuchung, wie dynamisch das posteriore dynamische Implantat ist, um daraus zu schließen ob das experimentelle Implantat die Forderungen an diese Therapiemethode erfüllt. Über eine biomechanische Analyse kann lediglich indirekt ein gewisser Rückschluss über den Degenerationsgrad eines Segmentes gegeben werden (Fujiwara und Mitarbeiter 2000).

Die biomechanische Untersuchung ergab eine signifikante Versteifung der Implantat-Gruppen, die vergleichbar mit den Werten einer rigiden Stabilisierung sind. Nichtsdestotrotz kann eine rigide Stabilisierung, wie im Falle der kontrollierten Dislokation, auch zur Regeneration eines degenerierten Segmentes führen (Guehring und Mitarbeiter 2006).

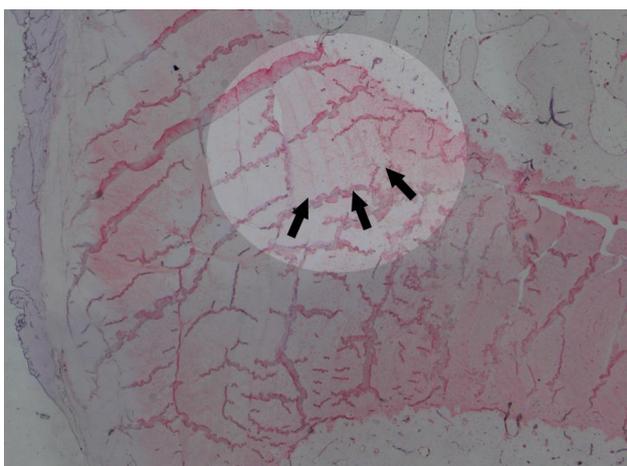
#### 5.15.2 Histologie

Das Projekt beinhaltete ebenfalls eine histologische Untersuchung der Proben. Für die Histologie wurden die Proben sowohl makroskopisch als auch mikroskopisch untersucht (Guder 2008). Die makroskopischen Parameter der Untersuchung waren das osteophytäre Wachstum und die Fissuren- beziehungsweise Hohlrumbildung. Die Ergebnisse zeigten keinen signifikanten Unterschied zwischen den Behandlungsgruppen. Obwohl in der Immunhistochemie diese Parameter nicht untersucht wurden, sind sie bei den Proben gut nachvollziehbar. Hohlräume wurden bei der Eingabe der zu untersuchenden Flächen in den Proben sogar gezielt markiert, um sie von der Auswertung ausschließen zu können. Gleichwohl könnten diese Veränderungen eine nachvollziehbare Erklärung für relativ niedrige Werte, trotz annehmbarer, höherer Degeneration bei der immunhistochemischen Untersuchung darstellen. Zuletzt wird durch die histologische Erfassung dieser Veränderungen in manchen Proben bestätigt, dass es sich dabei nicht um Fehler oder Artefakte der Präparation handelt, wie zuerst angenommen, sondern um tatsächliche Degenerationsanzeichen. Diese Befunde sind in der Abbildung 30 zu sehen.



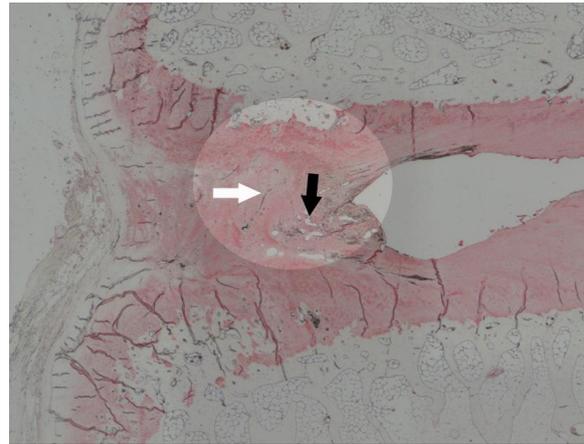
**Abbildung 30** Fissuren- beziehungsweise Hohlrumbildung in der Bandscheibe des Tieres S56 gefärbt mit Anti-Kollagen Typ II. Der schwarze Pfeil zeigt auf einen Hohlraum, welcher als Produkt der Extraktion des Nucleus pulposus entstand.

Die mikroskopischen Anzeichen der Degeneration waren neben der Hohlraum- und Kavernenbildung, die Desorganisation der Architektur der Bandscheibe (Abb. 32), die Vaskularisation oder Einblutungen und die Chondronenbildung. Diese Merkmale wurden dazu verwendet, die Proben in dem Score-System der Bandscheibendegeneration nach Boos (Boos und Mitarbeiter 2002) einzustufen. Die Ergebnisse der Untersuchung zeigten bei beiden Altersgruppen eine höhere Prozentzahl an Tieren mit Grad II der Degeneration bei den Implantat-Gruppen und eine höhere Prozentzahl an Tieren mit Grad III der Degeneration bei den Degeneration-Gruppen. Diese Unterschiede wurden jedoch durch die statistischen Tests nicht für signifikant befunden. Diese Veränderungen könnten ebenfalls in der vorliegenden Arbeit wiedergefunden werden, wurden aber als Degenerationsparameter nicht in Betracht gezogen. Die Abbildungen 30 und 32 veranschaulichen diese Befunde, wie sie in der vorliegenden Arbeit zu finden waren. Die Abbildung 31 zeigt dagegen, erkennbare Lamellarstrukturen wie sie bei einer gesunden Bandscheibe zu finden sind.



**Abbildung 31** Bandscheibe des Schafes S63 gefärbt mit Anti-Kollagen Typ II. Die schwarzen Pfeile zeigen auf noch erkennbare Lamellarstrukturen im äußeren, linken Anulus fibrosus.

**Abbildung 32** Bandscheibe des Schafes S70 gefärbt mit Anti-Kollagen Typ II. Der schwarze Pfeil zeigt auf kleine Hohlräume als Degenerationszeichen. Der weiße Pfeil zeigt auf ein Bereich, in dem jede erkennbare Lamellarstruktur verloren gegangen ist.



Die Endplatten wurden bei der histologischen Analyse separat mikroskopisch untersucht. In diesem Bereich wurden die Zelldichte sowie die Chondronenbildung, als Anzeichen eines strukturellen Umbaus und als Degenerationsparameter herangezogen und mit dem Scoring-System nach Gries (Gries und Mitarbeiter 2000) ausgewertet. Die Bestimmung der Endplatten-ROI erfolgte bei der histologischen Untersuchung, ähnlich wie bei der immunhistochemischen Untersuchung, mittels eines für diese Studie modifizierten, digitalen Analyse-Programmes unter Benutzung der Software KS 400 Version 3.0, der Firma Karl Zeiss (Carl Zeiss Vision GmbH, Eching, Deutschland). Der Unterschied zwischen beiden Untersuchungen lag darin, dass die histologische Untersuchung die Endplatten als die Summe aus der knorpeligen Endplatte und dem subchondralen Knochengewebe des Wirbelkörpers definierte, während die Immunhistochemie die Endplatten als eine 0,5 mm hohe Zone vom kranialen und kaudalen Rand der Bandscheibe in Richtung Nucleus pulposus definierte ohne Betrachtung des subchondralen Knochengewebe. Der Grund für diesen Unterschied liegt darin, dass für die immunhistochemische Untersuchung das Knochengewebe nicht mit untersucht wurde. Die histologische Untersuchung der Endplatten ergab bei den 3-Monate-Gruppen keine Degenerationsanzeichen, das heißt, bei allen Proben wurde Degenerationsgrad 0 verzeichnet. Die 12-Monate-Gruppen zeigten bei der Implantat-Gruppe Grad I der Degeneration bei 12,5% der Proben, während bei der Degeneration-Gruppe Grad I der Degeneration bei 33,3% der Proben verzeichnet wurde. Die immunhistochemische Untersuchung bediente sich nur bei der Analyse des Kollagen Typ II-Gehalts einer separaten Untersuchung der Endplatten. Die Ergebnisse dieser ROIs wichen von den bei der Zonen- und Gesamtflächenauswertung ermittelten Werten kaum ab. Die statistische Analyse der Ergebnisse der Histologie wurde mit dem SPSS Programm (SPSS Deutschland GmbH, München) durchgeführt. Dieses Programm ist der Vorgänger des für die Immunhistochemie verwendeten Programms PASW (Predictive Analysis Software, USA) und als solches ebenwertig. Das ausgewählte Signifikanzniveau von  $p=0.05$  war für beide Studien ebenfalls gleich.

Das osteophytäre Knochenwachstum wurde bei der immunhistochemischen Untersuchung zwar beobachtet, jedoch in die Auswertung nicht miteinbezogen. Die histologische Untersuchung erfasste dagegen diese Gegebenheit mancher Proben als separaten Untersuchungsparameter und beurteilte diese mittels eines eigens für die Studie erstellten Scoring-Systems. Dieses Scoring-System basierte auf der Größe des osteophytären Gewebes in [mm]. Sowohl bei den 3-Monate- als auch bei den 12-Monate-Gruppen konnten bei dieser Untersuchung höhere Degenerationsanzeichen bei der Degeneration-Gruppe verzeichnet werden. Jedoch konnten diese Ergebnisse von den statistischen Tests nicht als signifikant

eingestuft werden. Weiterhin befasste sich die histologische Untersuchung mit der Beurteilung der Facettengelenke. Dieser Teil der Untersuchung ergab bei allen Proben kein einziges Anzeichen von Degeneration.

Der letzte Teil der histologischen Untersuchung umfasste eine histomorphometrisch-quantitative Erfassung der Proben. Für diesen Teil der Histologie wurden die Proben in einer sehr ähnlichen Art und Weise digital erfasst, wie bei der Immunhistochemie. Die Untersuchungsparameter waren Knochendichte (%), Knochenfläche/Fläche der RoI (%), Trabekeldicke ( $\mu\text{m}$ ), Trabekelseparierung ( $\mu\text{m}$ ), Trabekelverzweigung (/mm), Trabekelzahl (/mm) und Knorpelfläche/Fläche der RoI (%). Diese Untersuchungsparameter sollten Informationen über Umbauprozesse im subchondralen Knochengewebe liefern, die zusammen mit der Bandscheibendegeneration einhergehen (Roberts und Mitarbeiter 1997; Hansson und Mitarbeiter 1980). Alle Untersuchungen auf diese Parameter ergaben keinen signifikanten Unterschied zwischen den Behandlungsgruppen, weder nach 3, noch nach 12 Monaten Studienzeit. Im Vergleich mit Proben von unbehandelten Tieren konnte aber die Tendenz erkannt werden, nach der es doch zu Umbauprozessen nach 3 monatiger Degeneration kam, die nach 12 Monaten noch mehr ausgeprägt waren. Eine Signifikanz wurde jedoch für diese Ergebnisse auch nicht verzeichnet.

Die Ergebnisse der morphometrisch-histologischen Untersuchung ergaben keinen signifikanten Unterschied zwischen den Behandlungsgruppen der Studie. Es konnte lediglich bewiesen werden, dass im Laufe der Studienzeit die Knochenumbauten bei den älteren Gruppen zunahmen. Obwohl weder die makro- noch die mikroskopische Untersuchungen statistisch relevante Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen verzeichneten, konnte bei den Degeneration-Gruppen die Tendenz eines ausgeprägteren, osteophytären Wachstums und erhöhter Umbauprozesse im Endplattenbereich beobachtet werden. Diese Ergebnisse geben einen ersten Hinweis darauf, dass die Ergebnisse der Untersuchungen hauptsächlich auf einer deskriptiven Ebene behandelt werden müssen. Bei der Mehrzahl der immunhistochemischen Untersuchungen wurde ebenfalls kein signifikanter Unterschied zwischen den Behandlungsgruppen festgestellt. Es konnte jedoch durch die Beobachtung der Streuungen der Gruppen manche Tendenz erkannt werden, die wiederum wie die Ergebnisse aus der Histologie, auf einer deskriptiven Ebene bleiben.

### 5.16 Schlussfolgerung

Die in der vorliegenden Studie benutzten Analysemethoden (immunhistochemische Markierung und digitale Bildanalyse) zeigten sich als zufriedenstellende Untersuchungsalternative zur klassischen mikroskopischen Untersuchung. Die Zuverlässigkeit einer immunhistochemischen Markierung, gekoppelt mit der Objektivität und Zeiteffizienz einer computergesteuerten, digitalen Bildanalyse, stellen eine vielversprechende Untersuchungsmethode für zukünftige Studien dar. Das digitale Analyseprogramm bot verschiedene Möglichkeiten, die Erfassung der Ergebnisse zu steuern und zu erweitern. Die Ausbaufähigkeit dieser Untersuchungsmethode könnte sogar eine Verbindung aus immunhistochemischen und histologischen Untersuchungen, mit Einbezug des osteophytären Wachstums, ermöglichen.

Die Ergebnisse der Studie zeigten bei der Mehrzahl der Untersuchungen Hinweise für eine positive Wirkung des Implantats als Therapiemethode gegen die Bandscheibendegeneration. Von den 14 Untersuchungen (siehe Tabelle 35 a und b), die Anzeichen für eine Regeneration der Bandscheibe zeigten, waren 9 bei den 12-Monate-Gruppen zu verzeichnen, während nur

ein Ergebnis bei den 12-Monate-Gruppen als nicht beurteilbar befunden wurde. Bei den 3-Monate-Gruppen ist dieses Verhältnis umgekehrt. Sechs der Ergebnisse wurden für nicht beurteilbar befunden, während bei fünf Ergebnissen die These der Studie, dass das SoFi-Implantat eine zufriedenstellende Therapiemethode gegen Bandscheibendegeneration darstellt, bestätigt wurde. Somit kann festgehalten werden, dass durch die Analysen der vorliegenden Studie, das SoFi-System als Therapiemethode gegen die Bandscheibendegeneration für geeignet befunden wurde. Die Frage, ob dieses System Vorteile gegenüber schon etablierten Therapiemethoden wie Dynesys aufweist, bleibt aufgrund von fehlenden Vergleich-Studien allerdings offen.

