

Aus dem
Veterinärwissenschaftlichen Department
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

Arbeit angefertigt unter der Leitung von Univ.-Prof. Dr. Eckhard Wolf

Angefertigt am
Institut für Unfallchirurgische Forschung und Biomechanik
der Universität Ulm
(Univ.-Prof. Dr. Anita Ignatius)

**In-vivo-, In-vitro- und In-silico-Untersuchungen zum
Nukleusersatz im Schafsmodell**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München

von
Sandra Reitmaier
aus Günzburg

München 2013

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Prof. Dr. Joachim Braun

Berichterstatter: Prof. Dr. Eckhard Wolf

Korreferent: Prof. Dr. Holm Zerbe

Tag der Promotion: 09. Februar 2013

„Inmitten der Schwierigkeiten liegt die Möglichkeit“

(Albert Einstein)

1	Einleitung	1
1.1	Klinische Relevanz.....	1
1.2	Die Bandscheibe	4
1.2.1	Anatomische Grundlagen	4
1.2.2	Makroskopie und biochemische Zusammensetzung	5
1.2.3	Physiologie.....	7
1.2.4	Biomechanik	11
1.3	Bandscheibendegeneration	15
1.3.1	Natürliche Alterungsprozesse	15
1.3.2	Pathologische Bandscheibendegeneration	16
1.4	Therapeutische Strategien	21
1.4.1	Gegenwärtige Behandlungskonzepte	21
1.4.2	Regenerationsstrategien.....	24
1.4.3	Nukleotomie, Nukleusersatz und Tissue Engineering.....	26
1.5	Präklinische Forschung.....	29
1.5.1	Das Schaf als Tiermodell in vivo und in vitro	29
1.5.2	Die Methode der Finiten Elemente.....	31
1.6	Ziele der Dissertation.....	34
2	Material und Methoden.....	36
2.1	In-vivo-Untersuchungen (Teil 1).....	36
2.1.1	Versuchstiere	36
2.1.2	Messtechnik.....	37
2.1.3	Operationsvorbereitung	39
2.1.4	Chirurgischer Zugang	40
2.1.5	Implantation der Druckmesssonde.....	44
2.1.6	Versuchsablauf	46
2.1.7	Auswertung.....	47
2.2	Ex-vivo-Untersuchungen.....	47
2.2.1	Präparation	47

2.2.2	Testprotokoll	48
2.3	In-vitro-Untersuchungen	49
2.3.1	Präparate	49
2.3.2	Testgruppen.....	50
2.3.3	Testprotokoll	53
2.3.4	Auswertung.....	55
2.4	In-silico-Untersuchungen	55
2.4.1	Modellbeschreibung.....	56
2.4.2	Last- und Randbedingungen.....	57
2.4.3	Parameterstudien.....	57
2.4.4	Analyse des intradiskalen Kraftflusses.....	59
2.5	In-vivo-Untersuchungen (Teil 2).....	60
3	Ergebnisse	61
3.1	In-vivo-Ergebnisse (Teil 1).....	61
3.1.1	Postoperativer Gesundheitszustand der Tiere	61
3.1.2	Ermittlung der Erholungs- und Aktivitätslasten	61
3.2	Ex-vivo-Ergebnisse	62
3.3	In-vitro-Ergebnisse	64
3.3.1	Steifigkeitstest.....	64
3.3.2	Kriech-Relaxations-Test.....	65
3.4	In-silico-Ergebnisse	70
3.4.1	Höhenverlust und intradiskaler Druck	70
3.4.2	Kraftfluss innerhalb der Bandscheibe	73
3.5	In-vivo-Ergebnisse (Teil 2).....	77
3.5.1	Einfluss des Bandscheibenlevels auf den intradiskalen Druck	77
3.5.2	Intradiskaler Druck während unterschiedlicher Aktivitäten.....	78
3.5.3	Intradiskaler Druck im Tagesverlauf.....	80
3.5.4	Ermittlung axialer Kompressionslasten unterschiedlicher Aktivitäten.....	82

4	Diskussion.....	85
4.1	In-vivo-Untersuchungen	85
4.1.1	Tiermodelle in der präklinischen Forschung	85
4.1.2	Das Schaf als Tiermodell für regenerative Strategien an der Bandscheibe	87
4.1.3	Die Bedeutung der Mechanik für die Zelldifferenzierung	89
4.1.4	In-vivo-Ergebnisse	89
4.2	Ex-vivo-Untersuchungen.....	97
4.2.1	Axialer Belastungsmodus der Wirbelsäule.....	97
4.2.2	Ex-vivo-Ergebnisse.....	99
4.3	In-vitro-Untersuchungen	102
4.3.1	In-vitro-Ergebnisse.....	102
4.3.2	Mechanische Kompetenz von Hydrogelen als Nukleusersatzmaterial	106
4.3.3	Versuchsdesign	108
4.4	In-silico-Untersuchungen	110
4.5	Zukünftige Forschungsansätze	112
5	Zusammenfassung	115
6	Summary	117
7	Abbildungsverzeichnis	119
8	Literaturverzeichnis.....	126
	Danksagung.....	152

Abkürzungsverzeichnis

A	Fläche
bFGF	basic Fibroblast Growth Factor
BSP	Bruttosozialprodukt
F	Kraft
FE	Finite-Elemente
FEM	Finite-Elemente-Modell
g	Gramm
Hz	Hertz
IDP	intradiskaler Druck (intradiscal pressure)
i.m.	intramuskulär
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
L	Lendenwirbel
L(x)-L(y)	Bandscheibenfach zwischen Lendenwirbel(x) und (y)
Lig.	Ligamentum
m.	musculus
mg	Milligramm
mm	Millimeter
MPa	Megapascal
µm	Mikrometer
n	Anzahl
N	Newton
NaCl	Natriumchlorid (Kochsalz)
p	Signifikanzniveau / Irrtumswahrscheinlichkeit
PMMA	Polymethylmethacrylat
OP	Operation
S	Schaf
Std	Stunde
TE	Tissue Engineering
TGFβ1	Transforming Growth Factor β1
UFB	Institut für Unfallchirurgische Forschung und Biomechanik
V	Volt

1 Einleitung

„Alle wollen alt werden, aber keiner will es sein“

(Gustav Knuth)

1.1 Klinische Relevanz

Obwohl Studien zufolge der menschliche Körper auf ein maximal erreichbares Alter von etwa 120 Jahren ausgelegt zu sein scheint (Christensen and Vaupel, 1996; Ruiz-Torres and Beier, 2005), beginnen degenerative Veränderungen diverser Organstrukturen bereits im frühen Kindesalter. So zeigen bereits die Bandscheiben von unter 18 jährigen erste Degenerationsanzeichen (Boos et al., 2002).

Da Bandscheibendegeneration nachweislich mit dem Auftreten von Rückenschmerzen korreliert (Luoma et al., 2000), führte dies zur Formulierung des Symptomenkomplexes des sog. „discogenic low back pain“, der die Bandscheibe in den Fokus schmerzhafter Rückenerkrankungen stellt und so die Bedeutung der Bandscheibendegeneration als einer der häufigsten Ursachen von spezifischen Rückenschmerzen zum Ausdruck bringt (Buckwalter, 1995; Freemont, 2009).

Mit knapp 50% stehen Rückenschmerzen bei weitem an erster Stelle der in der orthopädischen Praxis diagnostizierten Arbeitsunfähigkeitsgründe (Zentralinstitut für die kassenärztliche Versorgung in der Bundesrepublik Deutschland, 2003). Darüber hinaus ergab eine der bislang größten durchgeführten europäischen Umfragen zum Thema „chronische Schmerzen“ an rund 46.000 Befragten, dass Rückenschmerzen die Schmerzart Nummer eins bei den Befragten darstellten und diese somit zur vorrangigsten Gesundheitsstörung im Bereich des muskuloskelettalen Systems machen (Breivik et al., 2006; Bundesministerium für Arbeit und Soziales, 2012). Zunächst vielversprechend klingen Angaben, dass knapp 90% der Rückenschmerzfälle selbstlimitierend sind und binnen drei Monaten nach erstmaligem Auftreten vollständig abheilen (Andersson, 1999). Jedoch steigt der Anteil der Patienten zusehends, bei denen keine Spontanheilung eintritt und es zu einer Chronifizierung der Schmerzen kommt (Freyburger et al., 2009; Frymoyer, 1988). Nimmt Rückenschmerz einen chronischen Verlauf, definitionsgemäß ab einer

Dauer von drei Monaten, wird ihm ein eigenständiger Krankheitswert beigemessen (Becker et al., 2004; Chenot et al., 2003). Obwohl zunehmend auch jüngere Altersgruppen heimgesucht werden (O'Sullivan et al., 2012), betreffen Rückenschmerzen vorwiegend noch immer Menschen im erwerbsfähigen Alter zwischen 30 und 50 Jahren (Leboeuf-Yde and Kyvik, 1998) und führen, abgesehen von den Aufwendungen für operative Eingriffe, allein durch Arbeits- und Produktionsausfälle bzw. frühzeitige Berentungen in Deutschland zu einer jährlichen Belastung für den bundesweiten Haushalt in Höhe von etwa 22 - 25 Milliarden Euro (ca. 1% des BSP) (Bolten et al., 1998; Michalski and Hinz, 2006; Schmidt and Kohlmann, 2005; Wenig et al., 2009).

Zu welchem Prozentsatz die Bandscheibendegeneration als Ursache chronischer Rückenschmerzen in die Statistiken einfließt, ist schwer zu beziffern. Die Auslöser der pathologischen Bandscheibendegeneration sind bis heute nicht bis ins Detail verstanden (Adams and Roughley, 2006). Ohne eine Standardisierung in der Definition der Bandscheibendegeneration fällt es jedoch schwer, epidemiologische Aussagen zu Vorkommen, Häufigkeit und Kostenaufwand v.a. für chirurgische Maßnahmen zur Behandlung des degenerativen Lumbalsyndroms zu treffen (Battie et al., 2004). Schätzungen zufolge liegt die Inzidenz chirurgischer Eingriffe aufgrund von schmerzhafter Bandscheibendegeneration allein in Deutschland pro Jahr bei etwa 87 Patienten pro 100.000 Einwohnern (Kast et al., 2000).

Eine Chronifizierung zu verhindern, ist das Hauptaugenmerk einer jeden schmerztherapeutischen Behandlungsmaßnahme (Ashburn and Staats, 1999). Mit zunehmender Alterung der Population, bedingt durch einen kontinuierlichen Trend sinkender Geburtenraten bei gleichzeitig stetig steigender Lebenserwartung des Menschen, nimmt jedoch die Häufigkeit chronischer (Schmerz) Erkrankungen in der Bevölkerung zu (Gunzelmann et al., 2002). Lebten im Jahr 2008 noch knapp vier Millionen Menschen im Alter von über 80 Jahren in Deutschland, so werden es Berechnungen zufolge im Jahre 2050 mit ca. 10 Millionen mehr als doppelt so viele sein (Statistisches Bundesamt, 2009). Um diesem Wandel des demografischen Profils und dem damit verbundenen vermehrten Aufkommen chronischer Erkrankungen Rechnung zu tragen, soll es mithilfe regenerativer Medizin zu einem langfristigen Umdenken in den Behandlungskonzepten chronischer Krankheiten kommen (Langer and Vacanti, 1993). Bereits seit den 70er Jahren werden daher

Anstrengungen unternommen, unterschiedliche Forschungsdisziplinen, wie Biomaterialwissenschaft, Zellbiologie, Stammzellforschung, Biochemie und Molekularmedizin zu einem gemeinsamen Bestreben um biologisch-regenerative Visionen zu vereinen (Vacanti, 2006). Dabei spielt auch hier sinngemäß der boomende Begriff des „anti agings“ eine Rolle. Im Gegensatz zu industriell forcierten Illusionen nach dem Wunsch ewiger Jugend wird hierbei allerdings das Ziel verfolgt, weg von der Behandlung des geriatrischen, chronisch multimorbiden Patienten hin zu einer Art präventiven Medizin zu gelangen und dadurch die Lebensspanne zu erweitern, die der Mensch unter zunehmender Ausschöpfung seiner biologischen Lebenserwartung beschwerdefrei verbringen kann (Wong et al., 2012).

Gerade Patienten mit chronischer Bandscheibendegeneration müssen sich im Endstadium der Erkrankung teils hochinvasiven chirurgischen Maßnahmen unterziehen. Um diese zu umgehen und die damit verbundenen Kosten für das Gesundheitssystem langfristig zu minimieren, ist die Intention regenerativer therapeutischer Verfahren, über eine möglichst frühzeitige Intervention in die Pathogenese der Erkrankung, eine schnelle Rekonvaleszenz und Rückführung der Patienten in den normalen Lebens- und Arbeitsalltag zu ermöglichen. In unterschiedlichen Abstufungen verfolgt die regenerative Medizin das Ziel, über die Injektion von wachstumsregulierenden Substanzen, die Applikation von organspezifischen oder –unspezifischen Vorläuferzellen und / oder die Implantation bzw. den vollständigen oder partiellen Ersatz eines Organes mittels biomechanisch potenter Trägersubstanzen der körpereigenen Struktur zurück in den gesunden Zustand zu verhelfen noch bevor das betroffene Organsystem irreversibel geschädigt ist (Fodor, 2003). Dabei soll rechtzeitig verhindert werden, dass im Laufe der Zeit molekulare und zelluläre Defekte akkumulieren. Bereits bestehende pathologische Veränderungen sollen revidiert bzw. in ihrem Fortschreiten verzögert werden.