## 6. Zusammenfassung

Eine Möglichkeit der Behandlung von Bandscheibendegeneration in der Humanmedizin besteht in der dynamischen Stabilisierung des betroffenen Segmentes durch ein Implantat das mittels Pedikelschrauben in der Spongiosa der Wirbelkörper befestigt wird. Diese Methode wird als dynamisch bezeichnet, weil das angebrachte Implantat durch Kunststoffanteile bis zu einem gewissen Grad biegsam ist und so ein Rest Beweglichkeit des Segmentes bewahrt wird. Dieses von der Schweizer Firma Sulzer (heute ZIMMER SPINE<sup>®</sup>, Freiburg, Deutschland) entwickelte System trägt den Namen Dynesys (Dynamic Neutralization System). Auf der gleichen Basis entwickelte die Firma SYNTHES<sup>®</sup> (Solothurn, Schweiz) ein hier getestetes System (SoFi).

Ziel der vorliegenden Studie war es, die Effektivität des dynamischen Implantats als Therapie gegen die Degeneration der Bandscheiben an einem ovinen Degenerationsmodell, mittels immunhistochemischer Methoden, zu untersuchen und statistisch zu beurteilen. Die Hypothese der Studie besagte, dass das experimentelle, posteriore, dynamische Implantat in der Lage ist, die durch eine partielle Nukleotomie zugefügte Degeneration zu stoppen, oder sogar umzukehren und regenerative Prozesse einzuleiten. Dafür wurden 40 weibliche Merinolandschafe in vier Gruppen eingeteilt. Alle Tiere wurden einer partiellen Nukleotomie unterzogen, welche die Bandscheibendegeneration simulieren und herbeiführen sollte. Zwanzig Tiere bekamen dazu durch einen weiteren chirurgischen Eingriff das experimentelle, dynamische System implantiert. Die Hälfte dieser zwanzig Tiere wurde nach 3 Monaten (3-Monate-Implantat-Gruppe), die andere Hälfte nach 12 Monaten (12-Monate-Implantat-Gruppe) euthanasiert und ihre Bandscheiben zwischen den Lendenwirbelkörpern L3 und L4 immunhistochemisch untersucht. Die restlichen 20 Tiere, die kein Implantat bekamen, wurden analog nach 3 (3-Monate-Läsion-Gruppe) beziehungsweise 12 Monaten (12-Monate-Läsion-Gruppe) eingeschläfert und ihre Bandscheiben in gleicher Art und Weise untersucht, um den Vergleich zu den Implantat-Gruppen herstellen zu können. Fünf Tiere gingen aufgrund von Narkosezwischenfällen verloren. Weitere Probenverluste kamen bei der Vorbereitung der zu untersuchenden Proben zustande, so dass am Ende für jede Analyse zwischen 5 und 9 Proben zur Verfügung standen. Um den Vergleich zwischen den Behandlungsgruppen herstellen zu können, wurde an den Proben eine immunhistochemische Markierung von  $\alpha$ -SMA, Keratansulfat, MMP 13, PGP 9.5 und den Kollagentypen I und II durchgeführt. Die immunhistochemisch markierten Proben wurden als digitale Bilder erfasst und eine Pixelanalyse durchgeführt. Die durch die Pixelanalyse gewonnenen Daten wurden statistisch analysiert. Die Daten der verschiedenen Gruppen wurden miteinander verglichen und anschließend durch die statistischen Tests das Signifikanzniveau ermittelt.

Die Immunlokalisation von  $\alpha$ -SMA lieferte bei den 3-Monate-Gruppen kein eindeutiges Ergebnis, da sowohl Indizien für eine Regenerationstendenz bei der Implantat-Gruppe als auch Anzeichen eines gleich hohen Degenerationsgrades beider Behandlungsgruppen zu erkennen waren. Die 12-Monate-Gruppen zeigten dagegen ein Ergebnis, welches eindeutig für eine Regenerationstendenz der Implantat-Gruppe sprach. Ähnliche Ergebnisse wurden bei der Untersuchung auf die Neoinnervation festgestellt. Auch die Metalloproteinasenaktivität war bei der Implantat-Gruppe nach 12 Monaten niedriger als bei der Läsion-Gruppe, dennoch waren die Werte höher als nach 3 Monaten, weshalb man in diesem Falle nicht von Regeneration sprechen kann. Diese Untersuchungen zeigten nach 3 Monaten entweder nicht beurteilbare Ergebnisse, oder Hinweise für eine Verschlechterung bzw. keine Veränderung der Degeneration bei beiden Behandlungsgruppen. Dessen ungeachtet zeigten die 12-Monate-

Gruppen Hinweise einer Regeneration und unterstützten damit die These der Studie. Die Immunlokalisierung von Keratansulfat war bei vergleichbaren Gruppen ähnlich und zeigte damit keinen Hinweis auf eine regenerative Wirkung des Implantates. Die Hauptkollagenarten Kollagen Typ I und Typ II wurden ebenfalls auf ihr Vorkommen und auf das Verhältnis zueinander in den Übergangszonen untersucht. Kollagen Typ I zeigte nach 3 Monaten eine niedrigere Streuung der Werte bei der Implantat-Gruppe, als Zeichen eines niedrigeren Degenerationsgrades als die Läsion-Gruppe. Die Verteilung von Kollagen Typ I innerhalb der Gruppen selbst zeigte jedoch höhere Ansammlungen an Kollagen Typ I in der Nucleus-Zone der Implantat-Gruppe, was wiederum Hinweise für einen höheren Degenerationsgrad liefert. Nach 12 Monaten zeigte aber die Implantat-Gruppe sowohl die niedrigere Streuung der Werte, als auch die physiologischere Verteilung von Kollagen Typ I innerhalb der Bandscheibe, was auf einen niedrigeren Degenerationsgrad zurückgeführt werden kann. Die Untersuchung auf Kollagen Typ II gab als einzige schon nach 3 Monaten Indizien von Regeneration bei der Implantat-Gruppe, sowohl bei der Untersuchung der Gesamtflächen, als auch der einzelnen Zonen und bei der Untersuchung der Endplatten. Diese Resultate wurden auch bei der Mehrzahl der RoIs von den statistischen Tests bestätigt. Nach 12 Monaten lagen aber die Streuungen beider Behandlungsgruppen in diesen drei Analysen auf gleicher Höhe und zeigten somit Hinweise für einen vergleichbar hohen Degenerationsgrad bei beiden Behandlungsgruppen. Der Vergleich beider Kollagentypen in den Übergangszonen zeigte Hinweise für Regeneration der Bandscheiben der Implantat-Gruppen. Allerdings wurde nach 12 Monaten nur bei den rechten Übergangszonen diese regenerative Wirkung des Implantats verzeichnet.

Die vorliegende Studie zeigte bei der Mehrzahl der Untersuchungen Ergebnisse, die auf eine positive Wirkung des experimentellen Implantats SoFi gegen die Degeneration der Bandscheiben hindeuten. Die aus der Sicht der Patienten wichtigsten Parameter sind mit großer Wahrscheinlichkeit die Neoinnervation, welche Studien zufolge in Verbindung mit Schmerzen stehen kann und die auch mit der Neoinnervation einhergehende Angiogenese. Diese beiden Parameter, die anhand der Immunlokalisierung von PGP 9.5 und von  $\alpha$ -SMA untersucht wurden, zeigten befriedigende Resultate bei den 12-Monate-Gruppen, obwohl sie bei den 3-Monate-Gruppen unbefriedigend waren. Aus der Sicht des Therapeuten zählen zu den wichtigsten Parametern, zusätzlich zu den eben erwähnten Kriterien, das Verhältnis und die Verteilung der Hauptkollagentypen I und II in der Bandscheibe. Dieser Parameter gibt Rückschluss darüber, wie sehr die Bandscheibe noch in der Lage ist, ihre Aufgabe zu erfüllen, da diese beiden Moleküle für die Druck- und Zugfestigkeit der Bandscheibe hauptverantwortlich sind. Die Analyse von Kollagen Typ I und II in den Übergangszonen ergab bei nur einer von vier Untersuchungen keine Verbesserung der Degeneration bei der Implantat-Gruppe.

Alles in allem wurde bei der Mehrheit der untersuchten Punkte eine regenerative oder zumindest Degeneration-verlangsamende Wirkung des dynamischen Implantates auf die Degeneration verzeichnet. Diese Ergebnisse wurden aber nur in 2 Fällen (MMP 13 und Kollagen Typ II) durch die statistischen Tests für signifikant befunden. Somit bleiben die große Mehrheit der Ergebnisse dieser Studie auf die deskriptive Ebene beschränkt und kann nur bedingt auf andere Tiergruppen übertragen werden.

## 7. Summary

### In vivo evaluation of an experimental posterior dynamic stabilization system (SoFi-System) in an ovine lumbar degeneration model: an immunohistochemical study.

The dynamic stabilization of a degenerated intervertebral disc is an established method for the treatment of lower back pain in human medicine. This concept consists of an implant attached to the anterior and posterior vertebral body of the damaged intervertebral disc by pedicle screws. The implant contains a soft articular region between two rigid elements allowing the stabilized segment to maintain certain motility which preserves the adjacent intervertebral discs from a fast degeneration. This system is called Dynesys and was developed by the former Swiss company Sulzer which is nowadays part of ZIMMER SPINE®. SYNTHES® developed the SoFi-System using the same principle and combining it with the ClickX-system developed by the same company.

The objective of this in vivo study was to evaluate the effectiveness of the experimental posterior dynamic stabilization system called SoFi (SYNTHES, Solothurn, Switzerland) as therapy against intervertebral disc degeneration in an ovine degeneration model using immunohistochemical analysis. This posterior dynamic system was developed following the same idea behind the Dynesys system. The hypothesis of this study indicates that this experimental posterior dynamic stabilization system is capable of stopping or even revert the intervertebral disc degeneration in this ovine degeneration model. Forty sheep underwent a partial nucleotomy surgery at the intervertebral disc segment L3-L4 simulating an annulus tear. The animals were distributed into four groups. Two of the four groups received additionally the posterior implant on the same segment as the partial nucleotomy. Two groups (one with and one without implant) were euthanized three months after surgery and their spines were extracted to be analyzed by immunohistochemistry. The other two groups were euthanized twelve months after the surgery and underwent the same procedure. The parameters used to evaluate the degeneration in the intervertebral discs were the immunostaining for  $\alpha$ -SMA, Keratan sulfate, MMP 13, PGP 9.5, Collagen type I and Collagen type II and the ratio of both collagen types in the transition zone. After dissection, the L3-L4 segments of the spines were cut with a microtome into 4  $\mu$ m thick samples which passed through immunohistochemical staining. The samples were recorded as digital images, and pixel analysis was performed to obtain the size of the stained area as a result. The obtained data was analyzed using descriptive statistics to make a comparison between the groups. After that, the significance level of the difference between the two coeval groups was accessed to determine the quality of the information obtained from the comparison.

The disposition for angiogenesis was analyzed using an antibody against  $\alpha$ -Smooth Muscle Actin ( $\alpha$ -SMA). Due to the fact that both 3-month groups showed evidence for a higher degeneration level, it was not possible to determine whether the implant worked as expected or not. In the other hand, the 12-month-implant group showed smaller levels of immunopositivity against  $\alpha$ -SMA, indicating a lower grade of degeneration in these animals confirming the effectivity of the implant. The same result was obtained from the analysis for the metalloproteinase activity (MMP 13) and the neoinnervation (PGP 9.5) of the intervertebral disc. Both of these parameters showed no difference between both treatment groups after 3 months, but regeneration signs in the implant group after 12 months. The immunostaining for Keratan sulfate was the only parameter not showing any regeneration signals in the implant group at any time. The main Collagen types of the intervertebral disc

matrix Collagen Type I and Type II were also analyzed, as well as their ratio towards each other in the transition zone between the annulus fibrosus and the nucleus pulposus of the intervertebral disc. The two criteria used to gather the information about the degeneration level using Collagen Type I as reference were the variance of the results and the distribution of the immunopositive areas inside the intervertebral disc, meaning bigger collagen I areas in the nucleus pulposus a higher degeneration level. Collagen Type I delivered an ambiguous result at the 3-month groups, showing signs for a higher as well as for a lower degeneration level in the implant group. After 12 months however, the results revealed evidence of lower degeneration levels on the implant group and showed a satisfactory effect of the implant. The immunostaining for collagen type II revealed at each one of the analysis signs of a regenerative effect of the implant on the disc for the 3-month-groups. These analyses consisted of the immunopositive areas of the whole intervertebral disc, of the zones and of the cartilage endplate. These results were also confirmed by the statistical tests in the whole upper cartilage endplate, the left annulus fibrosus and the central nucleus pulposus RoIs. Both 12-month groups showed very similar results though, indicating that the degeneration level was comparable in both groups. The comparison of the presence of both Collagen types in the transition zones revealed lower degeneration signs for the implant group at both sides 3 months after surgery. After 12 months however, only the right side delivered a similar result, whereas the left side (injury side) showed higher amounts of collagen type I than type II pointing out a higher degeneration level.

The experimental SoFi implant delivered satisfactory results on most of the analyzed parameters of this study. From the patients point of view, the pain is surely the most important parameter for measuring the effectiveness of an intervertebral disc degeneration therapy method. According to the literature, there is a relation between neoinnervation occurrence in the intervertebral disc and the lower back pain. The neoinnervation and the mostly with it associated neoangiogenesis showed a lower degeneration ratio in the implant-groups 12 months after the surgery, even though the results varied between failure of the implant and undetermined 3 months after the surgery. From the therapist's point of view, the collagen ratio is surely one of the most important parameters in addition to the others previously mentioned. Collagen type I and type II are the main responsible for the elasticity and pressure resistance of the intervertebral disc. This means that the analysis of these molecules delivers information on the task fulfilling capability of the intervertebral disc. Only one of four results of this comparison didn't show a satisfactory effect of the implant against degeneration.

Longer term studies are necessary to better assess the effectiveness of this novel implant, in order to better survey the evolution of these analyzed parameters of disc degeneration. Hereby it would be possible to monitor the processes that take place during tissue healing and separate them from those indicating the degeneration. The angiogenesis delivers an example. Three months after surgery it could be possible to find higher angiogenesis in a tissue that has been more effectively repaired, whereas after one year angiogenesis associated with neoinnervation represents a clear sign of tissue degeneration. To completely assess the benefits of using this novel implant, the adjacent segments should also be analyzed in the same way. Hereby it would be possible to evaluate whether this implant really prevents the adjacent segments from degenerating in the way fusion does, or not.

To summarize the results of this study, evidence for a lower degeneration ratio could be registered at most of the test parameters confirming the effectiveness of the implant. However only 2 of them (MMP 13 and Collagen Type II) could be statistically confirmed as significant. Therefore these results are to be considered as descriptive and not to be assigned for other animal populations than the ones used for this experiment.

## 8. Literaturangaben

Adams MA (1995). Mechanical testing of the spine. An appraisal of methodology, results, and conclusions. *Spine (Phila Pa 1976)*. Oct 1; 20(19):2151-6.

Aikawa T, Kanazono S, Yoshigae Y, Sharp NJ, Muñana KR (2007). Vertebral stabilization using positively threaded profile pins and polymethylmetacrylate, with or without laminectomy, for spinal canal stenosis and vertebral instability caused by congenital thoracic vertebral anomalies. *Vet Surg*. Jul; 36(5):432-41.

Akhtar S, Davies JR and Caterson B (2005). Ultrastructural Immunolocalization of  $\alpha$ -Elastin and Keratan Sulfate Proteoglycan in Normal and Scoliotic Lumbar Disc. *Spine* Aug 1; 30(15):1762-9.

Alini M, Eisenstein SM, Ito K, Little C, Kettler AA, Masuda K, Melrose J, Ralphs J, Stokes I, Wilke HJ (2008). Are animal models useful for studying human disc disorders/degeneration? *Eur Spine J*. Jan; 17(1):2-19.

Andersson GB, Mekhail NA, Block JE (2006). Intradiscal electrothermal therapy (IDET). *Spine (Phila Pa 1976)*. May; 20;31(12):1402.

Ardizzone M, Javier RM, Kuntz JL (2006). Ankylosing spondylitis and osteoporosis. *Rev Med Interne*. May; 27(5):392-9.

Baier C, Götz J, Rümmele P, Grifka J, Lüring C (2009). Ochronosis: A rare cause of secondary gonarthrosis. *Z Orthop Unfall*. May-Jun; 14(3):366-8.

Balbín M, Pendás AM, Uría JA, Jiménez MG, Freije JP, López-Otín C (1999). Expression and regulation of Collagenase-3 (MMP-13) in human malignant tumors. *APMIS*. Jan; 107(1):45-53.

Beard HK, Roberts S, O'Brien JP (1981). Immunofluorescent Staining For Collagen And Proteoglycan In Normal And Scoliotic Intervertebral Disc. *J Bone Joint Surg Br*. 63B(4):529-34.

Beard HK, Ryvar R, Brown R & Muir H (1980). Immunochemical localization of collagen types and proteoglycan in pig intervertebral discs. *Immunology* Oct; 41(2):491-501.

Beaver DP, MacPherson GC, Muir P, Johnson KA (1996). Methylmetacrylate and bone screw repair of seventh lumbar vertebral fracture-luxations in dogs. *J Small Anim Pract* Aug; 37(8):381-6.

Bernard H. Guiot, Richard G. Fessler (2000). *Molecular Biology of Degenerative Disc Disease*. *Neurosurgery* Nov; 47(5):1034-40.

Bol G (2004). *Deskriptive Statistik. Lehr und Arbeitsbuch*. Oldenbourg Wissenschaftsverlag GmbH, 6. Auflage

- Boos N, Weissbach S, Rohrbach H, Weiler C, Spratt K, Nehrlich A (2002). Classification of Age-Related Changes in Lumbar Intervertebral Disc. *Spine* Dec 1; 27(23):2631-44.
- Bortz J (2005). *Statistik: Für Human und Sozialwissenschaftler*. Springer Verlag, Berlin, 6. Auflage.
- Bothmann M, Kast E, Boldt GJ, Oberle J (2008). Dynesys fixation for lumbar spine degeneration. *Neurosurg Rev.* Apr; 31(2):189-96.
- Brill T (1992). Prä- und postoperative klinische Untersuchungen am Versuchstier. Dissertation. Fachbereich Veterinärmedizin. Ludwig Maximilian Universität München.
- Brown MF, Hukkanen MV, Mccarthy ID, Redfern DR, Batten JJ, Crock HV, Hughes SP, Polak JM (1997). Sensory and sympathetic innervation of the vertebral endplate in patients with degenerative disc disease. *J Bone Joint Surg Br* Jan; 79(1):147-53.
- Bruecker KA, Seim HB 3<sup>rd</sup>, Withrow SJ (1989). Clinical evaluation of three surgical methods for treatment of caudal cervical spondylomyelopathy of dogs. *Vet Surg* May-Jun; 18(3):197-203.
- Budras KD, Fricke W, Richter R (1996). *Atlas der Anatomie des Hundes: Lehrbuch für Tierärzte und Studierende*. Schlütersche Verlagsanstalt und Druckerei GmbH & Co, Hannover, 5. erweiterte und vervollständigte Auflage.
- Burgeson RE, Nimni ME, (1992). Collagen Types. Molecular Structure and Tissue Distribution. *Clin Orthop Relat Res.* Sep; (282):250-72.
- Cain C, Fraser R (1995). Bony and Vascular Anatomy of the Normal Cervical Spine in the Sheep. *Spine* Apr 1; 20(7):759-65.
- Cavanaugh JM, Kallakuri S, Ozaktay AC (1995). Innervation of the rabbit lumbar intervertebral disc and posterior longitudinal ligament. *Spine* Oct 1; 20(19):2080-5.
- Chin KR, Tomlinson DT, Auerbach JD, Shatsky JB, Deirmengian CA (2008). Success of lumbar microdiscectomy in patients with modic changes and low-back pain: a prospective pilot study. *J Spinal Disord Tech.* Apr; 21(2):139-44.
- Choudhury KR, Yagle KJ, Swanson PE, Krohn KA, Rajendran JG (2010). A Robust Automated Measure of Average Antibody Staining in Immunohistochemistry Images. *J Histochem Cytochem.* Feb; 58(2): 95–107.
- Chubinskaya S, Kawakami M, Rappoport L, Matsumoto T, Migita N, Rueger D (2007). Anti-Catabolic Effect of OP-1 in Chronically Compressed Intervertebral Discs. *J Orthop Res* Apr; 25(4):517-30.
- Consolo M, Amoroso A, Spandidos DA, Mazzarino MC (2009). Matriz metalloproteinases and their inhibitors as markers of inflammation and fibrosis in chronic liver disease (Review). *Int J Mol Med.* Aug; 24(2):143-52

- Cunningham B, Dawson J, Hu N, Kim S, McAfee P, Griffith S (2010). Preclinic evaluation of the Dynesys posterior spinal stabilization system: a nonhuman primate model. *Spine J Sep*; 10(9):775-83.
- Curran RC, Gregory J (1980). Effects of fixation and processing on immunohistochemical demonstration of immunoglobulin in paraffin sections of tonsil and bone marrow. *J Clin Pathol Nov*; 33(11):1047-57.
- Demirkaya O, Cothren RM, Vince DG, Cornhill JF (1999). Automated identification of stained cells in tissue sections using digital image analysis. *Anal Quant Cytol Histol. Apr*; 21(2):93-102.
- Dixon BC, Tomlinson JL, Kraus KH (1996). Modified distraction-stabilization technique using an interbody polymethyl methacrylate plug in dogs with caudal cervical spondylomyelopathy. *J Am Vet Assoc. Jan 1*; 208(1): 61-8.
- Dos Santos J, Fayez N, Narvaes E, Gomes J, Duarte P (2011). Influence of different decalcifying agents on EGF and EGFR immunostaining. *Acta Histochem Jul*; 113(4):484-8.
- Duance VC, Crean JK, Sims TJ, Avery, N, Smith N, Menage J, Eisenstein SM, Roberts S (1998). Changes in collagen cross-linking in degenerative disc disease and scoliosis. *Spine Dec 1*; 23(23):2545-51.
- Eitel F, Seiler H und Schweiberer L (1981). Morphologic examination of animal experiment results: comparison with regeneration of the human bone-structure. I. Research methods (author's transl). *Unfallheilkunde Jun*; 84(6):250-4.
- Ermisch B, Schwechheimer K (1995). Protein gene product (PGP) 9.5 in diagnostic (neuro-) oncology. An immunomorphological study. *Clin Neuropathol. May-Jun*; 14(3):130-6.
- Eyre DR, Muir H (1977). Quantitative analysis of types I & II collagens in the human intervertebral disc at various ages. *Biochimica et Biophysica Acta May 27*; 492(1):29-42.
- Fagan A, Moore R, Roberts BV, Blumbergs P and Fraser R (2003). ISSLS Prize Winner: The Innervation of the Intervertebral Disc: A Quantitative Analysis. *Spine Dec 1* ;28(23):2570-6.
- Fahrmeir, Künstler, Pigeot, Tutz (2007). *Statistik, der Weg zur Datenanalyse. 6. Auflage* Springer-Verlag Berlin-Heidelberg.
- Freemont AJ, Peacock TE, Goupille P, Hoyland JA, O'Brien J, Jayson M (1997). Nerve ingrowth into diseased intervertebral disc in chronic back pain. *Lancet Jul 19*; 350(9072):178-81.
- Fujiwara A, Lim TH, An HS, Tanaka N, Jeon CH, Andersson GB, Haughton VM (2000). The effect of disc degeneration and facet joint osteoarthritis on the segmental flexibility of the lumbar spine. *Spine Dec 1*; 25(23):3036-44.
- Glaser DL, Kaplan FS (1997). Osteoporosis. Definition and clinical presentation. *Spine Dec 15*; 22(24 Suppl):12S-16S.

Goldschlager T, Ghosh P, Zannettino A, Gronthos S, Rosenfeld JV, Itescu S, Jenkin G (2010). Cervical motion preservation using mesenchymal progenitor cells and pentosan polysulfate, a novel chondrogenic agent: preliminary study in an ovine model. *Neurosurg Focus*. Jun; 28(6):E4.

Gries N, Berlemann U, Moore R, Vernon-Roberts B (2000). Early histologic changes in lower lumbar discs and facet joints and their correlation. *Eur Spine J* Feb; 9(1):23-9.

Guder E (2008). In vivo Evaluation eines posterioren dynamischen Stabilisationssystems am lumbalen ovinen Bandscheibendegenerationsmodell –eine histologische Studie. Inauguraldissertation Charité Univ Berlin.

Guder E, Hill S, Kandziora F, Schnake KJ (2009). Partial nucleotomy of the ovine disc as an in vivo model for disc degeneration. *Orthop Unfall*. Jan-Feb; 147(1):52-8.

Guehring T, Omlor G, Lorenz H, Bertram H, Steck E, Richter W, Carstens C, Kroeber M (2005). Stimulation of Gene Expression and Loss of Anular Architecture Caused by Experimental Disc Degeneration -An In Vivo Animal Study. *Spine* Nov 15; 30(22):2510-5.

Guehring T, Omlor G, Lorenz H, Engelleiter K, Richter W, Carstens C, Kroeber M (2006). Disc Distraction Shows Evidence of Regenerative Potential in Degenerated Intervertebral Discs as Evaluated by Protein Expression, Magnetic Resonance Imaging, and Messenger Ribonucleic Acid Expression Analysis. *Spine* Jul 1; 31(15):1658-65.

Hadjipavlou AG, Tzermiadianos MN, Bogduk N, Zindrick MR (2008). The pathophysiology of disc degeneration: a critical review. *J Bone Joint Surg Br*. Oct; 90(10):1261-70.

Hansson T, Roos B, Nachemson A (1980). The bone mineral content and ultimate compressive strength of lumbar vertebrae. *Spine* Jan-Feb; 5(1):46-55.

Harris MD, Moore IE, Steart PV, Weller RO (1990). Protein gene product (PGP) 9.5 as a reliable marker in primitive neuroectodermal tumours –an immunohistochemical study of 21 childhood cases. *Histopathology* Mar; 16(3):271-7.

Hastreiter D, Chao J, Wang Q, Ozuna RM, Spector M (2004). Alpha-smooth muscle actin in pathological human disc nucleus pulposus cells in vivo and in vitro. *Wound Repair Regen*. Jul-Aug; 12(4):430-8.

Hayashi AM, Matera JM, Fonseca Pinto AC (2007). Evaluation of electroacupuncture treatment for thoracolumbar intervertebral disk disease in dogs. *J Am Vet Med Assoc*. Sep 15; 231(6):913-8.

Heary RF (2001). Intradiscal electrothermal annuloplasty: the IDET procedure. *J Spinal Disord*. Aug; 14(4):353-60.