Seit den frühen Anfängen des Tissue engineering (TE) wurden bis heute eine Vielzahl erfolgsversprechender wissenschaftlicher Technologien in vitro erarbeitet, deren breitflächiger klinischer Einsatz allerdings bis auf wenige Ausnahmen im Bereich der Haut-, Blutgefäß-, Knochen- und Knorpelregeneration bislang ausgeblieben ist (Horch et al., 2012). Die Gründe hierfür bestehen in einer teils mangelhaften Abstimmung zwischen Laborbedingungen und klinischer Realität (Ikada, 2006). Gerade die Bandscheibe erfordert jedoch durch ihre einzigartige

Physiologie und ihr charakteristisches Funktionsprinzip ein Höchstmaß an interdisziplinärer Zusammenarbeit zwischen Wissenschaft und Klinik, um das Gelingen vielversprechender theoretischer Therapieansätze auch unter In-vivo-Bedingungen zu ermöglichen und so langfristig innovative Behandlungskonzepte voranzutreiben, die die Bandscheibe als ein in ihren Erkrankungen sozioökonomisch so bedeutsames Organsystem erfordert. Daher ist es unabdingbar, dass neue Behandlungsstrategien effektiv vorangetrieben und exzessiven präklinischen Untersuchungen unterzogen werden, um somit auf lange Sicht eine sichere Anwendung im Patienten zu ermöglichen.

1.2 Die Bandscheibe

1.2.1 Anatomische Grundlagen

Die Bandscheiben tragen mit einem Anteil von etwa 1/3 zur Gesamtlänge der Wirbelsäule des erwachsenen Menschen bei (Raj, 2008). Die menschliche Wirbelsäule besteht aus sieben Hals-, zwölf Brust- und fünf Lendenwirbeln. Zu ihren Aufgaben zählt neben der Stabilisierung des Rumpfes (Stützfunktion) auch die Koordination komplexer Bewegungsmuster (Zielmotorik) (Fritz et al., 1989). Zwischengeschaltet zwischen den einzelnen Wirbelkörpern sind die Bandscheiben neben der Flexibilisierung des Achsenskelettes für die Lastübertragung innerhalb der Wirbelsäule verantwortlich. Frühe Studien zur Untersuchung der anatomischen Beschaffenheit der Bandscheiben aus dem Jahr 1945 bezeichnen die Bandscheibe als eine Art Kissen zwischen benachbarten Wirbelkörpern (Coventry et al., 1945). Dabei stellt die Zwischenwirbelscheibe kein homogenes Gebilde, sondern ein komplexes Konstrukt strukturell und mechanisch äußerst unterschiedlicher Kompartimente dar. Zu diesen Bestandteilen der Bandscheibe zählen der galertartige Bandscheibenkern, der Nukleus pulposus, dessen faserknorpelartige zirkuläre Begrenzung, der Anulus fibrosus, und die knorpeligen Deckplatten der angrenzenden Wirbelkörper.

Trotz vermeintlicher Ähnlichkeiten im makroskopisch-morphologischen Erscheinungsbild stellen die Bandscheiben keine Knochenverbindung im Sinne eines

echten Gelenkes dar, sondern zählen zu den sogenannten knorpeligen Knochenverbindungen oder Symphysen (symphysis intervertebralis) (Grignon and Roland, 2000).

1.2.2 Makroskopie und biochemische Zusammensetzung

Der Nukleus pulposus kann makroskopisch als ein weiches, gallertartiges, hydrophiles Gewebe bezeichnet werden, das in seiner soliden Komponente einen komplexen Verbund darstellt, in dem die vornehmlich proteoglykanreiche Matrix (Gehalt: ~14% des Trockengewichtes) von Fasern (Kollagenfasern: ~4%, Elastinfasern: ~1,5% des Trockengewichtes) durchzogen ist, die untereinander zu einem dichten gitternetzartigen Maschenwerk verflochten sind (Feng et al., 2006; Kalb et al., 2012; Mikawa et al., 1986; Olczyk, 1994a, b, c, Abb. 1.1). Die Fasern im Nukleus haben einen Durchmesser von etwa 0,1 – 0,15 μm und weisen einen ungerichteten Verlauf innerhalb des Nukleus auf (Happey et al., 1964; Humzah and Soames, 1988). Proteoglykane repräsentieren den für die Funktionalität der Bandscheibe wichtigsten Bestandteil des Nukleus (Mwale et al., 2004). Diese stellen vielfach verzweigte Konstrukte aus vernetzten Protein- und Glykosaminoglykanketten dar und machen, aufgrund ihres molekularen Aufbaus mit einem hohen Gehalt an negativ geladenen Seitenketten, das Bandscheibenzentrum zu einem Kompartiment hoher osmotischer Aktivität, was u.a. dessen immense Affinität für Wasser und darin gelöste Solute bedingt, und zu dem mit knapp 80% hohem Wassergehalt im Nukleus pulposus beiträgt (Bushell et al., 1977; Ghosh et al., 1977; Jackson and Gu, 2009; Jackson et al., 2009; Urban and Maroudas, 1981; Urban et al., 1979).

Entgegen der weitläufigen Meinung existiert eine klar definierbare Grenze zwischen Nukleus pulposus und Anulus fibrosus nicht. Vielmehr kommt es in diesem als „Transition zone“ bezeichneten Bereich zu einem fließenden Übergang zwischen strukturell und mechanisch sehr unterschiedlichen Regimen (Guilak et al., 1999; Taylor et al., 1981). Aufgrund der hohen Proteoglykansyntheserate legen In-vitro-Untersuchungen den Schluss nahe, dass es sich bei der Transition zone um ein Gebiet regenerativen Potentials für die Bandscheibe handelt (Antoniou et al., 1996; Bayliss et al., 1988).

Bereits in der makroskopischen Morphologie unterscheidet sich der Anulus deutlich vom Bandscheibenkern. Unterteilt wird er in einen inneren und einen äußeren Teil. Beide kennzeichnet strukturell ein zwiebelschalenartiger Aufbau, der durch einen Wechsel in der Ausrichtung der schräg diagonal angeordneten Kollagenfaserbündel charakterisiert ist. Beim Menschen besteht der Anulus abhängig vom Alter und dem Wirbelsäulenabschnitt aus 15 - 25 sich in der Ausrichtung ihrer Kollagenfaserbündel kreuzenden Lamellen, die in der Anulusperipherie ca. 140 - 330 µm und im inneren Teil des Anulus fibrosus ca. 200 - 520 µm breit und untereinander durch „cross bridges“ miteinander verbunden sind (Marchand and Ahmed, 1990; Pezowicz et al., 2006). Auch biochemisch weist der Anulus mit einem deutlich reduzierten Proteoglykan- (~5% des Trockengewichtes) und Wassergehalt (~70%), bei gleichzeitig merklich erhöhtem Kollagenfaseranteil (Gehalt: ~15%) deutliche Unterschiede im Vergleich zum Nukleus auf (Pritzker, 1977; Raj, 2008). Bemerkenswert für die Funktion des Anulus ist darüber hinaus der Gehalt und die Verteilung des Strukturproteins Elastin, dessen Fasergehalt mit nur einem Anteil von ~2% des Trockengewichts zur biochemischen Zusammensetzung des Anulus beiträgt, allerdings nachweislich eine wesentliche Rolle in dessen biomechanischen Verhalten spielt (Cloyd and Elliott, 2007; Johnson et al., 1982). Vornehmlich interlamellar und am annulo-osseären Übergang lokalisiert, tragen Elastinfasern nicht nur zur mechanischen Wechselwirkung der Anuluslamellen untereinander bei, sondern sind auch als Faserinsertionen, die in die knöchernen Randleisten der Wirbelkörper (epiphyses annulares) einstrahlen, an der festen Verankerung des Anulus an den Deckplatten beteiligt (Yu, 2002).

Nach kranial und kaudal wird der Intervertebralraum durch den knorpeligen Anteil der Wirbelkörperdeckplatten begrenzt. Vergleichbar der Situation im synovialen Gelenk bildet diese im Mittel ca. 0,6 mm dicke Schicht den knorpeligen Überzug der knöchernen Deckplatte, der am dünnsten im Bereich des zentralen Nukleus ist (Roberts et al., 1989). Der mineralisierte Teil der Grund- und Deckplatten kann morphologisch aufgrund seiner Struktur als poröse knöcherne Grenzfläche betrachtet werden, die subchondral eine Verbindung zwischen dem gut durchbluteten Knochenmarksraum des Wirbels und der Bandscheibe herstellt. Der histologische Aufbau der knorpeligen Deckplatte entspricht hyalinem Gelenkknorpel. Die Ausrichtung der Kollagenfasern ist vornehmlich horizontal und damit weitestgehend

parallel zur Krümmung der Deckplatte. Diese Ausrichtung ist dem individuellen Belastungsprofil der Bandscheibe geschuldet. Trotz des für hyalinen Knorpel typischen Erscheinungsbildes und Kollagen/Proteoglykan-Verhältnisses (Proteoglykangehalt 8% und Kollagengehalt 25% des Trockengewichtes) (Mwale et al., 2004; Raj, 2008) enthält der Deckplattenknorpel mit 55% deutlich weniger Wasser als Gelenkknorpel mit ca. 72% (Roberts et al., 1989; Roberts et al., 1986).

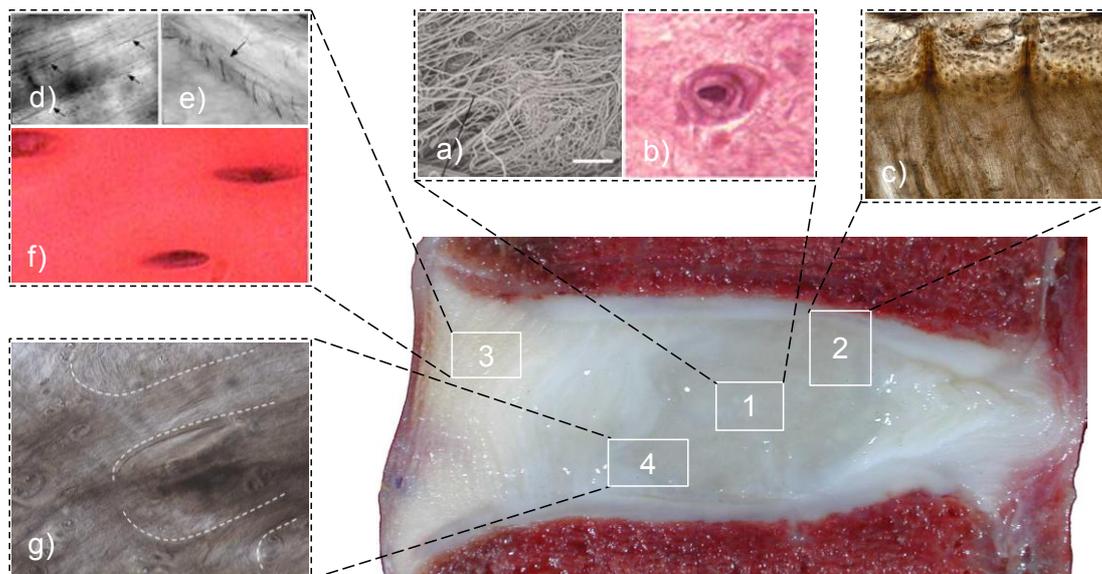


Abb. 1.1: Die Bandscheibe und ihre Kompartimente in Detailansicht: 1- Nucleus: a) Kollagenfasernetzwerk im rasterelektronenmikroskopischen Bild (Aladin et al., 2010) und b) Nucleus pulposus Zelle im histologischen Bild (Roberts et al., 2006). 2- Übergangsbereich zwischen Nucleus und knorpeliger Deckplatte: c) Detailvergrößerung der Faserinsertionen des Nucleus im Deckplattenknorpel (Wade et al., 2012b). 3- Anulus: d) intralamelläre Kollagenfaseranordnung, e) interlamelläre Elastinfasern („cross bridges“) (Smith and Fazzalari, 2009) und f) fibroblastenartige langgestreckte Zellen im Anulus (Roberts et al., 2006). 4- Übergangsbereich zwischen Nucleus und Anulus: g) Faserinterdigitationen zur festen Verankerung zwischen Nucleus und Anulus (Wade et al., 2012b).

1.2.3 Physiologie

Entwicklungsgeschichtlich entspringt der Nucleus pulposus einer mesodermalen Abschnürung, der sogenannten Chorda dorsalis, auch Notochord oder primäres Achsenskelett bezeichnet. Der Anulus fibrosus sowie die knorpeligen Deckplatten bilden sich aus dem Mesenchym (Urban et al., 2000). Während sowohl der Anulus als auch die knorpeligen Deckplatten in der embryonalen Entwicklung zunächst von Blutgefäßen durchzogen sind, die sich bis ins Alter von etwa 20 - 25 Jahren aus

diesen Bereichen zurückziehen, ist der Nukleus von Beginn an nicht vaskularisiert (Nerlich et al., 2007). Die Bandscheibe enthält daher bis auf wenige Kapillarendigungen in der Anulusperipherie weder Blutgefäße, Lymphgefäße noch Nervenfasern und macht sie so zum größten avaskulären Organ des Körpers (Paesold et al., 2007; Urban et al., 2004). Der Aufbau der Bandscheiben aus miteinander verwobenen kollagenen und elastischen Fasern und darin eingebetteten Proteoglykanen macht die Bandscheiben zu einem dichten knorpelartigen Geflecht, in das Nährstoffe per Diffusion und über mechanische Konvektion eindringen müssen (Grunhagen et al., 2011). Der Mechanismus der Diffusion bedingt, dass Nährstoffe entlang eines osmotischen Konzentrationsgradienten in die Bandscheibe gelangen. Dabei treten Nährstoffe zunächst ungehindert aus dem reichlich vaskularisierten Knochenmarksraum der Wirbelkörper bis an die knöchernen Grund- und Deckplatten des Zwischenwirbelraumes heran, die durch ihre poröse Struktur einen für die Versorgung der Bandscheibe essentiellen Diffusionskontakt herstellen. Neben dem Hauptweg der Nährstoffversorgung über die subchondralen Deckplatten, stellen zu einem geringeren Anteil auch die Gefäße der Anulusperipherie zeitlebens die Ernährung der Bandscheibenzellen sicher (Holm et al., 1981; Nachemson et al., 1970; Ogata and Whiteside, 1981).