Heineck J, Haupt C, Werner K, Rammelt S, Zwipp H, Wilke HJ (2010). Fracture models in the lumbar sheep spine: a biomechanical investigation. *J Orthop Res*. Jun; 28(6):773-7.

Hojima Y, van der Rest M & Prockop DJ (1985). Type I procollagen carboxyl-terminal proteinase from chick embryo tendons: purification and characterization. *Biol. Chem. J*. Dec 15 ;260(29):15996-6003.

Hoogendoorn R, Doulabi BZ, Huang CL, Wuisman PI, Bank RA, and Helder MN, (2008). Molecular Changes in the Degenerated Goat Intervertebral Disc. *Spine* Jul 15; 33(16):1714-21.

Inman CF, Rees LE, Barker E, Haverson K, Stokes CR, Bailey M (2005). Validation of computer-assisted, pixel-based analysis of multiple-colour immunofluorescence histology. *J Immunol Methods*. Jul; 302(1-2):156-67.

Inoue H (1981). Three Dimensional Architecture of Lumbar Intervertebral Discs. *Spine* Mar-Apr; 6(2):139-46.

Iwashina T, Mochida J, Sakai D, Yamamoto Y, Miyazaki T, Ando K, Hotta T (2006). Feasibility of using a human nucleus pulposus cell line as a cell source in cell transplantation therapy for intervertebral disc degeneration. *Spine* May 15; 31(11):1177-86.

Jackson HC, Winkelmann RK, Bickel WH (1966). Nerve endings in the human lumbar spinal column and related structures. *J Bone Joint Surg Am* Oct; 48(7):1272-81.

Jahng TA, Fu TS, Kim DH (2004). Open versus endoscopic lumbar pedicle screw fixation and posterolateral fusion in a sheep model: a feasibility study. *Spine J*. Sep-Oct; 4(5):519-26.

Jeffcott LB (1979). Back problems in the horse - A look at the past, present and future progress. *Equine vet. J*. Jul; 11(3):129-36.

Jimenez SA, Ala-Kokko L, Prockop DJ, Merryman CF, Shepard N, Dodge GR (1997). Characterization of Human Type II Procollagen and Collagen-Specific Antibodies and Their Application to the Study of Human Type II Collagen Processing and Ultrastructure. *Matrix Biology* Apr; 16(1):29-39.

Johnson WE, Caterson B, Eisenstein SM, Hynds DL, Snow DM, Roberts S (2002). Human intervertebral disc aggrecan inhibits nerve growth in vitro. *Arthritis Rheum* Oct; 46(10):2658-64.

Junqueira LC und Carneiro J (1996). *Histologie*. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, 4. Auflage.

Kääpä E, Xiaoyan Han, Holm S, Peltonen J, Takala T, and Vanharanta H (1995). Collagen Synthesis and Types I, II, IV, and VI Collagens in an Animal Model of Disc Degeneration. *Spine* Jan 1; 20(1):59-67.

Kandziora F, Pflugmacher R, Schafer J, Born C, Duda G, Haas NP und Mittlmeier T (2001). Biomechanical comparison of cervical spine interbody fusion cages. *Spine J* Sep 1; 26(17):1850-7.

Kandziora F, Pflugmacher R, Scholz M, Eindorf T, Schnake KJ, Haas NP (2004). Bioabsorbable interbody cages in a sheep cervical spine fusion model. *Spine* Sep 1; 29(17):1845-56.

Kandziora F, Pflugmacher R, Scholz M, Schnake K, Lucke M, Schroder, Mittlmeier T (2001). Comparison between sheep and human cervical spines: an anatomic, radiographic, bone mineral density, and biomechanical study. *Spine* May 1; 26(9):1028-37.

Kettler A, Liakos L, Haegele B, Wilke HJ (2007). Are the spines of calf, pig and sheep suitable models for pre-clinical implant tests? *Eur Spine J.* Dec; 16(12):2186-92.

Kloth DS, Fenton DS, Andersson GB, Block JE (2008). Intradiscal electrothermal therapy (IDET) for the treatment of discogenic low back pain: patient selection and indications for use. *Pain Physician.* Sep-Oct; 11(5):659-68.

Konttinen YT, Grönblad M, Antti-Poika I, Seitsalo S, Santavirta S, Hukkanen M, Polak JM (1990). Neuroimmunohistochemical analysis of peridiscal nociceptive neural elements. *Spine* May; 15(5):383-6.

Koch (2005). Histologische Evaluation eines bioaktiven Implantats zur Spondylodese der Halswirbelsäule: eine experimentelle Studie am Schaf. Inaugural-Dissertation, Journal-Nr 2901.

Krämer J, Hasenbring M, Theodoridis T, Wilke HJ (2006). Bandscheibenbedingte Erkrankungen: Ursachen, Diagnose, Behandlung, Vorbeugung, Begutachtung. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 5. Auflage.

Kroeber M, Unglaub F, Guehring T, Nehrlich A, Hadi T, Lotz J, Carstens C (2005). Effects of controlled dynamic disc distraction on degenerated intervertebral discs: an in vivo study on the rabbit lumbar spine model. *Spine* Jan 15; 30(2):181-7.

Kuiper JJ, Verbeek JH, Frings-Dresen MH, Ikkink AJ (1998). Keratan Sulfate as a Potential Biomarker of Loading of the Intervertebral Disc. *Spine* Mar 15; 23(6):657-63.

Le Maitre CL, Freemont AJ, Hoyland JA (2004). Localization of degradative enzymes and their inhibitors in the degenerate human intervertebral disc. *Journal of Pathology* Sep; 204(1):47-54.

Lee SE, Park SB, Jahng TA, Chung CK, Kim HJ (2008). Clinical experience of the dynamic stabilization system for the degenerative spine disease. *J Korean Neurosurg Soc.* May; 43(5):221-6.

Leeman MF, Curran S and Murray GI (2002). The Structure, Regulation and Function of Human Matrix Metalloproteinase-13. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 37(3):149-166.

Li SH, Li HZ, Zhao JR (2008). Clinical comparison between micro-endoscopic discectomy (MED) and open discectomy for treatment of lumbar disc herniation. *Zhongguo Gu Shang* May; 21(5):349-51.

Liang Q, Xi Z, Bian Q, Cui X, Li C, Hou W, Shi Q, Wang Y (2010). Herb Formula "Fufangqishe-Pill" Prevents Upright Posture-Induced Intervertebral Disc Degeneration at the Lumbar in Rats. *J Pharmacol Sci* 113(1):23-31.

Lienau J, Schell H, Duda GN, Seebeck P, Muchow S, Bail HJ (2005). Initial vascularization and tissue differentiation are influenced by fixation stability. *J Orthop Res.* May; 23(3):639-45.

Lipson SJ, and Muir H, (1981). Proteoglycans in Experimental Intervertebral Disc Degeneration. *Spine* May-Jun; 6(3):194-210.

Loguidice VA, Johnson RG, Guyer RD, Stith WJ, Ohnmeiss DD, Hochschuler SH, Rashbaum (1988). Anterior lumbar interbody fusion. *RF. Spine* Mar; 13(3):366-9.

Loeffler K (2002). *Anatomie und Physiologie der Haustiere*. Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart, 10. aktualisierte und korrigierte Auflage.

Loughlin PM, Cooke TG, George WD, Gray AJ, Stott DI, Going JJ (2007). Quantifying tumour-infiltrating lymphocyte subsets: a practical immuno-histochemical method. *J Immunol Methods*. Apr 10; 321(1-2):32-40.

Luttgen P (1993). Canine Intervertebral Disc Disease. Art prep for The Dachshund Club of America, Inc.

Lyons G, Eisenstein SM, Sweet MB (1981). Biochemical changes in intervertebral disc degeneration. *Biochimica et Biophysica Acta* Apr 3; 673(4):443-53.

Manek S, Terenghi G, Shurey C, Nishikawa H, Green CJ, Polak JM (1993). Neovascularisation precedes neural changes in the rat groin skin flap following denervation: an immunohistochemical study. *Br J Plast Surg*. Jan; 46(1):48-55.

Maroudas A (1975). Biophysical chemistry of cartilaginous tissues with special reference to solute and fluid transport. *Biorheology* Jun; 12(3-4):233-48.

Maroudas A, Muir H, Wingham J (1969). The correlation of fixed negative charge with glycosaminoglycan content of human articular cartilage. *Biochem Biophys Acta* May 6; 177(3):492-500.

Matkowskyj KA, Schonfeld D, Benya RV (2000). Quantitative immunohistochemistry by measuring cumulative signal strength using commercially available software photoshop and matlab. *J Histochem Cytochem*. Feb; 48(2):303-12.

McDonnell P, McHugh PE, O'Mahoney D (2007). Vertebral osteoporosis and trabecular bone quality. *Ann Biomed Eng*. Feb; 35(2):170-89.

Meier-Ruge W, Bruder E (2008). Current Concepts of Enzyme Histochemistry in modern Pathology. *Pathobiology* Jun; 75(4):233-43.

Meisel HJ, Ganey T, Hutton WC, Libera J, Minkus Y, Alasevic O (2006). Clinical experience in cell-based therapeutics: intervention and outcome. *Eur Spine J*. Aug; 15 Suppl 3:S397-405.

Meisel HJ, Siodla V, Ganey T, Minkus Y, Hutton WC, Alasevic OJ (2007). Clinical experience in cell-based therapeutics: disc chondrocyte transplantation A treatment for degenerated or damaged intervertebral disc. *Biomol Eng*. Feb; 24(1):5-21.

Melrose J, Smith S, Little CB, Kitson J, Hwa S, and Ghosh P (2002). Spatial and temporal localization of Transforming Growth Factor- $\beta$ , Fibroblast Growth Factor-2, and Osteonectin, and identification of cells expressing  $\alpha$ -Smooth Muscle Actin in the injured Anulus fibrosus: implications for extracellular matrix repair. *Spine* Aug 15; 27(16):1756-64.

- Melrose J, Ghosh P, Taylor TK (2001). A comparative analysis of the differential spatial and temporal distributios of the large (aggrecan, versican) and the small (decorin, biglycan, fibromodulin) proteoglycans of the intervertebral disc. *J Anat. Jan*; 198(Pt 1):3-15.
- Melrose J, Roberts S, Smith S, Menage J, Ghosh P (2002). Increased nerve and blood vessel ingrowth associated with proteoglycan depletion in an ovine anular lesion model of experimental disc degeneration. *Spine Jun 15*; 27(12):1278-85.
- Nerlich AG, Boos N, Wiest I, Aebi M (1998). Immunolocalization of major interstitial collagen types in human lumbar intervertebral discs of various ages. *Virchows Arch Jan*; 432(1):67-76.
- Nickel R, Schummer A, und Seiferle E (1992). *Lehrbuch der Anatomie der Haustiere. Band 1 Bewegungsapparat.* Berlin, Hamburg, Verlag Paul Parey.
- Ogon M, Maurer H, Wimmer C, Landauer F, Sterzinger W, Krismer M. (1997). Minimally invasive approach and surgical procedures in the lumbar spine. *Orthopade. Jun*: 26(6):553-61.
- Ohshima H, Urban JPG (1992). The effect of lactate and pH on proteoglycan and protein synthesis rates in the intervertebral disc. *Spine Sep*; 17(9):1079-82.
- Omlor GW, Lorenz H, Engelleiter K, Richter W, Carstens C, Kroeber MW, Guehring T (2006). Changes in gene expression and protein distribution at different stages of mechanically induced disc degeneration –an in vivo study on the New Zealand white rabbit. *J Orthop Res. Mar*; 24(3):385-92.
- Palmgren T, Grönblad M, Virri J, Kääpä E, Karaharju E (1999). An immunohistochemical study of nerve structures in the Anulus fibrosus of human normal lumbar intervertebral discs. *Spine Oct 15*; 24(20):2075-9.
- Pearce RH, Grimmer BJ, Adams ME (1987). Degeneration and the Chemical Composition of the Human Lumbar Intervertebral Disc. *Journal of Orthopaedic Research* 5(2):198-205.
- Perez-Cruet MJ, Foley KT, Isaacs RE, Rice-Wyllie L, Wellington R, Smith MM, Fessler RG (2002). Microendoscopic lumbar discectomy: technical note. *Neurosurgery. Nov*; 51(5 Suppl):S129-36.
- Piccinini M, Merighi A, Bruno R, Cascio P, Curto M, Mioletti S, Cerutti C and Rinaudo M (1996). Affinity purification and characterization of protein gene product 9.5 (PGP9.5) from retina. *Biochemistry J Sep 1*; 318(Pt 2):711-6.
- Poma R, Parent JM, Holmberg DL, Partlow GD, Monteith G, Sylvestre AM (2002). Correlation between severity of clinical signs and motor evoked potentials after transcranial magnetic stimulation in large-breed dogs with cervical spinal cord disease. *J Am Vet Med Assoc. Jul 1*; 221(1):60-4.
- Putzier M, Schneider SV, Funk JF, Tohtz SW, Perka C (2005). The surgical treatment of the lumbar disc prolapse: nucleotomy with additional transpedicular dynamic stabilization versus nucleotomy alone. *Spine Mar 1*; 30(5):E109-14.

- Raj PP (2008). Intervertebral disc: anatomy, physiology, pathophysiology, treatment. *Pain Pract.* Mar (8)1:18-44.
- Rajeshwar PV and Hansch C (2007). Matrix metalloproteinases (MMPs). Chemical-biological functions and (Q)SARs. *Bioorg Med Chem.* Mar 15; 15(6):2223-68.
- Rapoff AJ, Johnson WM, Handel J und Woo R (2003). Interbody allograft in a skeletally immature spine model. *Eur Spine J Jun*; 12(3):307-13.
- Rathke FW (1954). Generalized retardation of vertebrospinal ossification associated with a generalized disorder of cartilage ossification. *Arch Orthop Unfallchir.* 46(4):415-25.
- Rehart S, Kerschbaumer F, Braun J, Sieper J (2007). Modern treatment of ankylosing spondylitis. *Orthopade Nov*; 36(11):1067-78.
- Reid JE, Meakin JR, Robins SP, Skakle JMS, Hukins DWL (2002). Sheep lumbar intervertebral discs as models for human discs. *Clinical Biomechanics May*; 17(4):312-4.
- Ricart O, Serwier JM (2008). Dynamic stabilisation and compression without fusion using Dynesys for the treatment of degenerative lumbar spondylolisthesis: a prospective series of 25 cases. *Rev Chir Orthop Reparatrice Appar Mot.* Nov; 94(7):619-27.
- Roberts S, Menage J, Duance V, Wotton S, and Ayad S (1991). Collagen Types Around the Cells of the Intervertebral Disc and Cartilage End Plate: An Immunolocalization Study. 1991 Volvo Award in Basic Sciences Sep; 16(9):1030-8.
- Roberts S, McCall IW, Menage J, Haddaway MJ, Eisenstein SM (1997). Does the thickness of the vertebral subchondral bone reflect the composition of the intervertebral disc? *Eur Spine J.* 6(6):385-9.
- Robinson D, Mirovsky Y, Halperin N, Evron Z, Nevo Z (1998). Changes in Proteoglycans of Intervertebral Disc in Diabetic Patients: A Possible Cause of Increased Back Pain. *Spine Apr 15*; 23(8):849-56.
- Rogoll H, Särchen N, Krause P, Sehmisch K (1990). Acute tetraparesis in cervical spinal stenosis caused by chondrodystrophy. *Psychiatr Neurol Med Psychol (Leipzig).* Jul; 42(7):430-4.
- Roholl PJM, Elbers HRJ, Prinsen I, Claessens JAJ, van Unnik JAM (1990). Distribution of actinisoforms in sarcomas: an immunohistochemical study. *Hum Pathol Dec*; 21(12):1269-74.
- Roughley PJ, (2004). Biology of Intervertebral Disc Aging and Degeneration: involvement of the extracellular matrix. *Spine Dec 1*; 29(23):2691-9.
- Roughley PJ, Alini M and Antoniou J (2002). The role of proteoglycans in aging, degeneration and repair of the intervertebral disc. *Biochem Soc. Trans.* Nov; 30(Pt 6):869-74.
- Roughley PJ, Martens D, Rantakokko J, Alini M, Mwale F and Antoniou J (2006). The Involvement Of Aggrecan Polymorphism In Degeneration Of Human Intervertebral Disc And Articular Cartilage. *European Cells and Materials Jan 18*;11:1-7.

Roughley PJ, Melching LI, Heathfield TF, Pearce RH, Mort JS (2006). The structure and degradation of aggrecan in human intervertebral disc. *Eur Spine J* Aug; 15 Suppl 3:S326-32.

Sato M, Kikuchi T, Asazuma T, Yamada H, Maeda H, Fujikawa K (2001). Glycosaminoglycan accumulation in primary culture of rabbit intervertebral disc cells. *Spine (Phila Pa 1976)* Dec 15; 26(24):2653-60.

Schenk B, Brouwer PA, Peul WC and van Buchem MA (2006). Percutaneous Laser Disk Decompression: A Review of the Literature. *American Journal of Neuroradiology*, Jan; 27(1):232-5.

Scheuermann HW (1921). Kyphosis dorsalis juvenilis. *J Orthop Chir. Heilgymnastik und Massage, Stuttgart*, 41:305-17.

Schlegel JD, Smith JA, Schlessener RL (1996). Lumbar motion segment pathology adjacent to thoracolumbar, lumbar and lumbosacral fusions. *Spine* Apr 15; 21(8):970-81.

Schmorl G und Junghanns H (1968). Die gesunde und die kranke Wirbelsäule in Röntgenbild und Klinik. Thieme Verlag, Stuttgart, 5.Auflage.

Schneider TO, Mueller SM, Shortkroff S, Spector M (1999). Expression of  $\alpha$ -Smooth Muscle Actin in Canine Intervertebral Disc Cells *in Situ* and in Collagen-Glycosaminoglycan Matrices *in Vitro*. *Journal of Orthopaedic Research* Mar; 17(2):192-9.

Schwarzenbach O, Berlemann U, Stoll TM, Dubois G (2005). Posterior dynamic stabilization systems: DYNESYS. *Orthop Clin North Am.* Jul; 36(3):363-72.

Scott JE, Stockwell RA, Balduini C, De Luca G (1989). Keratan sulphate: a functional substitute for chondroitin sulphate in O2 deficient tissues? *Pathol Biol (Paris)*. Jun; 37(6):742-5.

Seiferle E und Freiwein J (1992). Aktiver Bewegungsapparat, Muskelsystem, Myologia in: R. NICKEL, A. SCHUMMER, u. E. SEIFERLE (Hrsg.): *Lehrbuch der Anatomie der Haustiere* I. 6.Auflage, Verlag Parey, Berlin, Hamburg.

Sheng S, Wang X, Xu H, Zhu G, Zhou Y (2010). Anatomy of large animal spines and its comparison to the human spine: a systematic review. *Eur Spine J* Jan; 19(1):46-56.

Shinmei M, Masuda K, Kikuchi T, Shimomura Y (1989). Interleukin-1, tumour necrosis factor, and interleukin-6 as mediators of cartilage destruction. *Semin Arthritis Rheum* Feb 18(3 Suppl 1):27-32.

Siegel S (1985). *Nichtparametrische Statistische Methoden*. Fachbuchhandlung für Psychologie, Eschborn bei Frankfurt am Main, 2. Ausgabe.

Singh K, Koichi MK, An HS (2005). Animal models for human disc degeneration. *Spine J.* Nov-Dec; 5(6 Suppl): 267S-279S.

Singh V, Manchikanti L, Benyamin RM, Helm S, Hirsch JA (2009). Percutaneous lumbar laser disc decompression: a systematic review of current evidence. *Pain Physician* May-Jun; 12(3):573-88.

Skalli O, Ropraz P, Trzeciak A, Benzonana G, Gillesen D, Gabbian G (1986). A monoclonal antibody against  $\alpha$ -smooth muscle actin: a new probe for smooth muscle differentiation. *J Cell Biol Dec*; 103(6 Pt 2):2787-96.

Slipjer EJ (1946): Comparative biologic-anatomical investigation on the vertebral column and spinal musculature of mammals. *Proc. K. med. Akad. vet. Verh.* 47, 1-128.

Smit T (2002). The use of a quadruped as an in vivo model for the study of the spine – biomechanical considerations. *Eur Spine J Apr*; 11(2):137-44.

Sterna J, Burzykowski T (2008). Assessment of the usefulness of the fenestration method in case of disc extrusion in the cervical and thoraco-lumbar spine in chondrodystrophic dogs. *Pol J Vet Sci.* 11(1):55-62.

Stoll TM, Dubois G, Schwarzenbach O (2002). The dynamic neutralization system for the spine: a multi-center study of a novel non-fusion system. *Eur Spine J Oct*; 11 Suppl 2:170-8.

Sun ZM, Zhao D, Deng SC, Zhao HY. (2009). Surgical options and result analyses in adult degenerative lumbar scoliosis. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi.* May 5; 89(17):1166-70.

Teitelbaum GP, Shaolian S, McDougall CG, Preul MC, Crawford NR, Sonntag VK (2004). New percutaneously inserted spinal fixation system. *Spine Mar 15*; 29(6):703-9.

Trojanowski M (2009). In vivo Evaluation eines posterioren dynamischen Stabilisationssystems am lumbalen ovinen Bandscheibendegenerationsmodell -eine biomechanische Studie. Inauguraldissertation Charité Univ Berlin.

Tofuku K, Koga H, Yone K, Komiya S (2007). Continuous irrigation in pyogenic spondylitis accompanied by iliopsoas abscess. *Spine Jun*; 15:32(14):E382-7.

Unglaub F, Guehring T, Omlor G, Lorenz H, Carstens C, Kroeber M (2006). Kontrollierte Distraction als therapeutische Option bei mittelgradiger Bandscheibendegeneration –Eine In-vivo-Studie am Kaninchen-Wirbelsäulenmodell. *Z Orthop Jan-Feb*; 144(1):68-73.

Urban JPG (2002). The role of the physicochemical environment in determining disc cell behaviour. *Biochemical Society Transactions Nov*; 30(Pt 6):858-64.

Urban JPG, Roberts S (2003). Degeneration of the intervertebral disc. Review; *Arthritis Research and Therapy*, 5(3):120-30.

Vaga S, Brayda-Bruno M, Perona F, Fornari M, Raimondi MT, Petrucci M, Grava G, Costa F, Caiani EG, Lamartina C (2009). Molecular MR imaging for the evaluation of the effect of dynamic stabilization on lumbar intervertebral discs. *Eur Spine J. Jun*; 18 Suppl 1:40-8.

Voss K, Montavon PM (2004). Tension band stabilization of fractures and luxations of the thoracolumbar vertebrae in dogs and cats: 38 cases (1993-2002). *J Am Vet Med Assoc.* Jul 1; 225(1):78-83.

Voss K, Steffen F, Montavon PM (2006). Use of the ComPact UniLock System for ventral stabilization procedures of the cervical spine: a retrospective study. *Vet Comp Orthop Traumatol.* 19(1): 21-8.

- Watanabe J, Asaka Y, Kanamura S (1996). Relationship between immunostaining intensity and antigen content in sections. *J Histochem Cytochem.* Dec; 44(12):1451-8.
- Welch WC, Cheng BC, Awad TE, Davis R, Maxwell JH, Delamarter R, Wingate JK, Sherman J, Macenski MM (2007). Clinical outcomes of the Dynesys dynamic neutralization system: 1-year preliminary results. *Neurosurg Focus.* Dec 15; 22(1):E8.
- Wheater PR, Burkitt HG, Daniels VG (1987). *Funktionelle Histologie. Lehrbuch und Atlas (Gebundene Ausgabe).* Elsevier, München, Auflage: 2. neubearb. u. erw. A.
- Wilke HK, Kettler A, Claes LE (1997). Are sheep spines a valid biomechanical model for human spines? *Spine* Oct 15; 22(20):2365-74.
- Wilke HJ, Krischak S, Claes L (1996). Biomechanical comparison of calf and human spines. *J Orthop Res.* May; 14(3):500-3.
- Wilkinson KD (1997). Ubiquitin-dependent signaling: the role of ubiquitination in the response of cells to their environment. *FASEB J.* Dec; 11(14):1245-56.
- Willenegger S, Friess AE, Lang J, Stoffel MH (2005). Immunohistochemical Demonstration of Lumbar Intervertebral Disc Innervation in the Dog. *Anat. Histol. Embryol.* Apr; 34(2):123-8.
- Würgler-Hauri CC, Kalbarczyk A, Wiesli M, Landolt H, Fandino J (2008). Dynamic neutralization of the lumbar spine after microsurgical decompression in acquired lumbar spinal stenosis and segmental instability. *Spine* Feb 1; 33(3):E66-72.
- Zhang Y, Sun Z, Liu J, Wang S, Ren F, Guo X (2009). Features of intervertebral disc degeneration in rat's aging process. *J Zhejiang Univ Sci B* Jul; 10(7):522-7.

## Anhang

Legende:

<b>LO:</b>	Links oben
<b>LM:</b>	Links Mitte
<b>LU:</b>	Links unten
<b>MO:</b>	Mitte oben
<b>MM:</b>	Mitte Mitte
<b>MU:</b>	Mitte unten
<b>RO:</b>	Rechts oben
<b>RM:</b>	Rechts Mitte
<b>RU:</b>	Rechts unten
<b>Links:</b>	Linker Anulus fibrosus
<b>Mitte:</b>	Nucleus pulposus
<b>Rechts:</b>	Rechter Anulus fibrosus

Ergebnisse für  $\alpha$ -SMA beider 3-Monate-Gruppen:

Tiernummer	OL/[mm <sup>2</sup> ]	ML/[mm <sup>2</sup> ]	UL/[mm <sup>2</sup> ]	OM/[mm <sup>2</sup> ]	MM/[mm <sup>2</sup> ]	UM/[mm <sup>2</sup> ]	OR/[mm <sup>2</sup> ]	MR/[mm <sup>2</sup> ]	UR/[mm <sup>2</sup> ]
S72	0	0,03	0,01	0	0	0	0	0,02	0
S73	0,02	0,03	0	0	0	0	0	0	0
S74	0	0,01	0	0	0	0	0	0	0
S75	0,01	0,02	0	0	0	0	0	0,01	0
S76	0	0	0	0	0	0	0	0,01	0
S77	0	0,05	0	0	0	0	0	0,01	0,01
S78	0	0,03	0	0	0	0	0	0,01	0
S80	0,01	0,19	0,01	0	0	0	0	0,04	0
S82	0	0,04	0,01	0	0,02	0	0	0,01	0
S83	0	0	0	0	0	0	0	0,01	0
S84	0	0	0	0	0	0	0	0	0
S85	0	0	0	0	0	0	0	0	0
S91	0	0,03	0	0	0	0	0	0,08	0,02
S92	0,01	0,14	0	0	0	0	0	0	0
S93	0	0,01	0	0	0	0	0	0,01	0
S95	0	0	0	0	0	0	0	0	0
S96	0	0,08	0	0	0	0	0,02	0,03	0
S98	0	0,18	0,02	0	0	0	0	0	0