Der maximale Diffusionsweg für kleine Moleküle wie Sauerstoff kann beim erwachsenen Menschen bis zu 8 mm betragen (Urban et al., 2004) und resultiert in einer kritischen Versorgungslage der Zellen im Bandscheibenzentrum. Dabei ist selbst die Diffusion von relativ kleinen Molekülen wie Glukose beispielsweise aufgrund des polyanionisch geladenen Proteoglykans in der Bandscheibe nur eingeschränkt möglich. Bandscheibenzellen sind daher physiologischerweise an Umgebungsbedingungen mit permanent niedrigem Sauerstoff- und Glukosegehalt bei gleichzeitig hohem Laktatgehalt aus anaerobem Stoffwechsel adaptiert (Paesold et al., 2007, Abb. 1.2). Große Moleküle, wie Wachstumsfaktoren und diverse Enzyme, finden sich nur in äußerst geringen Konzentrationen in der Bandscheibe.

Während die Diffusion einen belastungsunabhängigen Mechanismus der Nährstoffversorgung darstellt, bildet die mechanische Konvektion in avaskulären knorpelartigen Substraten einen Vorgang, der durch einen zeitlich angemessenen Wechsel aus Kompressions- und Entlastungsphasen dafür sorgt, dass zusammen mit einem gerichteten Flüssigkeitsstrom Stoffwechselprodukte unter Belastung aus

der Bandscheibe gespült und während der Entlastung gelöste Nährstoffe in die Zwischenwirbelscheiben gesogen werden.

Da die Gesunderhaltung von Zellen wesentlich durch die Ernährung beeinflusst wird und eine mangelhafte Ernährungssituation zum Zelltod führt, erscheint es der eingeschränkten Anbindung an die Nährstoffversorgung geschuldet, dass Bandscheiben eine äußerst geringe Zelldichte von nur etwa 0,25 bis 0,5 % des Gesamtgewebsvolumens aufweisen (Urban et al., 2000). Die Zelldichte diffusionsabhängiger Strukturen ist umgekehrt proportional zu deren Dicke. Während die Bandscheibe etwa viermal so dick ist wie beispielsweise der menschliche Kniegelenksknorpel, liegt die Zelldichte im Nukleus pulposus mit etwa 4000 - 5000 Zellen/mm³ bei nur etwa einem Drittel des vergleichbaren Wertes im Knie (Maroudas et al., 1975; Stockwell, 1971).

Neben der anspruchsvollen Ernährungssituation der Bandscheibe stellen auch deren einzigartige mechanische Lastverhältnisse die Zellen vor eine enorme Herausforderung und haben so zu deren hohen Anpassungsgrad geführt. Bis heute sind die Zellen der Bandscheibe nicht bis ins Detail charakterisiert. Die Zellen des Nukleus werden als chondrozytenartig und die des äußeren Anulus als fibroblastenartig bezeichnet (Johnson and Roberts, 2003). Wie numerische Analysen zeigen konnten, stellt diese differenzierte morphologische Ausprägung der Zellen eine Anpassung an die unterschiedlichen Beanspruchungen innerhalb ihrer Bandscheibenkompartimente dar (Baer et al., 2003). Mit einer dreifach höheren Steifigkeit und deutlichen Unterschieden im viskoelastischen Verhalten haben sich die Nukleus pulposus Zellen verglichen mit Anulus fibrosus Zellen auf das Belastungsprofil innerhalb des auf eine teils enorme Druckbelastung ausgelegte Bandscheibenzentrum angepasst (Guilak et al., 1999).

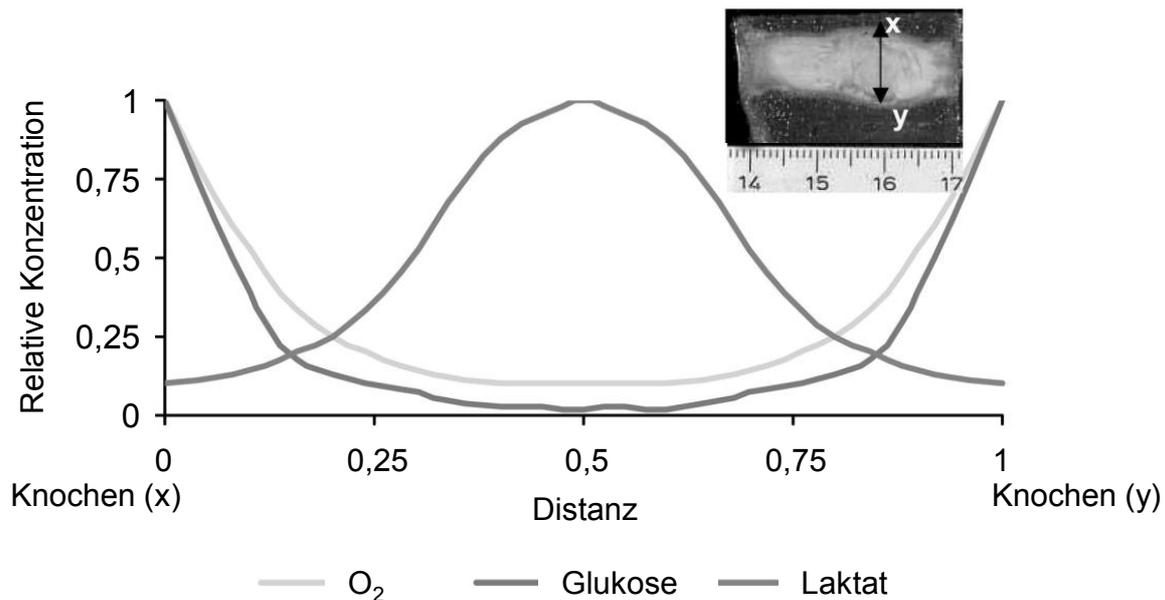


Abb. 1.2: Diffusionswege und Solutkonzentrationen in der Bandscheibe. Die Nährstoffversorgung und Entfernung der Stoffwechselmetabolite der Bandscheibe erfolgen überwiegend über die Grund- und Deckplatten des Wirbelkörpers. Zu einem geringeren Anteil wird die Nährstoffversorgung über die Anulusperipherie sichergestellt. Die langen Diffusionswege resultieren in einer kritischen Versorgungslage der Bandscheibenzellen mit einem hohen Laktat- bei gleichzeitig niedrigem Sauerstoff- und Glukosegehalt im Zentrum der Bandscheibe (aus Urban et al., 2004).

Die Abstimmung der Zellen an ihre zonalen mechanischen Anforderungen schlägt sich neben dem phänotypischen Erscheinungsbild auch in der Zusammensetzung der von ihnen produzierten extrazellulären Matrix und ihrer zellspezifischen Zytoskelettarchitektur nieder (Langelier et al., 2000). So zeigen die physiologischerweise eher rundlichen Nucleus pulposus Zellen einen durchwegs höheren Gehalt und eine homogenere Verteilung des Intermediärfilamentes F Aktin, einem Gerüststoff, der bekanntlich für eine hohe Resistenz der Zellen gegen axiale Druckbelastungen spricht, als die Zellen des Anulus fibrosus, die sich vornehmlich großen Dehnungs-/ Zugbelastungen ausgesetzt sehen (Li et al., 2008). Als Relikte embryonalen Vorläufergewebes der Bandscheibe werden die im Nucleus pulposus befindlichen, vakuolenhaltigen notochordalen Zellen gesehen, über deren Verweildauer in der Bandscheibe des Menschen sich unterschiedliche Angaben in der Literatur finden (Risbud et al., 2010; Risbud and Shapiro, 2011). Während lange Zeit sicher davon ausgegangen wurde, dass diese sehr teilungsaktiven Progenitorzellen in der humanen Bandscheibe im Jugendalter verschwinden (Hunter

et al., 2004) und somit einen wesentlichen Beitrag zur frühzeitigen Alterung der Bandscheibe beitragen, konnten mittlerweile mittels immunhistochemischer Verfahren notochordale Zellmarker auch noch in gealtertem Bandscheibengewebe gefunden werden (Weiler et al., 2010).

Trotz morphologischer und biomechanischer Analogien zwischen den Zellen des Anulus fibrosus und der Transition zone nehmen die Zellen der Transition zone eine Sonderstellung ein und eine exakte Zuordnung dieses Zelltyps ist daher zu keinem der beiden Kompartimente möglich (Guilak et al., 1999). Der in diesem Übergangsbereich lokalisierte Typ der Matrix produzierenden Zellen scheint zu einem fließenden Übergang der Zusammensetzung des Extrazellulärraumes zwischen Nukleus und Anulus beizutragen, der deutlich die Umkehrung der mechanischen Lastverhältnisse von einer vornehmlich auf Druckbelastung ausgerichteten Grundsubstanz im Nukleus auf eine auf Zugbeanspruchung ausgelegte Faserstruktur im Anulus reflektiert. Die hohe Kollagen- und Proteoglykansyntheserate der Transition zone weist darüber hinaus auf ein möglicherweise vorhandenes regeneratives Potential dieses Zelltyps für die benachbarten Kompartimente Nukleus und Anulus hin (Trout et al., 1982).

1.2.4 Biomechanik

„Water is the hydraulic fluid of the disc. ..., loss of hydraulic fluid can lead to difficulties ranging from irritation to catastrophe.“

(Eisenstein and Roberts, 2003)

Mechanisch betrachtet ist die Bandscheibe ein viskoelastisches Material. Die Viskoelastizität basiert dabei hauptsächlich auf Wasserbewegungen zwischen unterschiedlichen (benachbarten) Strukturen, die durch Poren, im Falle der Bandscheibe durch die Öffnungen in den knöchernen Deckplatten, erfolgen. Die Wissenschaft der Poroelastizität macht sich die Vorstellung poröser Strukturen als eine Art Kompositstruktur zu eigen. Viskoelastische Materialien wie der Nukleus pulposus bestehen demnach aus zwei voneinander durchzogenen Kontinua: einer Matrix, dem sogenannten Solid, und den darin verwobenen, vollständig mit Fluid gesättigten Poren. Im gesunden Zustand der Bandscheibe verleiht der hydrierte

Bandscheibenkern dem Zwischenwirbelraum Stabilität, indem er die gegenläufig angeordneten Anulusfasern unter eine diskrete Vorspannung stellt und so zu einer straffen Verbindung benachbarter Wirbelkörper beiträgt. Abhängig von der Tageszeit, dem Zeitverlauf und der Amplitude der Last, ist die Mechanik der Bandscheibe mehr durch die mechanischen Eigenschaften ihrer soliden Struktur oder der ihres Fluids gekennzeichnet (Iatridis et al., 1996). Am Morgen wird die Last bei gesättigter Bandscheibe mehr über die interstitielle Flüssigkeit übertragen. Während des Tages verliert die Bandscheibe etwa 20% Wasser (Boos et al., 1993). Dies geht mit einer sichtlichen Abnahme der Körpergröße von etwa 1 - 2 cm beim Menschen einher (De Puky, 1935; Tyrrell et al., 1985) und steigert den Einfluss der soliden Strukturen an der Lastübertragung im Tagesverlauf.

Durch den steten Wechsel aus Ruhephasen und Belastung sind die Bandscheiben im Tagesverlauf einer Vielzahl unterschiedlicher Lastwechsel ausgesetzt. Kurze, stoßartige Belastungen puffert der inkompressible aber verformbare Nukleus ab, indem er den Druck gleichmäßig an seine zugfeste Hülle, den Anulus fibrosus, sowie an die Grund- und Deckplatten der benachbarten Wirbelkörper abgibt.

Die Bandscheibe steht auch ohne externe Lastapplikation unter In-vitro-Bedingungen unter einem hydrostatischen Druck, der beim Menschen bei etwa 0,1 MPa liegt (Rohlmann et al., 2001; Wilke et al., 1996). Durch seinen hohen Gehalt an Glykosaminoglykanen erlangt der Nukleus die Fähigkeit Wasser reversibel zu binden. Das durch die hohe Dichte negativer Ladungen der Proteoglykane aufgebaute osmotische Potential steht dabei in seinem Betrag der auf die Bandscheibe von extern einwirkenden Kraft gegenüber (Jackson et al., 2009; Urban et al., 1979, Abb. 1.3).