Ergebnisse für  $\alpha$ -SMA beider 12-Monate-Gruppen:

Tiernummer	OL/[mm <sup>2</sup> ]	ML/[mm <sup>2</sup> ]	UL/[mm <sup>2</sup> ]	OM/[mm <sup>2</sup> ]	MM/[mm <sup>2</sup> ]	UM/[mm <sup>2</sup> ]	OR/[mm <sup>2</sup> ]	MR/[mm <sup>2</sup> ]	UR/[mm <sup>2</sup> ]
S52	0	0	0	0	0	0	0	0,17	0
S54	0,06	0,18	0	0	0,05	0	0,07	0,29	0,04
S55	0,08	0,65	0,07	0,03	0,07	0,01	0,02	0,47	0,06
S56	0	0,26	0,01	0	0	0	0	0,01	0
S57	0	0,39	0	0	0	0	0	0,01	0
S58	0	0	0	0	0	0	0	0	0
S59	0,01	0,04	0	0,1	0,14	0,04	0,01	1,19	0
S60	0	0,04	0,02	0	0	0	0,01	0,04	0,02
S62	0	0,02	0	0	0	0	0	0,01	0
S63	0,01	0,03	0	0	0,01	0	0,02	0,05	0,01
S66	0	0,04	0,01	0	0	0	0	0,02	0
S67	0,03	0,44	0	0	0	0	0	0,02	0
S69	0	0	0	0	0	0	0	0	0
S70	0,01	0,05	0	0	0	0	0	0,01	0

## Ergebnisse für Keratansulfat beider 3-Monate-Gruppen:

Tiernummer	OL/[mm <sup>2</sup> ]	ML/[mm <sup>2</sup> ]	UL/[mm <sup>2</sup> ]	OM/[mm <sup>2</sup> ]	MM/[mm <sup>2</sup> ]	UM/[mm <sup>2</sup> ]	OR/[mm <sup>2</sup> ]	MR/[mm <sup>2</sup> ]	UR/[mm <sup>2</sup> ]
S72	1,09	5,62	0,82	0,65	3,44	0,32	1,13	4,02	0,26
S73	1,41	9,82	0,65	1,87	10,76	1,42	0,92	6,29	0,85
S74	0,46	5,79	1,34	1,63	8,91	1,94	0,49	4,91	1,01
S75	1,67	8,11	0,9	1,85	9,35	1,6	1,85	9,07	1,54
S76	1,87	14,08	1,47	2,79	17,81	2,69	3,25	17,69	2,47
S77	1,86	10,52	1,3	1,67	11,08	2,26	1,09	5,81	0,81
S78	1,33	7,29	0,98	1,2	13,12	2,62	2,04	18,59	2,2
S80	0,38	2,58	0,38	1,89	6,47	0,85	2,47	8,73	0,96
S82	0,6	2,81	0,37	0,14	1,44	0,13	0,39	2,13	0,32
S83	1,62	8,03	2,2	3,01	19,84	2,51	2,82	16,76	1,91
S84	0,33	1,77	0,47	0,3	1,61	0,6	0,3	1,88	0,62
S85	1,04	2,92	0,43	0,7	1,62	0,61	0,4	1,57	0,39
S91	2,33	15,21	2,33	1,45	6,95	0,73	0,88	4,29	0,89
S93	2,39	13,14	1,63	1,48	8,39	0,82	2,32	11,93	1,5
S95	0,52	3,12	1,05	0,59	4,18	1,29	0,92	4,79	1,08
S96	0,39	2,7	0,27	0,22	2,2	0,59	0,19	1,13	0,55
S98	0,98	3,73	0,43	2,82	10,65	1,35	1,79	8,29	0,81

Ergebnisse für Keratansulfat beider 12-Monate-Gruppen:

Tiernummer	OL/[mm <sup>2</sup> ]	ML/[mm <sup>2</sup> ]	UL/[mm <sup>2</sup> ]	OM/[mm <sup>2</sup> ]	MM/[mm <sup>2</sup> ]	UM/[mm <sup>2</sup> ]	OR/[mm <sup>2</sup> ]	MR/[mm <sup>2</sup> ]	UR/[mm <sup>2</sup> ]
S52	0,89	7,69	0,45	2,59	17,74	1,87	1,32	10,13	1,82
S53	2,41	17,11	2,33	2,62	18,42	2,64	2,14	18,28	2,3
S54	2,35	15,89	2,15	2,18	8,89	2,31	2,48	18,39	2,04
S55	2,83	15,76	2,99	3,47	15,15	3,72	3,19	19,53	2,73
S56	2,63	20,42	2,21	2,89	17,05	3,27	2,07	10,09	2,18
S58	2,8	14,18	2,59	2,18	11,8	2,76	2,23	14,19	2,23
S59	1,83	13,39	2,07	2,78	10,83	1,71	1,85	14,64	2,82
S60	0,84	11,06	1,55	2,25	14,84	3,05	0,5	8,56	1,92
S62	0,99	2,99	1,06	0,82	2,2	0,62	1,55	4,96	0,84
S63	2,64	11,67	2,07	3,45	18,15	3,13	2,81	13,84	2,36
S66	2,84	19,72	2,7	2,97	20,21	3,02	2,97	18,18	2,73
S67	0,87	9,74	0,91	2,21	4,14	0,62	2,31	10,8	1,69
S69	2,35	10,65	1,77	1,73	11,99	2,64	1,93	16,67	1,98
S70	1,88	9,98	1,15	2,32	10,49	1,62	2,52	12,96	1,69

## Ergebnisse für MMP 13 beider 3-Monate-Gruppen:

Tiernummer	OL/[mm <sup>2</sup> ]	ML/[mm <sup>2</sup> ]	UL/[mm <sup>2</sup> ]	OM/[mm <sup>2</sup> ]	MM/[mm <sup>2</sup> ]	UM/[mm <sup>2</sup> ]	OR/[mm <sup>2</sup> ]	MR/[mm <sup>2</sup> ]	UR/[mm <sup>2</sup> ]
S72	0,04	0,27	0,03	0	0	0	0	0,02	0
S73	0,02	0,07	0	0	0,01	0	0	0,01	0
S74	0,02	0,09	0,02	0	0,03	0,01	0,04	0,4	0,04
S75	0,05	0,33	0,1	0	0,06	0,02	0,02	0,12	0,02
S76	0,03	0,05	0	0,03	0,03	0	0,01	0,05	0
S77	0,02	0,15	0,04	0,02	0,05	0,01	0,01	0,14	0,01
S78	0,01	0,41	0	0	0	0	0	0	0
S80	0,03	0,11	0,01	0	0	0	0	0,05	0
S82	0,49	1,8	0,14	0,78	0,87	0,01	0,35	0,43	0,03
S83	0,06	0,62	0,09	0,02	0,05	0,02	0,03	0,15	0,04
S84	0,11	0,25	0,08	0,02	0,03	0	0	0,02	0
S85	0,03	1,45	0,03	0,04	0,16	0,02	0,03	0,15	0,01
S96	0,05	0,82	0,26	0,02	0,07	0,01	0,1	0,42	0,05
S98	0,01	0,19	0,03	0,01	0,04	0,02	0,02	0,03	0

Ergebnisse für MMP 13 beider 12-Monate-Gruppen:

Tiernummer	OL/[mm <sup>2</sup> ]	ML/[mm <sup>2</sup> ]	UL/[mm <sup>2</sup> ]	OM/[mm <sup>2</sup> ]	MM/[mm <sup>2</sup> ]	UM/[mm <sup>2</sup> ]	OR/[mm <sup>2</sup> ]	MR/[mm <sup>2</sup> ]	UR/[mm <sup>2</sup> ]
S52	0,49	4,03	0,27	0,55	8,54	1,21	0,77	5,41	1,09
S53	1,52	3,81	0,35	0,33	0,67	0,11	0,36	1,13	0,17
S54	1,19	3,75	0,59	0,5	0,92	0,11	0,33	0,77	0,13
S55	0,26	2,37	0,35	0,16	0,34	0,04	0,26	1,86	0,28
S56	0,05	0,73	0,34	0,16	0,48	0,08	0,34	0,96	0,39
S57	0,18	1,98	0,24	0,12	0,55	0,17	0,2	0,48	0,09
S58	0,28	1,28	0,15	0,23	0,55	0,12	0,17	1,35	0,16
S59	0,22	0,66	0,07	0,19	0,21	0	0,1	0,56	0,12
S60	0,12	1,43	0,07	0,21	0,69	0,28	0,22	0,87	0,1
S62	0,11	0,74	0,18	0,1	0,22	0,06	0,04	0,23	0,04
S63	0,12	1,19	0,44	0,13	1,33	0,27	0,3	1,08	0,21
S66	0,14	0,71	0,03	0,16	0,22	0,01	0,05	0,1	0,01
S67	0,09	10,33	0,3	0,02	0,77	0,2	0,03	0,23	0,02
S69	1,68	4,06	0,29	0,15	0,22	0,03	0,03	0,23	0,06
S70	0,39	3,91	0,16	0,01	0,03	0,01	0,01	0,07	0

Ergebnisse für PGP 9.5 beider 3-Monate-Gruppen:

Tiernummer	OL/[mm <sup>2</sup> ]	ML/[mm <sup>2</sup> ]	UL/[mm <sup>2</sup> ]	OM/[mm <sup>2</sup> ]	MM/[mm <sup>2</sup> ]	UM/[mm <sup>2</sup> ]	OR/[mm <sup>2</sup> ]	MR/[mm <sup>2</sup> ]	UR/[mm <sup>2</sup> ]
S72	0	0	0	0	0	0	0	0	0
S73	0	0	0	0	0	0	0,01	0,02	0
S74	0	0	0	0	0	0	0	0	0
S75	0,77	0,78	0	0,44	0,45	0	0,09	0,14	0
S76	0	0	0	0	0	0	0	0	0
S77	0	0	0	0	0	0	0	0	0
S78	0	0	0	0	0	0	0	0	0
S80	0	0	0	0,05	0,05	0	0	0	0
S82	0	0,72	0,72	0	0,23	0,23	0,1	0,1	0
S83	0	0	0	0	0	0	0	0	0
S84	0	0	0	0	0	0	0	0	0
S85	1,73	1,75	0	0,57	0,62	0	0,57	0,73	0
S92	0,05	0,05	0	1,29	1,32	0	0	0	0
S95	0	0	0	0	0	0	0	0	0
S96	0	0	0	0	0	0	0	0	0
S98	0,47	0,48	0	0,44	0,5	0	0,24	0,41	0,16

Ergebnisse für PGP 9.5 beider 12-Monate-Gruppen:

Tiernummer	OL/[mm <sup>2</sup> ]	ML/[mm <sup>2</sup> ]	UL/[mm <sup>2</sup> ]	OM/[mm <sup>2</sup> ]	MM/[mm <sup>2</sup> ]	UM/[mm <sup>2</sup> ]	OR/[mm <sup>2</sup> ]	MR/[mm <sup>2</sup> ]	UR/[mm <sup>2</sup> ]
S52	0,04	0,06	0	0,01	0,05	0,01	0	0,01	0
S53	0	0	0	0	0	0	0	0,01	0
S54	0	0	0	0	0	0	0	0,02	0
S55	0	0,03	0,02	0	0,01	0	0	0	0
S56	0	0	0	0	0	0	0	0	0
S57	0,14	0,5	0	0	0	0	0,01	0,04	0,02
S58	0,07	0,09	0	0	0	0	0	0	0
S59	0	0,11	0	0	0	0	0	0,01	0
S60	0	0	0	0	0	0	0	0	0
S62	0,01	0,04	0,01	0	0	0	0	0,01	0
S63	0	0	0	0	0	0	0	0,05	0,01
S66	0,01	0,02	0	0	0	0	0	0	0
S67	0	0,07	0,01	0	0	0	0	0	0
S69	0	0,12	0,01	0	0	0	0	0	0
S70	0	0,24	0	0	0	0	0	0,01	0

Ergebnisse für Kollagen Typ I beider 3-Monate-Gruppen:

Tiernummer	OL/[mm <sup>2</sup> ]	ML/[mm <sup>2</sup> ]	UL/[mm <sup>2</sup> ]	OM/[mm <sup>2</sup> ]	MM/[mm <sup>2</sup> ]	UM/[mm <sup>2</sup> ]	OR/[mm <sup>2</sup> ]	MR/[mm <sup>2</sup> ]	UR/[mm <sup>2</sup> ]
S72	0,35	3,88	0,54	0,11	0,96	0,07	0,13	1,59	0,25
S73	0,31	3,73	0,53	0,17	1,03	0,09	0,28	1,96	0,38
S74	0,34	2,78	0,37	0,14	1,66	0,21	0,13	1,53	0,14
S75	0,2	1,91	0,25	0,12	0,95	0,05	0,09	0,91	0,13
S76	0,17	1,33	0,17	0,02	1,07	0,09	0,25	3,13	0,29
S77	0,17	0,85	0,08	0,14	2	0,1	0,1	1,23	0,08
S78	0,14	1,96	0,34	0,07	1,06	0,16	0,18	1,84	0,14
S80	0,4	2,53	0,35	0,36	2,26	0,3	0,42	3,48	0,46
S82	0,57	3,15	0,61	0,15	1,24	0,32	0,74	4,03	0,69
S83	0,17	0,81	0,13	0,03	1,08	0,06	0,07	1,17	0,15
S84	0,33	0,43	0,05	0,14	0,15	0	0,09	1,04	0,16
S85	0,04	2,02	0,07	0,01	0,02	0,01	0,06	1,9	0,04
S96	0,07	1,26	0,11	0,55	1,44	0,27	0,14	1,05	0,26