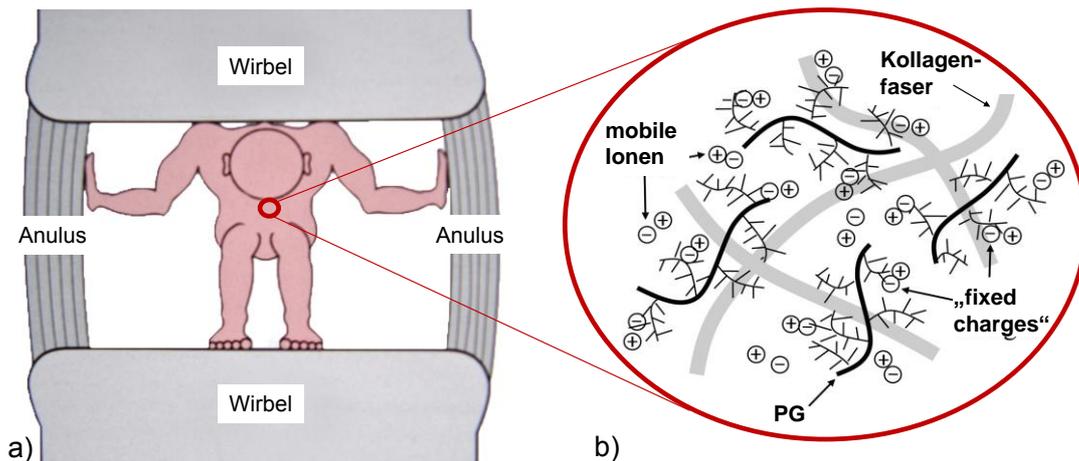


Abb. 1.3: Der intrinsische Bandscheibendruck. a) Selbst im Ruhezustand steht die Bandscheibe unter einem hydrostatischen Druck (bildlich dargestellt durch die Figur), der die angrenzenden Wirbelkörper auseinanderdrängt und die zirkulären Anulusfasern unter eine diskrete, radiär gerichtete Zugspannung stellt (modifiziert nach Cailliet, 2004). Die molekulare Grundlage hierfür bildet der in der Nucleusgrundsubstanz befindliche hohe Gehalt an Proteoglykanen und die daran gebundene hohe Dichte negativer Ladungen, die die Attraktivität des Nucleus für Wassermoleküle bedingen und so einen hohen osmotischen Druckgradienten aufbauen (b, modifiziert nach Jackson et al., 2009).

Halten sich die Anziehungskraft der Bandscheibe für Wasser, bedingt durch deren osmotisches Potential, und die von extern auf die Bandscheibe applizierte Kraft die Waage, sistiert jeglicher Fluidstrom. Verlagern sich diese Lastverhältnisse z.B. bei andauernder, konstant hoher Belastung, gibt die Bandscheibe Wasser an die Umgebung ab. Dies ist im gesättigten Zustand der Bandscheibe der Fall, z.B. morgens beim Aufstehen, wenn der Druck, der auf der Bandscheibe lastet, die Wasserbindungskapazität des Nucleus übersteigt. Die Bandscheibe verliert in der Folge sukzessiv Wasser und damit einhergehend an Höhe (Malko et al., 2002; McMillan et al., 1996, Abb. 1.4 a). Der Vorgang des Höhenverlustes der Bandscheibe folgt dabei einem nichtlinearen Verhalten, die Bandscheibe „kriecht“ (Koeller et al., 1986, Abb. 1.5). Unmittelbar nach Lastapplikation, wenn die Differenz zwischen extern applizierter Kraft, d.h. dem resultierenden Wasserauspressdruck, und Wasseranzugskraft am größten ist, weist auch der Wasserverlust sein Maximum auf. Mit abnehmendem Wassergehalt im Bandscheibenkern steigt jedoch kontinuierlich die Ladungsdichte pro Volumeneinheit an und das osmotische Potential steigt. Bei konstanter Kraft nimmt die Bereitschaft der Bandscheibe exponentiell ab, Wasser an die Umgebung abzugeben. Immer weniger Wasser tritt aus der Bandscheibe aus bis

schließlich ein Gleichgewichtszustand erreicht ist und kein Nettowasserstrom mehr zu verzeichnen ist.

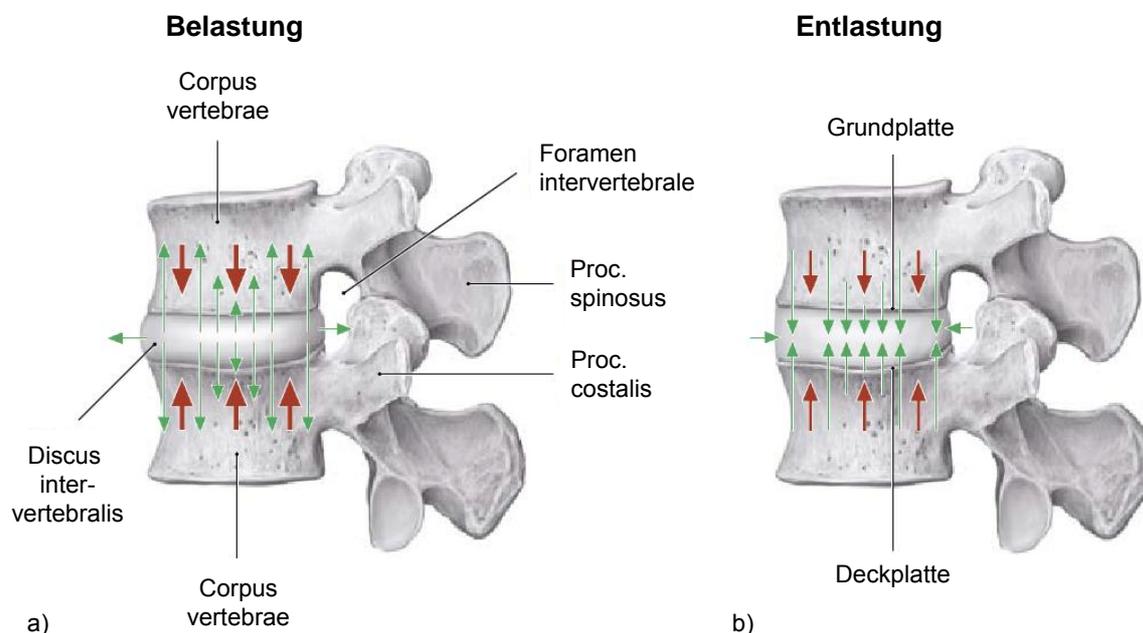


Abb. 1.4: Mechanische Konvektion der Bandscheibe. a) Unter Belastung (dicke rote Pfeile) verliert die Bandscheibe Wasser (grüne Pfeile) über die Grund- und Deckplatten sowie den Anulus fibrosus. Dieser Flüssigkeitsverlust geht mit einer Höhenabnahme des Zwischenwirbelraumes einher. b) Unter Entlastung (dünne rote Pfeile) gewinnt die Bandscheibe verlorene Flüssigkeit zurück und die Bandscheibe richtet sich wieder auf (modifiziert nach Schünke et al., 2005).

Unter Entlastung (Abb. 1.4 b) der Bandscheibe tritt das gegenläufige Phänomen ein. Wird das osmotische Potential der Bandscheibenmatrix größer als der Wasserauspressdruck von außen, wie es z.B. beim zu Bett gehen abends der Fall ist, entfaltet die Bandscheibe ihren Schwelldruck, und Fluid wird in die Bandscheibe gesogen. Auch dieser Mechanismus folgt einem nichtlinearen Verlauf. Mit zunehmender Wasseraufnahme in die Bandscheibe nimmt die relative Konzentration der Proteoglykane im Verhältnis zur Gesamtmasse des Nukleus ab, das osmotische Potential und damit die Wasseranziehungskraft des Nukleus für Wasser sinken. Der Fluidstrom sistiert, wenn durch die Höhenzunahme der Bandscheibe die relative externe Druckbelastung auf die Bandscheibe durch die zunehmende Anspannung des Bandapparates des Zwischenwirbelraumes steigt, bis schließlich ein Gleichgewichtszustand erreicht und demzufolge kein Nettowasserstrom mehr zu verzeichnen ist.

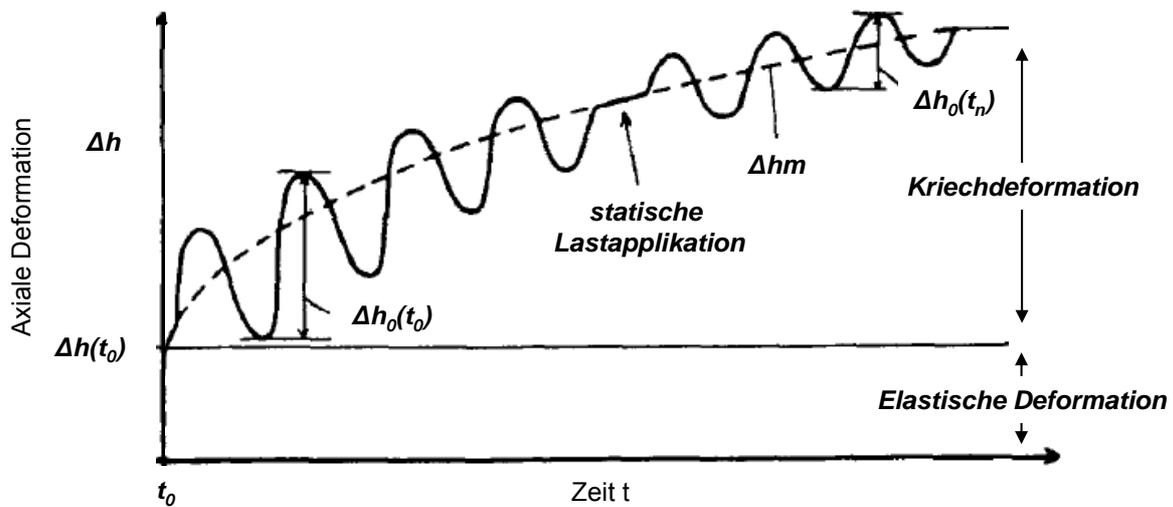


Abb. 1.5: Kriechverhalten der Bandscheibe. Unter statischer sowie dynamischer Belastung verliert die Bandscheibe über den Tag hinweg über den eintretenden Wasserverlust an Höhe. Dieser Höhenverlust folgt einem nichtlinearen Verlauf. Die Deformation der Bandscheibe ist somit zu Beginn der Lastapplikation am größten, wird mit der Zeit zunehmend geringer und nähert sich einem Gleichgewichtszustand (modifiziert nach Koeller et al., 1986).

1.3 Bandscheibendegeneration

1.3.1 Natürliche Alterungsprozesse

Bandscheiben unterliegen im Vergleich zu anderen muskuloskelettalen Gelenkstrukturen physiologischerweise einem früheren primären Alterungsprozess, der bereits im Jugendalter zu deutlichen Anzeichen von Gewebeabbau innerhalb der Bandscheibe führt (Boos et al., 2002; Nerlich et al., 1997, Abb. 1.6). Während der Gehalt nekrotischer Zellen im fetalen Nukleus bei weniger als 2 % liegt, steigt dieser Anteil beim Erwachsenen bereits auf ca. 50 % an (Trout et al., 1982). Es ist schwer, eine klare Abgrenzung zwischen natürlichen Alterserscheinungen und pathologisch-degenerativen Veränderungen an der Bandscheibe zu treffen (Zhao et al., 2007). Ähnlich den Abläufen bei der Entstehung des Krankheitskomplexes Bandscheibendegeneration verliert auch die natürlicherweise alternde Bandscheibe im Laufe der Zeit ihre charakteristischen makroskopischen, biochemischen und mechanischen Eigenschaften (Haefeli et al., 2006; Inoue and Espinoza Orias, 2011;

Wilke et al., 2006b). Während die junge (gesunde) Bandscheibe von einem gut hydrierten galertartigen Nukleus gefüllt wird, der sich klar von seiner zirkulären Faserbegrenzung absetzen lässt, verwischt diese Strukturierung der Bandscheibe mit ihren einzelnen funktionellen Kompartimenten im Alter und der Zwischenwirbelraum wird zunehmend durch ein inhomogenes, fibröses und im Vergleich zum Gesundheitszustand recht trockenes Gebilde ersetzt (Adams et al., 1986; Adams and Roughley, 2006). Innerhalb dieses spröden Gewebes entstehen Fissuren und Spalten, die Bandscheibenhöhe nimmt aufgrund der Dehydratation deutlich ab. Im Unterschied zur klinisch relevanten, d.h. schmerzhaften, Bandscheibendegeneration entstehen bei reinen Alterserscheinungen nur geringfügig reparaturbedürftige Schäden an der Bandscheibe (Peng et al., 2006). Diese Schäden bestehen bei der pathologischen Bandscheibendegeneration u.a. aus Rissen, die die gesamte Anulusbreite umfassen und über Heilungsversuche des Körpers zum Einwachsen von vaskularisiertem Granulationsgewebe führen. In der Folge kommt es zu einer deutlichen Expressionssteigerung von Wachstumsfaktoren (z.B. bFGF und TGF β 1) und deren Rezeptoren sowie einem vermehrten Auftreten von Entzündungszellen im Heilungsgebiet, die als wesentlich für die Schmerzgenese angesehen werden.

1.3.2 Pathologische Bandscheibendegeneration

Eine eindeutige und erschöpfende Definition der pathologischen Bandscheibendegeneration inklusive der pathogenetischen Abläufe und derer zugrundeliegenden Ursachen gibt es gegenwärtig nicht (Eisenstein and Roberts, 2003). Adams et al. bezeichneten die Bandscheibendegeneration als eine abweichende, zell-medierte Antwort auf eine dem altersgemäßen Ausmaß vorausseilende, progressive strukturelle Schädigung (Adams and Roughley, 2006). Über die Vorstellung der Bandscheibendegeneration als eine Art Verschleißerscheinung geht jedoch auch diese Definition nicht hinaus, die bzgl. der konkreten zugrundeliegenden Ursachen keine Aussage trifft. Was letztlich konkret ausschlaggebend für eine schmerzhafte Degeneration der Bandscheibe ist, bleibt bislang ungeklärt. Während noch bis Mitte der 90er Jahre als auslösendes Moment für Rückenschmerzen in erster Linie mechanische Schädigungen der Bandscheibe

angesehen wurden, weswegen im Jahr 1993 bandscheibenbedingte Erkrankungen als Berufskrankheit körperlich stark beanspruchter Berufsgruppen in die Liste der Berufskrankheitenverordnung aufgenommen wurden (BK 2108 – BK 2110), wird mittlerweile davon ausgegangen, dass in erster Linie eine genetische Prädisposition den Grundstein für die pathologische Bandscheibendegeneration legt (Battie et al., 1995; Eisenstein and Roberts, 2003; Matsui et al., 1998; Sambrook et al., 1999).

Grad 0

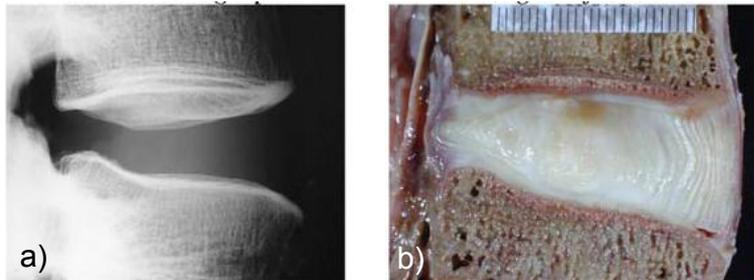
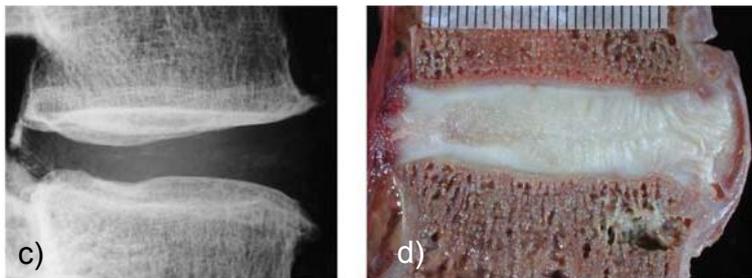


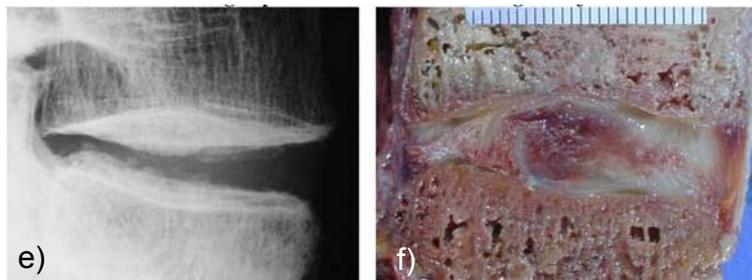
Abb. 1.6: Die 4 Grade der Bandscheibendegeneration (BSD) im laterolateralen Röntgenbild (links) und Gefrierschnitt post mortem (rechts) nach Wilke et al., 2006. a, b) gesunde Bandscheibe eines 37 jährigen.

Grad 1



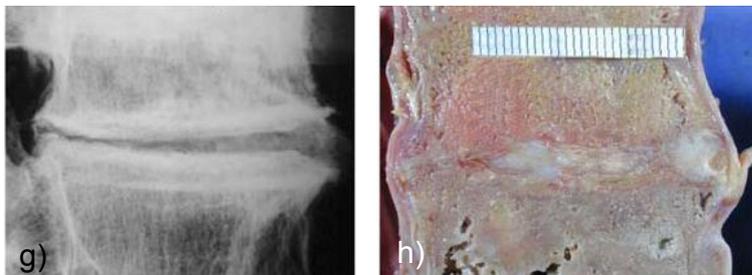
c, d) Milde BSD einer 49 jährigen mit beginnender Dehydratation und Höhenabnahme des Zwischenwirbelraumes.

Grad 2



e, f) mittelgradige BSD eines 88 jährigen mit Deckplattenschädigung, Gefäßeinsprossung und Fissurenbildung sowie beginnender Kalzifizierung des Zwischenwirbelraumes.

Grad 3



g, h) hochgradige BSD einer 89 jährigen mit kollabierter Bandscheibenhöhe und deutlich fortgeschrittener knöcherner Überbrückung des Zwischenwirbelraumes.

Gegenwärtig ist eine Vielzahl unterschiedlicher Gene in Verdacht, einzeln oder in ihrer Gesamtheit zum Degenerationsgeschehen beizutragen (Chan et al., 2006). Diese Veränderungen reichen dabei von Alterationen in den Genen, die für Bestandteile der extrazellulären Matrix der Bandscheibe codieren (Bsp. Aggrecan oder Kollagen) bis hin zu Veränderungen in Genen, die die Expression und Synthese von Entzündungsmediatoren regulieren, die wichtig für den Matrix-turnover sind. Einer Vielzahl unterschiedlicher Entzündungsmediatoren (Prostaglandine, Interleukine, Matrix-Metalloproteinasen, Nitritoxid usw.) wird mittlerweile eine Bedeutung in der Entwicklung der Bandscheibendegeneration zugeschrieben (Liu et al., 2001; Podichetty, 2007). So viele einzelne Faktoren zunehmend auch benannt werden können, die einzeln oder in ihrer Gesamtheit zum Symptomenkomplex Bandscheibendegeneration beitragen, ein einziges, klar ansprechbares auslösendes Moment für deren Entstehung scheint es nicht zu geben (Abb.1.7).

Ein allgemeines Klassifizierungsschema nach Kirkaldy-Willis (1988) unterteilt die Bandscheibendegeneration in drei Entwicklungsstadien: 1.) Dysfunktion, 2.) Instabilität und 3.) Stabilisierung. Wie allerdings die Ursachen der Bandscheibendegeneration durch ihre Multikausalität sehr unterschiedlich in ihrer Gewichtung sein können, so kann auch der Verlauf der degenerativen Veränderung der Bandscheibe von Patient zu Patient individuell sehr verschiedenartig ausgeprägt sein.

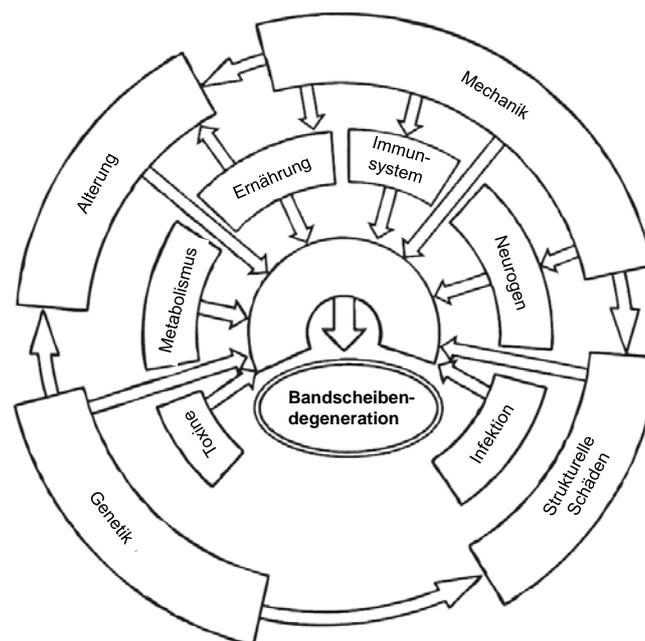


Abb. 1.7 Multikausalität der Bandscheibendegeneration (aus Hadjipavlou et al., 2008).

ad 1.) Über eine vermehrte Synthese und Freisetzung von matrixabbauenden Enzymen kommt es zur Degradation der Bandscheibengrundsubstanz mit Abnahme des Proteoglykangehaltes und einer Verschiebung des Fasergehaltes im Nucleus pulposus von Kollagen Typ II zu Kollagen Typ I (Duance et al., 1998; Nerlich et al., 1997; Pearce et al., 1987; Vernon-Roberts and Pirie, 1977). Über den Abbau der für die Wasserbindung des Zwischenwirbelraumes verantwortlichen Makromoleküle geht dieses als chondrosis intervertebralis bezeichnete Krankheitsstadium mit einer Veränderung der molekularen Zusammensetzung und in der Folge einer quantitativen Abnahme des Wassergehalts einher und führt zu strukturellen und mechanischen Veränderungen innerhalb des Zwischenwirbelraumes (Benneker et al., 2005; Fujiwara et al., 2000; Holm, 1993; Lyons et al., 1981). Durch die progressive Austrocknung verliert die Bandscheibe zunehmend an Höhe und damit einhergehend ihre biomechanische Funktion (Harris and Macnab, 1954; Niosi and Oxland, 2004; Videman et al., 2003).

ad 2.) Dehydriert die Bandscheibe, können über den Druckverlust im Bandscheibenkern die Vorspannung des Faserrings und damit die stabilisierende Funktion auf das Bewegungssegment entfallen. Das Bandscheibenfach würde in der Folge zunehmend instabil, könnte gleiten (Spondylolisthesis) und über eine unphysiologische Beanspruchung zu sekundärer Arthrosebildung an den Facettengelenken führen (Fujiwara et al., 2000). Durch den zunehmenden Steifigkeitsverlust des Nucleus aufgrund des Wasserverlustes, kommt es zu einer gesteigerten Kompressionsbelastung des Anulus fibrosus, dessen Fasern hierauf physiologischerweise nicht über einen längeren Zeitraum ausgelegt sind. Es entstehen im Zuge der Überbelastung lokale Faserschädigungen, die sich zu radiären Rissen im Anulus ausbreiten können (Adams and Roughley, 2006) und mit entzündlichen Veränderungen und in der Folge einem vermehrten Eindringen nozizeptiver Nervenfasern in den Anulus einhergehen (Coppes et al., 1997; Peng et al., 2006). Bereits in diesem Stadium kommt es zu ersten intermittierenden Schmerzzuständen, die vermeintlich auf die Kompression der neural zunehmend innervierten Anulusperipherie zurückzuführen sind (Freemont et al., 1997; Osti et al., 1990; Rannou et al., 2004). Gerade die Frühstadien der Bandscheibendegeneration (relativ gut hydrierter Nucleus, aber geschädigter Anulus) bergen die höchste Gefahr für Bandscheibenprotrusionen bzw. Bandscheibenvorfälle und können zur

Kompression des Rückenmarks und nachgeschalteter neuraler Strukturen führen (Lee et al., 2000; Schmidt et al., 2007; Shirazi-Adl, 1989; Yasuma et al., 1990; Yasuma et al., 1986). Makroskopisch kommt es neben der progressiven Annäherung der benachbarten Wirbelkörper mit Fortschreiten der Bandscheibendegeneration zu einem strukturellen Umbau des Zwischenwirbelraumes (Harris and Macnab, 1954; Hristova et al., 2011; Wang et al., 2012a; Wang et al., 2012b). Die gleichmäßige Druckverteilung, die im wassergesättigten Zustand des Bandscheibenkernes aus einer Umverteilung des Druckes vom Nukleus auf die gesamte Bandscheibenquerschnittsfläche resultiert, entfällt und führt somit zu einer veränderten Lastüberleitung über das Bewegungssegment hinweg (Horst and Brinckmann, 1981; Rohlmann et al., 2006; Schmidt et al., 2007; Shirazi-Adl et al., 1984).

ad 3.) Auf eine Veränderung der mechanischen Belastung reagiert Knochen durch sog. „remodelling“. Stark beanspruchte Strukturen werden dabei mit Knochen unterbaut, der hochspezialisiert entsprechend der Amplitude und Richtung der auf ihn wirkenden Last ausgelegt ist. Über eine Sklerosierung der Grund- und Deckplatten versucht der Körper zunächst der Instabilität des Bewegungssegmentes und den damit einhergehenden Veränderungen in der Lastübertragung adaptiv entgegenzuwirken (Krismer et al., 1997; Wang et al., 2011b; Wang et al., 2011c). Es kommt in der Folge v.a. im Bereich der Bandansätze zu knöchernen Anbauten am Bewegungssegment, die dem langfristigen Ziel folgen, das Bandscheibenfach zu überbrücken und eine Fusion herzustellen. Über die Sklerosierung der Grund- und Deckplatten wird die Nährstoffversorgung der Bandscheibe über die Deckplatten kritisch eingeschränkt, was als wesentlicher Aspekt im Fortschreiten der Erkrankung gesehen wird (Ayotte et al., 2001; Bernick and Cailliet, 1982; Hristova et al., 2011; Laffosse et al., 2010; Nachemson et al., 1970; Roberts et al., 1996; Urban et al., 2004, Abb. 1.8).

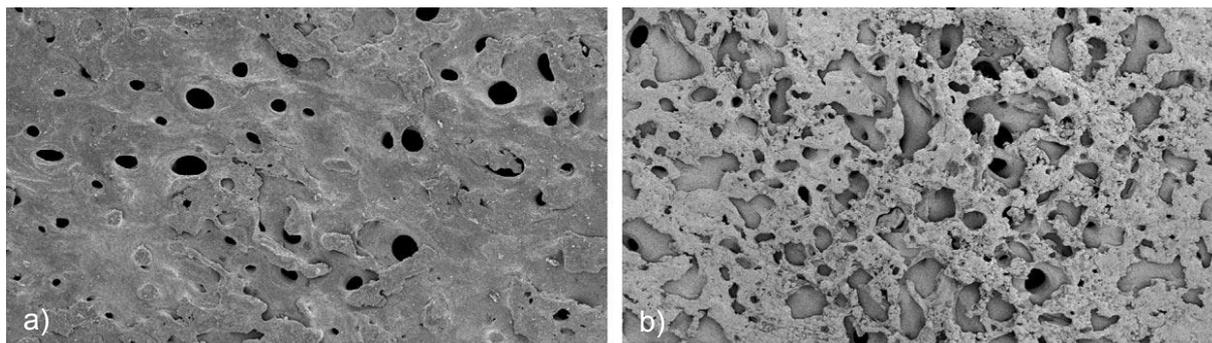


Abb. 1.8: Knöcherner Deckplatte eines humanen Wirbelkörpers. Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der Kontaktöffnungen zwischen Knochenmarkraum und Bandscheibe einer a) gesunden und b) kalzifizierten Deckplatte (aus Benneker et al., 2005).