Ergebnisse für Kollagen Typ I beider 12-Monate-Gruppen:

Tiernummer	OL/[mm <sup>2</sup> ]	ML/[mm <sup>2</sup> ]	UL/[mm <sup>2</sup> ]	OM/[mm <sup>2</sup> ]	MM/[mm <sup>2</sup> ]	UM/[mm <sup>2</sup> ]	OR/[mm <sup>2</sup> ]	MR/[mm <sup>2</sup> ]	UR/[mm <sup>2</sup> ]
S52	0,77	0,91	0,04	1,05	1,07	0,02	0,62	0,88	0,09
S53	1,65	3,41	0,63	1,23	2,93	1,53	0,73	2,68	0,98
S54	0,86	1,1	0,13	0,94	1,11	0,07	0,97	2,74	0,23
S55	0,11	1,2	0,07	0,01	0,01	0	0,05	1,04	0,23
S56	0,01	0,39	0,03	0,02	0,09	0,04	0,01	0,18	0,01
S57	0,05	0,59	0,1	0,03	0,07	0,01	0,03	0,4	0,02
S58	0,04	1,11	0,21	0,27	0,86	0,45	0,02	0,68	0,17
S59	0,04	2,39	0,18	0	0	0	0,05	0,61	0,05
S60	0,03	0,24	0,01	0	0	0	0,02	0,12	0,01
S62	0,05	0,55	0,13	0,01	0,14	0,06	0,01	0,2	0,01
S63	0,13	0,78	0,09	0	0,01	0	0,06	0,38	0,06
S66	0,18	2,51	0,1	0,02	0,12	0,02	0,21	1,85	0,24
S67	0,06	9,73	0,31	0	0,3	0,15	0,07	0,84	0,08
S69	0,13	3,8	0,68	0,01	1,62	1,45	0,64	2,14	1,07
S70	0,22	5,22	0,43	0,05	0,05	0	0,02	0,59	0,02

## Ergebnisse für Kollagen Typ II beider 3-Monate-Gruppen:

Tiernummer	OL/[mm <sup>2</sup> ]	ML/[mm <sup>2</sup> ]	UL/[mm <sup>2</sup> ]	OM/[mm <sup>2</sup> ]	MM/[mm <sup>2</sup> ]	UM/[mm <sup>2</sup> ]	OR/[mm <sup>2</sup> ]	MR/[mm <sup>2</sup> ]	UR/[mm <sup>2</sup> ]
S72	0,06	0,27	0,02	0,4	1,31	0,06	0,23	0,52	0,04
S73	0,17	0,7	0,08	0,2	0,95	0,1	0,2	1,03	0,15
S74	0,12	1,23	0,19	0,13	1,9	0,2	0,06	0,72	0,08
S75	0,21	1,12	0,17	0,14	1,67	0,61	0,08	0,74	0,28
S76	0,16	2,23	0,54	0,09	2,37	0,6	0,26	2,29	0,43
S77	0,41	2,67	0,29	0,65	4,22	0,35	0,1	2,05	0,38
S78	0,45	2,09	0,14	0,37	2,32	0,18	0,14	1,62	0,12
S80	0,14	0,96	0,13	0,12	1,74	0,31	0,12	0,99	0,18
S82	0,25	2,12	0,55	0,07	1,64	0,34	0,22	1,64	0,31
S83	0,2	1,64	0,23	0,35	4,01	0,58	0,29	3,06	0,36
S84	1,74	5,09	0,61	1,71	5,65	0,57	0,59	1,9	0,14
S85	0,9	2,27	0,18	1,44	3,86	0,21	0,72	2,31	0,33
S91	0,42	1,44	0,43	0,94	4,59	1,48	0,29	1,67	0,54
S92	1,19	5,88	0,9	0,5	4,75	0,85	0,23	1,57	0,26
S93	0,8	3,83	0,5	1,06	7,76	0,42	1,18	6,01	0,66
S95	0,59	3,11	0,16	0,35	2,98	0,04	0,93	5,18	0,4
S96	0,7	3,41	1,06	0,52	5,56	1,23	0,38	3	0,27
S98	0,23	1,43	0,45	0,19	2,43	0,74	0,04	0,12	0,02

## Ergebnisse für Kollagen Typ II beider 12-Monate-Gruppen:

Tiernummer	OL/[mm <sup>2</sup> ]	ML/[mm <sup>2</sup> ]	UL/[mm <sup>2</sup> ]	OM/[mm <sup>2</sup> ]	MM/[mm <sup>2</sup> ]	UM/[mm <sup>2</sup> ]	OR/[mm <sup>2</sup> ]	MR/[mm <sup>2</sup> ]	UR/[mm <sup>2</sup> ]
S52	0,62	2,02	0,25	0,48	2,11	0,04	0,15	0,81	0,22
S53	0,29	3,68	0,58	0,68	4,77	0,93	0,35	4,03	0,37
S55	1,07	4,2	1,1	1,57	6,34	1,03	1,99	5,42	0,58
S56	1,29	5,55	1,24	0,46	5,8	0,89	0,56	5,33	0,48
S57	0,73	3,66	0,85	1,06	6,69	1,05	1,03	6,04	0,8
S58	0,31	1,24	0,25	0,53	2,8	0,91	0,36	2,62	0,6
S59	0,43	2,02	0,28	0,26	0,69	0,27	0,2	0,93	0,15
S60	0,54	4,22	1,2	0,42	3,95	0,88	0,53	3,2	0,31
S63	0,44	2,49	1,31	0,58	5,32	1,62	0,5	2,58	1,01
S66	0,28	1,04	0,1	1,14	3,03	0,48	1	3,04	0,62
S67	0,47	6,52	0,78	0,46	1,69	0,26	0,89	5,98	0,89
S69	0,44	1,69	0,25	0,54	1,98	0,18	0,35	1,36	0,19
S70	0,7	2,66	0,3	0,84	2,87	0,5	0,61	2,12	0,34

<b>Test-Statistik für <math>\alpha</math>-SMA im linken Anulus fibrosus der 3-Monate-Gruppen</b>			
	Anulus, links oben, SMA	Anulus, links Mitte, SMA	Anulus, links unten, SMA
Mann-Whitney-U	31,000	32,000	33,000
Wilcoxon-W	76,000	77,000	78,000
Exakte Signifikanz (2-seitig)	,453	,468	,576
Exakte Signifikanz (1-seitig)	,226	,234	,288

<b>Test-Statistik für <math>\alpha</math>-SMA im Nucleus pulposus der 3-Monate-Gruppen</b>			
	Nucleus, oben, SMA	Nucleus, Mitte, SMA	Nucleus unten, SMA
Mann-Whitney-U	40,500	36,000	40,500
Wilcoxon-W	85,500	81,000	85,500
Exakte Signifikanz (2-seitig)	1,000	1,000	1,000
Exakte Signifikanz (1-seitig)	1,000	,500	1,000

<b>Test-Statistik für <math>\alpha</math>-SMA im rechten Anulus fibrosus der 3-Monate-Gruppen</b>			
	Anulus, rechts oben, SMA	Anulus, rechts Mitte, SMA	Anulus, rechts unten, SMA
Mann-Whitney-U	36,000	31,000	40,000
Wilcoxon-W	81,000	76,000	85,000
Exakte Signifikanz (2-seitig)	1,000	,423	1,000
Exakte Signifikanz (1-seitig)	,500	,211	,500

<b>Test-Statistik für <math>\alpha</math>-SMA im linken Anulus fibrosus der 12-Monate-Gruppen</b>			
	Anulus, links oben, SMA	Anulus, links Mitte, SMA	Anulus, links unten, SMA
Mann-Whitney-U	23,500	19,000	18,000
Wilcoxon-W	59,500	40,000	39,000
Exakte Signifikanz (2-seitig)	,977	,568	,413
Exakte Signifikanz (1-seitig)	,510	,283	,238

<b>Test-Statistik für <math>\alpha</math>-SMA im Nucleus pulposus der 12-Monate-Gruppen</b>			
	Nucleus,mitte, SMA	Nucleus, Mitte, SMA	Nucleus unten, SMA
Mann-Whitney-U	17,500	17,500	18,000
Wilcoxon-W	38,500	38,500	39,000
Exakte Signifikanz (2-seitig)	,329	,329	,473
Exakte Signifikanz (1-seitig)	,154	,154	,308

<b>Test-Statistik für <math>\alpha</math>-SMA im rechten Anulus fibrosus der 12-Monate-Gruppen</b>			
	Anulus, rechts oben, SMA	Anulus, rechts Mitte, SMA	Anulus, rechts unten, SMA
Mann-Whitney-U	16,500	14,500	17,500
Wilcoxon-W	37,500	35,500	38,500
Exakte Signifikanz (2-seitig)	,287	,233	,329
Exakte Signifikanz (1-seitig)	,196	,117	,154

<b>Test-Statistik für Keratansulfat im linken Anulus fibrosus der 3-Monate-Gruppen</b>			
	Anulus, links oben, Keratansulfat	Anulus, links Mitte, Keratansulfat	Anulus, links unten, Keratansulfat
Mann-Whitney-U	33,000	29,000	33,000
Wilcoxon-W	69,000	65,000	78,000
Exakte Signifikanz (2-seitig)	,815	,541	,795
Exakte Signifikanz (1-seitig)	,407	,271	,397

<b>Test-Statistik für Keratansulfat im Nucleus pulposus der 3-Monate-Gruppen</b>			
	Nucleus, oben, Keratansulfat	Nucleus, Mitte, Keratansulfat	Nucleus unten, Keratansulfat
Mann-Whitney-U	29,000	25,000	23,000
Wilcoxon-W	65,000	61,000	59,000
Exakte Signifikanz (2-seitig)	,541	,321	,236
Exakte Signifikanz (1-seitig)	,271	,161	,118

<b>Test-Statistik für Keratansulfat im rechten Anulus fibrosus der 3-Monate-Gruppen</b>			
	Anulus, rechts oben, Keratansulfat	Anulus, rechts Mitte, Keratansulfat	Anulus, rechts unten, Keratansulfat
Mann-Whitney-U	25,500	23,000	31,500
Wilcoxon-W	61,500	59,000	67,500
Exakte Signifikanz (2-seitig)	,334	,236	,691
Exakte Signifikanz (1-seitig)	,167	,118	,346

<b>Test-Statistik für Keratansulfat im linken Anulus fibrosus der 12-Monate-Gruppen</b>			
	Anulus, links oben, Keratansulfat	Anulus, links Mitte, Keratansulfat	Anulus, links unten, Keratansulfat
Mann-Whitney-U	23,500	12,000	14,500
Wilcoxon-W	44,500	33,000	35,500
Exakte Signifikanz (2-seitig)	,974	,142	,240
Exakte Signifikanz (1-seitig)	,487	,071	,120

<b>Test-Statistik für Keratansulfat im Nucleus pulposus der 12-Monate-Gruppen</b>			
	Nucleus, oben, Keratansulfat	Nucleus, Mitte, Keratansulfat	Nucleus unten, Keratansulfat
Mann-Whitney-U	19,000	19,000	14,500
Wilcoxon-W	40,000	40,000	35,500
Exakte Signifikanz (2-seitig)	,549	,573	,241
Exakte Signifikanz (1-seitig)	,274	,286	,121

<b>Test-Statistik für Keratansulfat im rechten Anulus fibrosus der 12-Monate-Gruppen</b>			
	Anulus, rechts oben, Keratansulfat	Anulus, rechts Mitte, Keratansulfat	Anulus, rechts unten, Keratansulfat
Mann-Whitney-U	16,000	19,000	14,500
Wilcoxon-W	52,000	40,000	35,500
Exakte Signifikanz (2-seitig)	,345	,573	,241
Exakte Signifikanz (1-seitig)	,172	,286	,121

<b>Test-Statistik für MMP 13 im linken Anulus fibrosus der 3-Monate-Gruppen</b>			
	Anulus, links oben, MMP 13	Anulus, links Mitte, MMP 13	Anulus, links unten, MMP 13
Mann-Whitney-U	16,000	11,000	11,000
Wilcoxon-W	61,000	56,000	56,000
Exakte Signifikanz (2-seitig)	,412	,147	,139
Exakte Signifikanz (1-seitig)	,208	,073	,070

<b>Test-Statistik für MMP 13 im Nucleus pulposus der 3-Monate-Gruppen</b>			
	Nucleus, oben, MMP 13	Nucleus, Mitte, MMP 13	Nucleus unten, MMP 13
Mann-Whitney-U	11,500	11,500	10,500
Wilcoxon-W	56,500	56,500	55,500
Exakte Signifikanz (2-seitig)	,124	,150	,110
Exakte Signifikanz (1-seitig)	,076	,078	,077

<b>Test-Statistik für MMP 13 im rechten Anulus fibrosus der 3-Monate-Gruppen</b>			
	Anulus, rechts oben, MMP 13	Anulus, rechts Mitte, MMP 13	Anulus, rechts unten, MMP 13
Mann-Whitney-U	14,500	17,500	17,000
Wilcoxon-W	59,500	62,500	62,000
Exakte Signifikanz (2-seitig)	,305	,537	,476
Exakte Signifikanz (1-seitig)	,142	,272	,255

<b>Test-Statistik für MMP 13 im linken Anulus fibrosus der 12-Monate-Gruppen</b>			
	Anulus, links oben, MMP 13	Anulus, links Mitte, MMP 13	Anulus, links unten, MMP 13
Mann-Whitney-U	20,500	23,000	24,000
Wilcoxon-W	41,500	68,000	45,000
Exakte Signifikanz (2-seitig)	,474	,689	,754
Exakte Signifikanz (1-seitig)	,238	,344	,377