Die Fusion stellt das Endstadium des Selbstheilungsversuches des Körpers hinsichtlich eines degenerierten Bewegungssegmentes dar (Smith et al., 2011). Die mit Instabilitäten und Fehlbelastungen einhergehenden Schmerzen gehen in diesem Stadium am betroffenen Bandscheibenfach häufig zurück. Aufgrund von Versteifungen des Bewegungssegmentes in Fehlstellungen bzw. aufgrund von Kompensationsversuchen des Körpers, die ausgefallene Mobilität des fusionierten Bewegungssegmentes durch eine Hypermobilität benachbarter Segmente auszugleichen, können jedoch Schmerzen in anderen Bereichen resultieren und sich somit die Schmerzlagerung verlagern.

1.4 Therapeutische Strategien

1.4.1 Gegenwärtige Behandlungskonzepte

Getreu dem Motto „no disc – no pain“ verfolgen chirurgische Behandlungsstrategien bei fortgeschrittener Bandscheibendegeneration gegenwärtig unverändert das Ziel, den Ort der Schmerzentstehung auszuräumen (Chan and Gantenbein-Ritter, 2012; Schizas et al., 2010). Den Goldstandard bildet dabei die interkorporale Fusion. Hierbei wird verändertes Bandscheibengewebe entfernt und die schmerzverursachende Instabilität des Bewegungssegmentes durch Versteifung beseitigt. Während die ursprüngliche Methode der Fusion mit dem Einbringen sogenannter „stand alone bone grafts“ in das Bandscheibenfach (d.h. von

Knochenspänen als alleinigem Träger und Initiator der Fusion) noch eine relativ hohe Komplikationsrate mit Pseudarthrosenbildung und Dislokation der Transplantate verzeichnete (Loguidice et al., 1988), berichten Studien nach der Einführung des Cages als primär lasttragendes Element erfolgreiche Fusionsraten von über 95 % (Kuslich et al., 2000; Ray, 1997). Mit der Einführung des Cages nahm die Zahl durchgeführter Fusionsoperationen zur Behandlung degenerativ veränderter Bandscheibensegmente dramatisch zu (Weinstein et al., 2006).

Da der Anstieg der Fusionsoperationen merklich mit der Einführung des Cages korrelierte, stellte sich die Frage, ob die Fusion nicht mitunter auch zum Standard in der Behandlung degenerativer Bandscheibenveränderungen geworden war, weil kein kritisches Augenmerk auf eine strenge Indikationsstellung gelegt wurde (Deyo et al., 2005). Dieser erstmals kritischen Betrachtungsweise der Fusion lagen Studien zugrunde, die ergaben, dass die Versteifung eines Bewegungssegmentes der Wirbelsäule nicht ohne Auswirkungen auf benachbarte Segmente blieb und hier zu einer Erhöhung des intradiskalen Drucks, Hypermobilität, beschleunigten Degeneration in den Nachbarsegmenten der Fusion und letztlich einer Steigerung des Risikos erneuter operativer Eingriffe führte (Chow et al., 1996; Park et al., 2004; Weinhoffer et al., 1995, Abb. 1.9). Zunehmend wurde deshalb in der Folge versucht, den Einsatz bewegungserhaltender Bandscheibenimplantate voranzutreiben, um nachteilige Effekte der Spondylodese zu vermeiden (Grob, 2009; Schizas et al., 2010; Abb. 1.10 a).

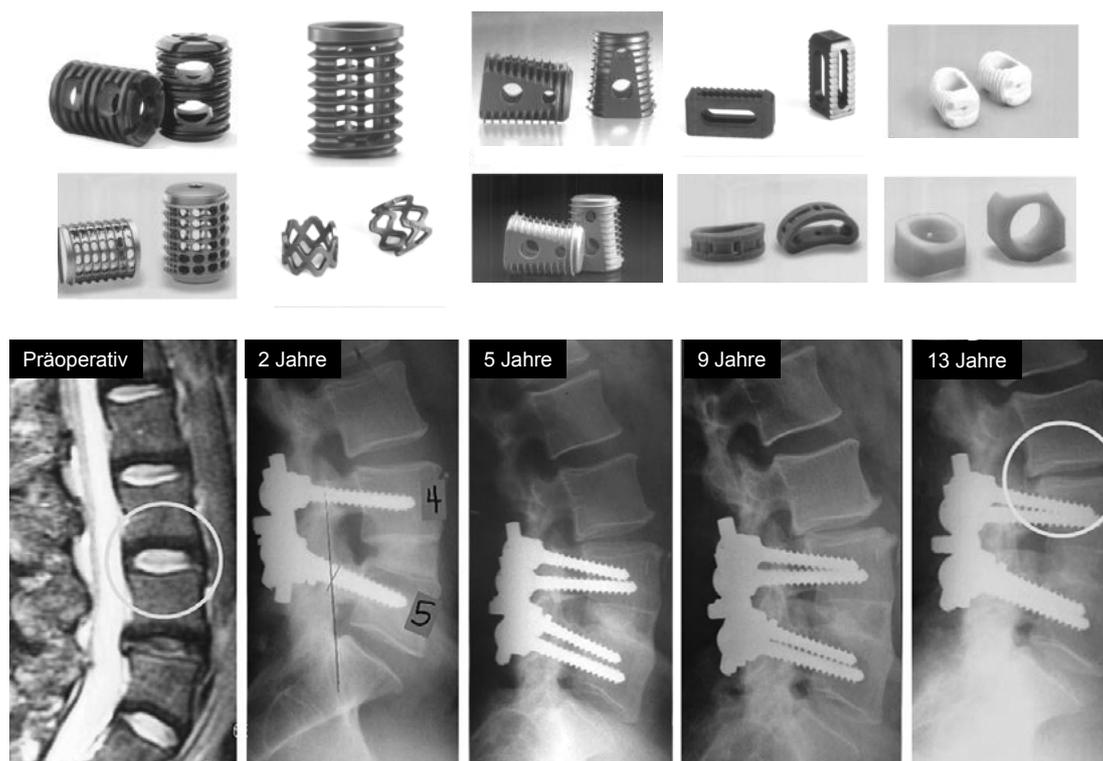


Abb. 1.9: Fusion. Auswahl verschiedener Cage-Implantate (oben) und zeitlicher Verlauf der Fusion im Bandscheibensegment L4-L5 (unten) in einem Patienten mit Ausbildung von Degenerationserscheinungen im Nachbarsegment (Kreis) des fusionierten Bandscheibenfaches (aus Cheh et al., 2007; Williams et al., 2005)

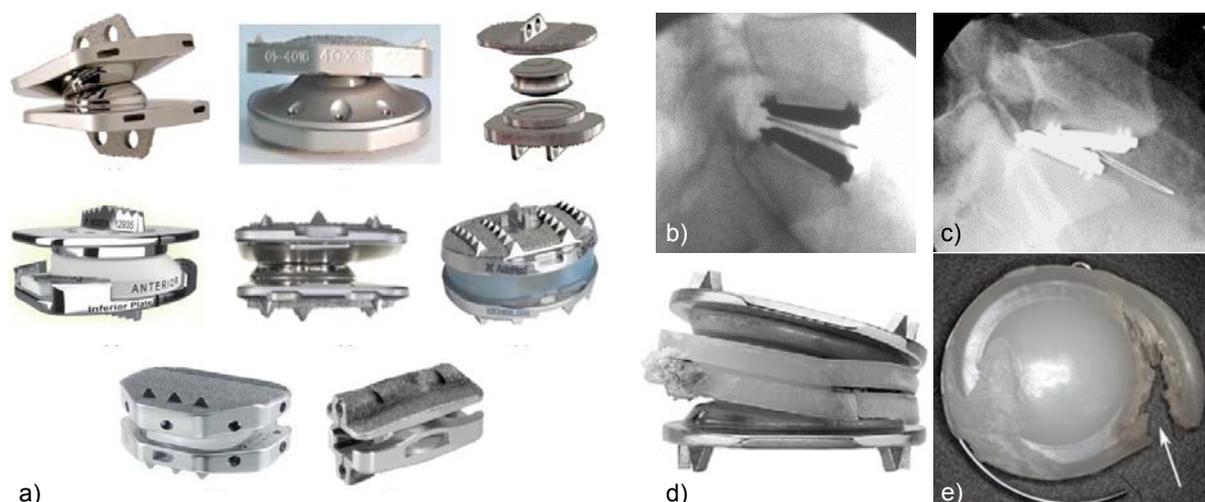


Abb. 1.10: Bewegungserhaltende Bandscheibenimplantate. a) Auswahl verschiedener Implantatdesigns (Serhan et al., 2011). b) Röntgenkontrolle des korrekten Sitzes einer Bandscheibenprothese (Harrop et al., 2008) und c) eines Implantatversagens mit Dislokation des Prothesenkernes aus dem implantierten Bandscheibenfach. d) Frontalansicht auf ein bewegungserhaltendes Bandscheibenimplantat mit frakturiertem Polyethylenkern in toto (c,d aus Taksali et al., 2004) und e) Aufsicht auf eine isolierte Polyethylenkomponente mit Randläsion nach einer Implantationszeit von 6,5 Jahren (Kurtz et al., 2007).

Die älteste bewegungserhaltende Bandscheibenprothese wurde Mitte der 80er Jahre an der Charité Berlin entwickelt (SB Charité). Dass bewegungserhaltende Bandscheibentotalprothesen die nachteiligen Folgeerscheinungen der Fusion umgehen und damit langfristig zu noch besseren klinischen Ergebnissen bei den behandelten Patienten führen, konnte bislang allerdings nicht nachgewiesen werden (Chou et al., 2009; Freeman and Davenport, 2006). Ein umfassender Literaturvergleich ergab keine deutlichen Unterschiede im klinischen Resultat zwischen diversen bewegungserhaltenden Bandscheibenimplantaten und der Fusion (van den Eerenbeemt et al., 2010). Obwohl bislang Degenerationserscheinungen im Nachbarsegment durch den Einsatz bewegungserhaltender Implantate nicht nachgewiesen werden konnten, belegen retrospektive Langzeitstudien, dass die Gleichwertigkeit im klinischen Erfolg beider Therapien von ein und demselben Mechanismus, nämlich der Ankylosierung des Bandscheibenfaches, herrührt (Putzier et al., 2006). So wiesen nach 17 Jahren Implantationszeit 60 % aller mittels der Charité behandelten Patienten eine Versteifung des operierten Bandscheibensegmentes auf und berichteten damit über einen signifikant besseren Behandlungserfolg als Patienten mit erhaltener Bandscheibenmobilität. Darüber hinaus geben Fallstudien über Implantatversagen und Reoperationen durch Dislokation der Implantate bzw. Einbrüche der Implantate in den Wirbelkörper, Metallabrieb an den Prothesen und die Entstehung von Facettengelenksarthrosen Anlass zur Überarbeitung gegenwärtiger Behandlungsstrategien (Kurtz et al., 2007; Murtagh et al., 2009; Stieber and Donald, 2006; Taksali et al., 2004, Abb. 1.10 c-e).

1.4.2 Regenerationsstrategien

Um die nachteiligen Effekte bisheriger Behandlungskonzepte langfristig zu umgehen, hat in den letzten Jahren mit Aufkommen regenerativer Therapiekonzepte ein Paradigmenwechsel in der langfristigen Strategie zur Behandlung der Bandscheibendegeneration stattgefunden. Entgegen bisheriger chirurgischer Konzepte ist es nun das langfristige Ziel, körpereigene Strukturen weitestmöglich zu erhalten und geschädigten Geweben zur Regeneration in den gesunden Zustand zurück zu verhelfen. Gerade im Frühstadium der Bandscheibendegeneration, bei noch erhaltener struktureller und funktioneller Integrität des Anulus, ist es demnach

die Zielsetzung, lediglich den Nucleus mittels minimal-invasiver Operationsmethoden vollständig oder partiell zu entfernen und durch eine biologische Matrix zu ersetzen, die auf lange Sicht der Bandscheibe eine Regeneration ermöglicht. Für diese Hilfe zur Selbsthilfe sind gegenwärtig diverse Nucleusersatzstrategien in Untersuchung (Chan and Gantenbein-Ritter, 2012; Kepler et al., 2011).

Das Konzept des Tissue Engineering basiert auf der Idee, natürliche Gewebestrukturen über die Bereitstellung einer organischen Matrix wiederaufzubauen, indem ihnen ein Gerüst zur Verfügung gestellt wird, in das native Zellen einwachsen bzw. in das Zellen diverser Vorläuferlinien a priori zur Differenzierung in situ integriert werden können (Pearson et al., 2002, Abb. 1.11).

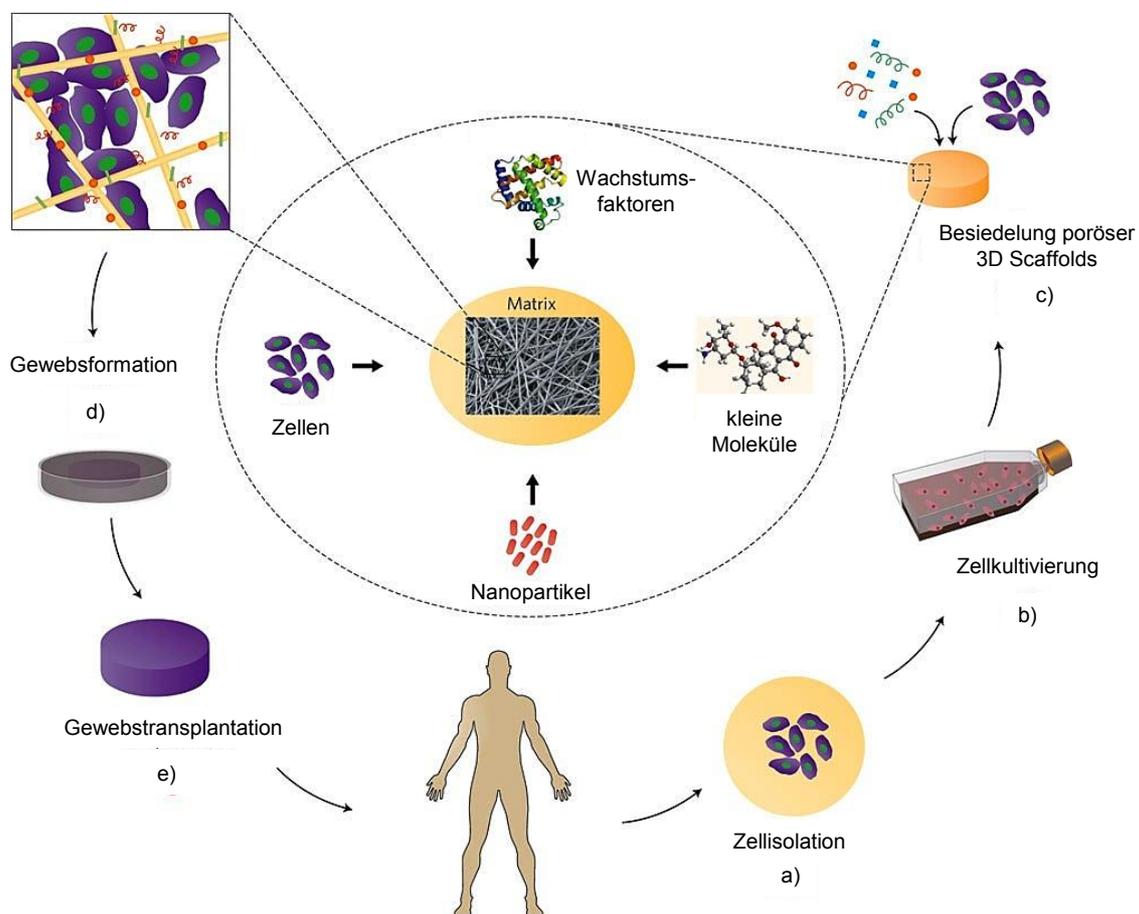


Abb. 1.11: Konzept des Tissue Engineering. Die Grundlagen des TE basieren darauf, dem Körper eine biologische Ersatzmatrix zur Verfügung zu stellen, anhand derer sich neues Gewebe ausbilden kann. Hierzu werden Zellen aus dem Körper isoliert (a), in vitro zunächst in 2D kultiviert (b) und anschließend eine biologische Matrix mit den Zellen besiedelt (c). Mit oder ohne die Kombination von wachstumsmodifizierenden Komponenten (Wachstumsfaktoren, Nanopartikel usw.) bildet sich ein Gewebersatz aus (d), der in den Patienten implantiert werden kann (e, modifiziert nach Dvir et al., 2011).

Vielversprechende Einsatzgebiete bieten biologische Therapiestrategien gegenwärtig für deren Einsatz zur Regeneration vaskularisierter Gewebe (Borenstein et al., 2002; Griffith, 2002; Levenberg, 2005; Levenberg et al., 2005). Um natürliche Strukturen wiederherzustellen, bedarf es Zellteilung, -differenzierung und einer vermehrten Synthese extrazellulärer Matrix. Hierzu ist ein erhöhter Nährstoffbedarf notwendig, um diese Vorgänge zu unterhalten. Im Bereich der Bandscheibe sind dieser Vision jedoch enge Grenzen gesetzt. Da die Bandscheibe bereits im gesunden Zustand aufgrund ihrer Avaskularität einer kritischen Ernährungssituation der Bandscheibenzellen ausgesetzt ist und sich im Zuge der Bandscheibendegeneration diese Bedingungen durch Sklerosierung der Deckplatten noch zusätzlich verschlechtern, stehen Regenerationsversuche an der Bandscheibe gegenwärtig noch immer unter einem fragwürdigen Licht.

1.4.3 Nukleotomie, Nukleusersatz und Tissue Engineering

Im Frühstadium der Bandscheibendegeneration, wenn die schmerzhaften Veränderungen vorwiegend den Nucleus pulposus betreffen und der Anulus noch weitestgehend intakt ist, ist es bislang ein weitverbreitetes chirurgisches Vorgehen, lediglich den Nucleus im Zuge einer Nukleotomie auszuräumen (Frank, 1995; Mayer, 1994). Hierdurch wird kurzfristig sehr effektiv der Ort der Schmerzentstehung ausgeräumt und auch schmerzverursachende Radikulopathien wie z.B. Nervenwurzelkompressionen durch Bandscheibenvorwölbungen behoben. Gegenwärtig wird die entstehende Kavität post Nukleotomie im klinischen Alltag unaufgefüllt belassen.

In-vitro-Studien sowohl an humanen als auch tierischen Präparaten konnten belegen, dass mit der Durchführung einer Nukleotomie ohne Wiederauffüllen des Bewegungssegmentes unmittelbar eine Instabilität am betreffenden Bandscheibenfach folgt, die mit einem signifikanten Steifigkeitsverlust der Bandscheibe und einer Steigerung der Laxizität des Bewegungssegmentes einhergeht (Goel et al., 1986; Heuer et al., 2008a; Heuer et al., 2007b; Smolders et al., 2012; Zollner et al., 2000). Der Steifigkeitsverlust resultiert aus dem (partiellen) Verlust des hydrostatischen Zentrums. Die Bandscheibe verliert in der Folge nicht nur an Höhe, sondern sieht sich zudem sekundär über den Verlust der

stabilitätsverleihenden Vorspannung der Anulusfasern einer Umverteilung der natürlicherweise auftretenden Spannungs- und Dehnungskomponenten innerhalb des Bandscheibenfaches ausgesetzt (Frei et al., 2001; Heuer et al., 2008b). Der Anulus erfährt eine unphysiologische Steigerung der axialen Kompressionsbeanspruchung, auf die dieses Kompartiment natürlicherweise nicht ausgelegt ist (Iatridis and ap Gwynn, 2004; O'Connell et al., 2011; Shirazi-Adl et al., 1984).

Auf lange Sicht führen Veränderungen der Biomechanik der Bandscheibe zu degenerativen Folgeerscheinungen. So zeigten In-vivo-Studien an Tiermodellen wie Kaninchen und Hund (Hutton et al., 1998; Kroeber et al., 2005; Kroeber et al., 2002), dass allein die Erhöhung der mechanischen Belastung der ansonsten intakten Bandscheibe, induziert z.B. über das Anbringen eines Fixateur externes, die Degeneration des Zwischenwirbelraumes verursachen kann. Durch die Nukleotomie nimmt überdies die strukturelle Schädigung der Bandscheibe Einfluss auf das Fortschreiten des anschließenden Degenerationsverlaufes am Bewegungssegment (Adams et al., 2000; Guder et al., 2009).

Um die degenerativen Folgeerscheinungen, die sich an die Nukleotomie anschließen, am Bewegungssegment langfristig aufhalten zu können, müssen die mechanischen Verhältnisse innerhalb der Bandscheibe unmittelbar wiederhergestellt werden (Ahrens et al., 2009). Dazu gehört neben der Wiederherstellung der Bandscheibenhöhe auch die der mechanischen Interaktion zwischen den unterschiedlichen Bandscheibenkompartimenten. Wie Finite-Elemente-(FE-) Analysen zeigten, kann nur mittels eines lückenlos gefüllten Bandscheibenzentrums eine physiologische Lastverteilung innerhalb des Bewegungssegmentes erreicht werden (Dahl et al., 2010). V.a. aus mechanischer Sicht haben sich in der Folge injizierbare Hydrogele als potentielle Nukleusersatzmaterialien erwiesen. Durch ihre gelartige Textur sind diese nicht nur in der Lage, die Kavität der Bandscheibe vollständig wiederaufzufüllen, sondern sie erwiesen sich darüber hinaus aufgrund der galertartigen Beschaffenheit des Nukleus pulposus als besonders geeignete Stellvertreter für natürliches Nukleusgewebe (Boelen et al., 2005; Thomas et al., 2003). Hydrogele bieten demnach Zellen eine ideale Matrix zur Regeneration der Bandscheibe.

Nach Chan und Gantenbein-Ritter (2012) muss ein ideales Hydrogel als Nukleusersatz für die erfolgreiche Applikation an der Bandscheibe die folgenden Kriterien erfüllen: 1) minimal invasiv implantierbar, 2) kurze Aushärtezeit nach Injektion zur Vermeidung von Implantatextrusion, 3) geeignete mechanische Eigenschaften inkl. gewisser Degradationsresistenz, 4) hydrophile Eigenschaften vergleichbar dem Schwellverhalten des Nukleus, 5) Unterstützung des Zellwachstum und der Produktion extrazellulärer Matrix, 6) Biokompatibilität auch der Abbauprodukte.

Gegenwärtig existiert eine Vielzahl an Untersuchungen, die unterschiedlichste Biomaterialien als mechanisches Äquivalent des natürlichen Vorbildes, des Nukleus pulposus, analysieren. Diese Untersuchungen beruhen in einer Vielzahl der Fälle auf der reinen Erhebung der mechanischen Eigenschaften der Materialien. In sogenannten confined compression Tests wurden chitosan- (Sasson et al., 2012), hyaluronsäure- (Cloyd et al., 2007), kollagen- (Calderon et al., 2010) oder zellulosehaltige Hydrogele (Gupta et al., 2011) sowie biphasische Seidenscaffolds (Park et al., 2012) getestet.

Obwohl bereits präklinische Studien am Tiermodell in vivo (Leckie et al., 2012; Revell et al., 2007; Woiciechowsky et al., 2012) als auch humane klinische Studien (Berlemann and Schwarzenbach, 2009) über den erfolgreichen Einsatz von Hydrogelen an der Bandscheibe berichteten, blieb der breitflächige Einsatz dieser neuen Behandlungsstrategie bislang aus. Dies liegt nicht zuletzt daran, dass aussagekräftige Studien fehlen, die fundiert die biomechanische Eignung der verwendeten Materialien an der Bandscheibe unter Beweis stellen. In dieser Hinsicht essentiell ist die Fragestellung, ob von Beginn der Implantation an der Ersatz in der Lage ist, das mechanische Verhalten des Nukleus widerzugeben und somit der Bandscheibe mechanische Kompetenz zu verleihen. V.a. im Rahmen des TE basiert das Funktionsprinzip im Einsatz besagter Hydrogele auf der Tatsache, dass sich das Biomaterial in die natürliche Umgebung der Bandscheibe integriert und so die Biomechanik des Bewegungssegmentes langfristig wiederherstellt. Biologische Therapieansätze benötigen demnach Zeit, um dem Körper die Möglichkeit zur Formation der gewünschten, mechanisch kompetenten Struktur zu geben. Dies kann teilweise einen langwierigen Prozess darstellen und steht Bemühungen entgegen, die postoperative Ruhigstellung des Patienten in der Phase der klinischen

Rekonvaleszenz möglichst kurz zu halten. Nur durch ein unmittelbar, aber auf lange Sicht tragfähiges Ersatzmaterial für die Bandscheibe kann, einhergehend mit der postoperativen Mobilisierung des Patienten, eine ausreichende und auch notwendige mechanische Stimulation des TE-Konstrukts gewährleistet werden, um physiologische Differenzierungsprozesse anzuregen (Matsumoto et al., 1999; Neidlinger-Wilke et al., 2006; Walter et al., 2011; Wuertz et al., 2007).

1.5 Präklinische Forschung

Bevor eine neuartige Behandlungsmethode im Rahmen der klinischen Testung zum Einsatz am Menschen kommen kann, sind eine Vielzahl präklinischer Untersuchungen von Nöten, die ein hohes Maß an Zuverlässigkeit und Sicherheit unter Vermeidung von gesundheitlichen Gefahren für den Menschen vermuten lassen. Die wohl bekannteste internationale regulatorische Instanz, die Vorgaben zu Ausmaß und Art präklinischer Tests vor der klinischen Erprobung vorgibt, ist die amerikanische FDA (Food and Drug Administration). Auf nationaler Basis gibt das Medizinproduktegesetz als Umsetzung der EU-Richtlinien 90/385/EWG, 93/42/EWG und 98/79/EG diverse Standards an die Voraussetzungen und das Inverkehrbringen einer Vielzahl an implantierbaren medizinischen Geräten, Medizinprodukten und In-vitro-Diagnostika vor. Gerade an die Zulassung regenerativer Behandlungskonzepte wird eine Vielzahl von Anforderungen an In-vitro-Untersuchungen gestellt, die neben Daten zur Toxizität und Biokompatibilität v.a. die mechanische Funktionalität des Biomaterials herausarbeiten.

1.5.1 Das Schaf als Tiermodell in vivo und in vitro

Während die Verfügbarkeit humaner Präparate zum Zweck der biomechanischen Implantattestung in vitro aus vornehmlich ethischen Gründen streng limitiert ist, kann gerade im Nutztiersektor relativ leicht Zugang zu Präparaten für die Entwicklung und Durchführung neuer Therapiestrategien erlangt werden. Großtiermodelle sind in diesem Zusammenhang von größter Bedeutung für die Prüfung der Eignung und Praktikabilität chirurgischer Methoden, für die vor allem die Größe der Tiere eine

entscheidende Rolle spielt. Gerade das Schaf hat sich in diversen Bereichen des muskuloskelettalen Systems als geeignetes In-vivo- und In-vitro-Tiermodell zur Erforschung klinisch relevanter Fragestellungen erwiesen (Martini et al., 2001).