<b>Test-Statistik für MMP 13 im Nucleus pulposus der 12-Monate-Gruppen</b>			
	Nucleus, oben, MMP 13	Nucleus, Mitte, MMP 13	Nucleus unten, MMP 13
Mann-Whitney-U	4,000	18,000	19,000
Wilcoxon-W	25,000	39,000	40,000
Exakte Signifikanz (2-seitig)	,004	,311	,372
Exakte Signifikanz (1-seitig)	,002	,156	,186

<b>Test-Statistik für MMP 13 im rechten Anulus fibrosus der 12-Monate-Gruppen</b>			
	Anulus, rechts oben, MMP 13	Anulus, rechts Mitte, MMP 13	Anulus, rechts unten, MMP 13
Mann-Whitney-U	5,000	5,000	6,000
Wilcoxon-W	26,000	26,000	27,000
Exakte Signifikanz (2-seitig)	,007	,007	,012
Exakte Signifikanz (1-seitig)	,003	,003	,006

<b>Test-Statistik für PGP 9.5 im linken Anulus fibrosus der 3-Monate-Gruppen</b>			
	Anulus, links oben, PGP 9.5	Anulus, links Mitte, PGP 9.5	Anulus, links unten, PGP 9.5
Mann-Whitney-U	22,000	26,000	28,000
Wilcoxon-W	67,000	71,000	56,000
Exakte Signifikanz (2-seitig)	,218	,538	1,000
Exakte Signifikanz (1-seitig)	,149	,308	,563

<b>Test-Statistik für PGP 9.5 im Nucleus pulposus der 3-Monate-Gruppen</b>			
	Nucleus, oben, PGP 9.5	Nucleus, Mitte, PGP 9.5	Nucleus unten, PGP 9.5
Mann-Whitney-U	22,500	24,000	28,000
Wilcoxon-W	67,500	69,000	56,000
Exakte Signifikanz (2-seitig)	,285	,354	1,000
Exakte Signifikanz (1-seitig)	,135	,190	,563

<b>Test-Statistik für PGP 9.5 im rechten Anulus fibrosus der 3-Monate-Gruppen</b>			
	Anulus, rechts oben, PGP 9.5	Anulus, rechts Mitte, PGP 9.5	Anulus, rechts unten, PGP 9.5
Mann-Whitney-U	30,000	30,000	27,000
Wilcoxon-W	75,000	75,000	72,000
Exakte Signifikanz (2-seitig)	,879	,879	,437
Exakte Signifikanz (1-seitig)	,406	,406	,437

<b>Test-Statistik für PGP 9.5 im linken Anulus fibrosus der 12-Monate-Gruppen</b>			
	Anulus, links oben, PGP 9.5	Anulus, links Mitte, PGP 9.5	Anulus, links unten, PGP 9.5
Mann-Whitney-U	24,000	21,000	18,000
Wilcoxon-W	45,000	66,000	63,000
Exakte Signifikanz (2-seitig)	,664	,521	,235
Exakte Signifikanz (1-seitig)	,336	,260	,143

<b>Test-Statistik für PGP 9.5 im Nucleus pulposus der 12-Monate-Gruppen</b>			
	Nucleus, oben, PGP 9.5	Nucleus, Mitte, PGP 9.5	Nucleus unten, PGP 9.5
Mann-Whitney-U	24,000	21,000	24,000
Wilcoxon-W	45,000	42,000	45,000
Exakte Signifikanz (2-seitig)	1,000	,486	1,000
Exakte Signifikanz (1-seitig)	,600	,343	,600

<b>Test-Statistik für PGP 9.5 im rechten Anulus fibrosus der 12-Monate-Gruppen</b>			
	Anulus, rechts oben, PGP 9.5	Anulus, rechts Mitte, PGP 9.5	Anulus, rechts unten, PGP 9.5
Mann-Whitney-U	24,000	26,000	26,000
Wilcoxon-W	45,000	47,000	71,000
Exakte Signifikanz (2-seitig)	1,000	,979	1,000
Exakte Signifikanz (1-seitig)	,600	,510	,657

<b>Test-Statistik für Kollagen I im linken Anulus fibrosus der 3-Monate-Gruppen</b>			
	Anulus, links oben, Kollagen I	Anulus, links Mitte, Kollagen I	Anulus, links unten, Kollagen I
Mann-Whitney-U	7,000	5,000	2,000
Wilcoxon-W	17,000	15,000	12,000
Exakte Signifikanz (2-seitig)	,103	,050	,011
Exakte Signifikanz (1-seitig)	,052	,025	,006

<b>Test-Statistik für Kollagen I im Nucleus pulposus der 3-Monate-Gruppen</b>			
	Nucleus, oben, Kollagen I	Nucleus, Mitte, Kollagen I	Nucleus unten, Kollagen I
Mann-Whitney-U	15,000	11,000	8,000
Wilcoxon-W	25,000	21,000	18,000
Exakte Signifikanz (2-seitig)	,709	,330	,140
Exakte Signifikanz (1-seitig)	,355	,165	,070

<b>Test-Statistik für Kollagen I im rechten Anulus fibrosus der 3-Monate-Gruppen</b>			
	Anulus, rechts oben, Kollagen I	Anulus, rechts Mitte, Kollagen I	Anulus, rechts unten, Kollagen I
Mann-Whitney-U	4,500	8,000	13,000
Wilcoxon-W	14,500	18,000	23,000
Exakte Signifikanz (2-seitig)	,039	,148	,483
Exakte Signifikanz (1-seitig)	,021	,074	,241

<b>Test-Statistik für Kollagen I im linken Anulus fibrosus der 12-Monate-Gruppen</b>			
	Anulus, links oben, Kollagen I	Anulus, links Mitte, Kollagen I	Anulus, links unten, Kollagen I
Mann-Whitney-U	20,500	14,000	15,000
Wilcoxon-W	65,500	59,000	60,000
Exakte Signifikanz (2-seitig)	,474	,145	,172
Exakte Signifikanz (1-seitig)	,237	,072	,085

<b>Test-Statistik für Kollagen I im Nucleus pulposus der 12-Monate-Gruppen</b>			
	Nucleus, oben, Kollagen I	Nucleus, Mitte, Kollagen I	Nucleus unten, Kollagen I
Mann-Whitney-U	15,500	25,500	25,500
Wilcoxon-W	36,500	70,500	70,500
Exakte Signifikanz (2-seitig)	,185	,884	,885
Exakte Signifikanz (1-seitig)	,094	,443	,443

<b>Test-Statistik für Kollagen I im rechten Anulus fibrosus der 12-Monats-Gruppen</b>			
	Anulus, rechts oben, Kollagen I	Anulus, rechts Mitte, Kollagen I	Anulus, rechts unten, Kollagen I
Mann-Whitney-U	26,500	26,000	25,500
Wilcoxon-W	71,500	47,000	70,500
Exakte Signifikanz (2-seitig)	,977	,955	,884
Exakte Signifikanz (1-seitig)	,488	,477	,441

<b>Test-Statistik für Kollagen II im linken Anulus fibrosus der 3-Monate-Gruppen</b>			
	Anulus, links oben, Kollagen II	Anulus, links Mitte, Kollagen II	Anulus, links unten, Kollagen II
Mann-Whitney-U	12,500	17,000	21,000
Wilcoxon-W	67,500	72,000	76,000
Exakte Signifikanz (2-seitig)	,006	,022	,053
Exakte Signifikanz (1-seitig)	,003	,011	,027

<b>Test-Statistik für Kollagen II im Nucleus pulposus der 3-Monate-Gruppen</b>			
	Nucleus, oben, Kollagen II	Nucleus, Mitte, Kollagen II	Nucleus unten, Kollagen II
Mann-Whitney-U	17,000	5,000	23,000
Wilcoxon-W	72,000	60,000	78,000
Exakte Signifikanz (2-seitig)	,021	,000	,079
Exakte Signifikanz (1-seitig)	,010	,000	,039

<b>Test-Statistik für Kollagen II im rechten Anulus fibrosus der 3-Monate-Gruppen</b>			
	Anulus, rechts oben, Kollagen II	Anulus, rechts Mitte, Kollagen II	Anulus, rechts unten, Kollagen II
Mann-Whitney-U	16,500	21,000	33,000
Wilcoxon-W	71,500	76,000	88,000
Exakte Signifikanz (2-seitig)	,018	,053	,356
Exakte Signifikanz (1-seitig)	,009	,027	,178

<b>Test-Statistik für Kollagen II im linken Anulus fibrosus der 12-Monate-Gruppen</b>			
	Anulus, links oben, Kollagen II	Anulus, links Mitte, Kollagen II	Anulus, links unten, Kollagen II
Mann-Whitney-U	9,000	12,000	13,000
Wilcoxon-W	19,000	22,000	23,000
Exakte Signifikanz (2-seitig)	,263	,543	,685
Exakte Signifikanz (1-seitig)	,129	,271	,343

<b>Test-Statistik für Kollagen II im Nucleus pulposus der 12-Monate-Gruppen</b>			
	Nucleus, oben, Kollagen II	Nucleus, Mitte, Kollagen II	Nucleus unten, Kollagen II
Mann-Whitney-U	12,500	10,000	12,000
Wilcoxon-W	48,500	20,000	22,000
Exakte Signifikanz (2-seitig)	,598	,368	,570
Exakte Signifikanz (1-seitig)	,297	,184	,285

<b>Test-Statistik für Kollagen II im rechten Anulus fibrosus der 12-Monate-Gruppen</b>			
	Anulus, rechts oben, Kollagen II	Anulus, rechts Mitte, Kollagen II	Anulus, rechts unten, Kollagen II
Mann-Whitney-U	13,500	14,000	8,000
Wilcoxon-W	49,500	24,000	44,000
Exakte Signifikanz (2-seitig)	,713	,808	,214
Exakte Signifikanz (1-seitig)	,356	,404	,107

## Danksagung

Als erstes möchte ich meinen Betreuern danken.

Danke Prof. Johanna Plendl (Institut für Veterinär-Anatomie, Fachbereich Veterinärmedizin, Berlin) für ihre Ratschläge, ihre anspruchsvolle aber immer sehr nette Betreuung, ihr xxl-Verständnis und ihre unendliche Geduld. Danke dass Sie stets ein offenes und freundliches Ohr hatten.

Danke, lieber Klaus (Dr. Klaus Schnake, Wirbelsäulenzentrum und Neurotraumatologie, BGU - Frankfurt am Main) für Deine so kollegiale und freundliche Betreuung und die Energie, die Du nach so vielen Arbeitsstunden in mich investiert hast. Danke auch für die Inspiration und Ermutigung weiterzumachen, immer wenn es schwer wurde und für die gute Führung auf diesem Weg. Danke Dr. Kandziora für die Gelegenheit ihrer Arbeitsgruppe beizutreten.

Danke Prof. Achim Gruber (Institut für Tierpathologie, Fachbereich Veterinärmedizin, Berlin) für die hochgeschätzte Möglichkeit, in Ihrem Institut so viel von Ihnen zu lernen und für die Möglichkeit, an meinem Projekt zu arbeiten. Sie haben meine Freude an der Pathologie geweckt, so dass ich auch Pathologe werden will.

Ein ganz spezieller Dank an meinem Korrektor Dipl. Ing. Fränk Bierkandt, der viele Stunden seiner Zeit meiner Arbeit gewidmet hat. Hadoken!

Danke an Dr. Arndt für die statistische Betreuung und Ihre Mühe mich zu verstehen, trotz meiner Nummerophobie. Danke auch an Frau Brakebusch für ihre freundliche Betreuung bei der Formatierung des Dokumentes.

Danke Dr. Hana Hünigen für die Bilder und Ihre immer freundliche Unterstützung bei vielen Fragen. Danke an meinem lustigen Kollegen Martin Wolny, der nicht nur mir, sondern uns allen, die im Virchow Klinikum gearbeitet haben, stets geholfen hat.

Danke an meinem Bruder Oscar, der die Geduld hatte, mir Photoshop zu erklären und manchmal für mich sogar selber durchführte, wenn die Geduld nicht mehr vorhanden war. Danke an Julia für ihren Mut, der auf mich überging, zum Glück, und für die wunderschönen Ablenkungen. Danke für Deine ausserordentliche Mühe, Dein Leben meinem Projekt anzupassen. Für die tatkräftige Unterstützung, wenn es um Abbildungen oder Grammatik ging, werde ich Dir ebenso stets dankbar sein. Ganz besonders danken möchte ich meinen Eltern, die mich immer unterstützten. Danke an meine Mutter für die Englisch-Korrektur. Meinem Vater danke ich besonders für seine erfahrenen Ratschläge.

Danke an meine Mentorin Lisa van der Grinten für die Inspiration und Ideen. Danke an Sabine für ihre bedingungslose Unterstützung, sowie an Juliana für ihre Stärke und Inspiration, besser zu werden. Danke an meine Brüder Gil und Rodrigo, die mir nicht erlaubten, aufzugeben. Und Carito für die schönen Motivationschübe und psychologische Aufmunterung. Danke Frau Gaede für Ihre Hilfe am Ende dieses Weges.

Und ganz besonderen Dank an meine große Familie, die, egal was ich mache oder nicht mache, stets an meiner Seite steht - trotz Riesendistanz.

### **Selbstständigkeitserklärung**

Ich, Eduardo Michael Mauro Flores, erkläre, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig ohne unzulässige Hilfe Dritter verfasst habe. Die Hilfsmittel und Quellen sind vollständig angegeben und in notwendigen Fällen vom Urheber genehmigt worden. Somit stellt meine Arbeit auch anteilsmäßig keine Kopie anderer Arbeiten dar.

Berlin, den 15 September 2011

Eduardo Mauró