In vivo dient das Schaf unter anderem als mittlerweile gängiges Modell im Bereich der Osteoporose- und Frakturheilungsforschung (Claes et al., 2011; Lill et al., 2003). Mit zunehmender Häufigkeit findet es aber auch im Bereich der experimentellen Wirbelsäulenchirurgie Anwendung. Dabei reichen die Einsatzgebiete von der Etablierung neuer Operationsmethoden am Tiermodell (Benneker et al., 2012) bis hin zur konkreten Optimierung humanmedizinisch relevanter Fragestellungen wie z.B. einer verbesserten Verankerung von Pedikelschrauben in osteoporotischen Wirbelkörpern (Shi et al., 2012) oder der Erprobung neuartiger Behandlungsstrategien zur Verbesserung der Heilungsabläufe nach Spondylodese (Scholz et al., 2010). Seit den frühen 1990ern findet das Schaf überdies zunehmend Verwendung im Bereich der Bandscheibenforschung; als Degenerationsmodell (Guder et al., 2009; Melrose et al., 2012; Moore et al., 1992; Osti et al., 1990), bei der Evaluierung unterschiedlicher Nukleotomietechniken (Gunzburg et al., 1993), der Untersuchung der Heilungsvorgänge des Anulus fibrosus (Ahlgren et al., 1994; Ledet et al., 2009) und bzgl. allgemeiner Ansätze zur Regeneration der Bandscheibe (Ghosh et al., 2012; Wei et al., 2009).

Während nahezu alle der frühen In-vivo-Studien die Verwendung des Schafes als Versuchstier lediglich damit rechtfertigten, dass das Schaf in der vorliegenden Fragestellung gewisse Ähnlichkeiten z.B. in der betreffenden anatomischen Struktur aufwies, die es zu untersuchen galt, begründeten Studien ab 1997 die Eignung des Schafes für therapeutische sowie pathogenetische Fragestellungen im Bereich der Wirbelsäule durch Untersuchungen, die eine allgemeine Vergleichbarkeit der Biomechanik und der Anatomie zwischen Schaf und Mensch in vitro belegten (Wilke et al., 1997a; Wilke et al., 1997b). Bislang liegen jedoch keine validen In-vivo-Daten vor, die die Tauglichkeit des Schafes als Modell in der experimentellen Wirbelsäulenforschung beurteilen und somit eine Aussage darüber ermöglichen, ob erlangte Ergebnisse aus Tierversuchen am Schaf Rückschlüsse auf den Menschen zulassen. In Ermangelung der Kenntnis der physiologischerweise auftretenden Belastungen an der Wirbelsäule des Vierbeiners wurden biomechanische Tests an Wirbelsäulensegmenten des Tieres daher bislang ausschließlich aus den beim

Menschen bekannten Belastungen abgeleitet (van der Veen et al., 2005; van der Veen et al., 2008; van der Veen et al., 2007).

Gerade zur Beurteilung des Erfolges regenerativer (zellbasierter) Behandlungsstrategien im Rahmen der präklinischen Forschung am Tiermodell ist es essentiell, dass die mechanischen Bedingungen, denen das Biomaterial im Tiermodell ausgesetzt ist, denen des Menschen entsprechen. Gegenwärtig existieren jedoch keine Studien, die belegen, dass die Belastung der ovinen Bandscheibe in vivo der des Menschen entspricht.

1.5.2 Die Methode der Finiten Elemente

Seit den frühen Anfängen numerischer Berechnungsverfahren in der Mitte des letzten Jahrhunderts ist der Mensch daran interessiert, mechanisches Verhalten vorhersagen zu können (Argyris, 1954; Courant, 1943; Turner et al., 1956). Während sich diese Bestreben anfangs auf ingenieurwissenschaftliche Disziplinen wie z.B. das statische Verhalten von Bauwerken oder die Konstruktion von Flugzeugen beschränkten, haben sie mittlerweile auch Eingang in die medizinische Forschung gehalten. Um im Rahmen der präklinischen Forschung aufwendige In-vivo- und In-vitro-Untersuchungen in ihrer Anzahl zu reduzieren, bedient man sich in letzter Zeit zunehmend computergestützten Prozesssimulationen wie Finite-Elemente-Analysen (In-silico-Analysen).

Die Methode der Finiten Elemente stellt ein Berechnungsverfahren zur näherungsweise Lösung von partiellen Differentialgleichungen dar, bei dem ein Objekt in beliebig viele endliche (finite) Elemente unterteilt und dadurch ein modellhaftes Abbild der Natur wiedergegeben wird. Das Modell kann mittels Materialgesetzen gespeist werden und ermöglicht so hochauflösend die Vorhersage des Spannungs- und Dehnungszustands von geometrisch und materiell komplizierten, nichtlinearen Strukturen. Die Eckpunkte der Elemente, die sogenannten Elementknoten, die an den Kontaktstellen der einzelnen Elemente zueinander liegen, können mit Kräften, Momenten, Verschiebungen oder anderen Last- und Randbedingungen beaufschlagt werden, und so z.B. die Steifigkeit der Gesamtstruktur aus den bekannten Steifigkeiten der Einzelelemente bestimmt werden.

Im Bereich der Bandscheibenforschung ist die FE-Methode in der Zwischenzeit zu einem festen Bestandteil zur Vorhersage pathogenetischer Vorgänge, der Machbarkeit therapeutischer Strategien und der Simulation der Heilungsvorgänge des Körpers geworden. So findet sie v.a. Anwendung in der Grundlagenforschung bezüglich der mechanischen Hintergründe der Bandscheibendegeneration (Kim et al., 1991; Kumaresan et al., 2001; Lotz et al., 1998; Natarajan et al., 1994; Natarajan et al., 2006; Rohlmann et al., 2006; Schmidt et al., 2007), der Risikobewertung und Optimierung neuartiger chirurgischer Strategien (Noailly et al., 2005; Rohlmann et al., 2007; Rohlmann et al., 2005; Schmidt et al., 2009a; Schmidt et al., 2009b) und dient als mittlerweile unabkömmliches Werkzeug zur Lösung biomechanischer Fragestellungen in enger Zusammenarbeit mit In-vivo- und In-vitro-Untersuchungen (Heuer et al., 2007a; Lafage et al., 2007; Pitzen et al., 2002; Schmidt et al., 2008a; Schmidt et al., 2008b; Shirazi-Adl et al., 1986; Shirazi-Adl et al., 2010).

Die FE-Methode ermöglicht grundlegende Einblicke in das Funktionsprinzip der Bandscheibe. So können mittels numerischer Analysen z.B. Vorhersagen über Diffusionsvorgänge innerhalb der Bandscheibe getroffen werden (Selard et al., 2003; Soukane et al., 2007). Diese Möglichkeit stellt ein wertvolles Werkzeug im Rahmen der präklinischen Implantattestung vor allem in Bezug auf regenerative Therapiestrategien dar, weil somit eine Aussage darüber möglich ist, ob ein neuartiges Nukleusersatzmaterial die Fähigkeit besitzt, die Physiologie der Bandscheibe nachzuahmen bzw. wiederherzustellen. Eine eingeschränkte Nährstoffversorgung trägt nachweislich zur Degeneration der Bandscheibe bei (Soukane et al., 2007). Um langfristig eine gesunde Bandscheibe bzw. eine Regeneration der natürlichen Bandscheibenstrukturen zu erlangen, ist daher ein ausreichender Flüssigkeits- und Soluttransport innerhalb des Zwischenwirbelraumes von Nöten (Ferguson et al., 2004). Flüssigkeitsverschiebungen und daran gekoppelte Solutbewegungen innerhalb der Bandscheibe können allerdings nur dann in einem ausreichenden Maße ablaufen, wenn die mechanische Funktionsfähigkeit der Bandscheibe uneingeschränkt wiederhergestellt werden kann. Aufgrund der mechanischen Wechselwirkungen zwischen Nukleusersatz und umliegenden spinalen Strukturen, sollte eine erfolgreiche therapeutische Strategie darauf abzielen, annähernd normale mechanische Bedingungen für das gesamte Bewegungssegment und nicht nur für den Nukleus an sich zu reproduzieren. Im

Zuge von Nukleusersatzstrategien der Bandscheibe müssen dementsprechend die natürlicherweise auftretenden Spannungen und Dehnungen eines gesunden Bewegungssegments wiederhergestellt werden.

Ein für die Funktionalität der Bandscheibe wesentliches Kriterium ist die Wechselwirkung zwischen Nukleus und umgebenden Kompartimenten, Anulus und Deckplatten. Durch die Nukleotomie als Voraussetzung zur Implantation eines Nukleusersatzes wird diese Wechselwirkung über die Zerstörung natürlicher Grenzflächen zwischen Nukleus und Anulus einerseits und zwischen Nukleus und benachbarten knorpeligen Deckplatten andererseits aufgehoben.

Bislang existieren keine Studien, die das Ausmaß iatrogen bedingter struktureller Schädigungen im Rahmen der Nukleotomie *in silico* quantifizieren und somit wesentliche Anforderungskriterien an Nukleusersatzstrategien stellen, damit mittels dieser die mechanische Kompetenz der Bandscheibe effektiv wiederhergestellt werden kann.

1.6 Ziele der Dissertation

Die Ziele der vorliegenden Dissertation waren, i) in einem kombinierten experimentellen Versuchsansatz aus In-vivo-, Ex-vivo-, In-vitro- und In-silico-Analysen, neuartige Hydrogele als Nukleusersatz im Tiermodell Schaf auf ihre mechanische Eignung zum Einsatz für TE- Strategien an der Bandscheibe zu untersuchen und ii) das Schaf als Tiermodell im Bereich der Bandscheibenforschung näher zu charakterisieren. Hierfür kam der folgende stufenweise experimentelle Ablauf zum Einsatz:

- 1) **In-vivo-Untersuchungen:** Über je 24 Stunden wurden intradiskale Druckmessungen an drei Schafen durchgeführt. Die gesamte Datenbasis eines Schafes wurde in Erholungs- und Aktivitätsphasen eingeteilt und die entsprechenden mittleren Druckwerte der beiden Phasen erhalten. **Ex vivo** wurden anschließend die Kräfte ermittelt, die den In-vivo-Druckwerten während Erholungs- und Aktivitätsphasen entsprachen. Darüber hinaus wurden die Bandscheibendrucke aller untersuchten Schafe während unterschiedlicher Aktivitäten analysiert, und so eine Datenbasis zur Verfügung gestellt, die es ermöglicht, die Eignung des Schafes für regenerative Therapiestrategien an der Bandscheibe genauer abwägen zu können.
- 2) **In-vitro-Untersuchungen:** Aus den Ergebnissen der In-vivo-/ Ex-vivo-Untersuchungen wurde ein physiologisches Lastprotokoll für die ovine Bandscheibe abgeleitet, das den natürlichen Wechsel aus Erholungs- und Aktivitätsphasen berücksichtigte. Das entwickelte Lastprotokoll diente zur Untersuchung, ob die mechanische Kompetenz der Bandscheibe nach Nukleotomie mittels neuartiger Nukleusersatzmaterialien wiederhergestellt werden kann.
- 3) **In-silico-Untersuchungen:** Um die Ergebnisse der In-vitro-Untersuchungen besser interpretieren zu können, wurden Finite-Elemente-Analysen an einer humanen Bandscheibe durchgeführt. Durch die auf die Physiologie des Menschen adaptierten Simulationen sollte das Ausmaß nukleotomiebedingter Schädigungen der Bandscheibe quantifiziert werden.

Diese Arbeiten sind wie folgt publiziert:

Reitmaier, S., Shirazi-Adl, A., Bashkuev, M., Wilke, H.J., Gloria, A., Schmidt, H., 2012a. In vitro and in silico investigations of disc nucleus replacement. *Journal of the Royal Society, Interface / the Royal Society* 9, 1869-1879.

Reitmaier, S., Wolfram, U., Ignatius, A., Wilke, H.J., Gloria, A., Martin-Martinez, J.M., Silva-Correia, J., Miguel Oliveira, J., Luis Reis, R., Schmidt, H., 2012b. Hydrogels for nucleus replacement-Facing the biomechanical challenge. *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials* 14C, 67-77.

Schmidt, H., Reitmaier, S., 2013. Is the ovine intervertebral disc a small human one?: A finite element model study. *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials* 17, 229-241.

Reitmaier, S., Schmidt, H., Ihler, R., Kocak, T., Graf, N., Ignatius, A., Wilke, H.-J., submitted. Investigations on Intradiscal Pressures During Daily Activities: An In Vivo Study Using The Merino Sheep. *PLoS One*.

2 Material und Methoden

Das folgende Kapitel ist dem Arbeitsfluss der Experimente entsprechend gegliedert in In-vivo-, Ex-vivo, In-vitro- und In-silico-Untersuchungen (siehe 2.1 – 2.4). Hinsichtlich der In-vivo-Untersuchungen ergab sich im Rahmen der Ergebnisauswertung eine zweite Fragestellung zur grundlegenden Vergleichbarkeit des gewählten Tiermodells mit dem Menschen. Die hierfür relevanten Untersuchungen mit Ermittlung des intradiskalen Druckes während unterschiedlicher Aktivitäten des Tieres wurden darauffolgend als zweiter Teil der In-vivo-Untersuchungen (siehe 2.5) genauer analysiert.

2.1 In-vivo-Untersuchungen (Teil 1)

Der Tierversuch zur Ermittlung des intradiskalen Druckes (IDP) in der Lendenwirbelsäule des Schafes wurde gemäß des Tierschutzgesetzes in der Fassung der Bekanntmachung vom 18. Mai 2006 vom zuständigen Regierungspräsidium Tübingen genehmigt (Tierversuch Nr. 1032, Genehmigung am 12. Oktober 2010). Sowohl die ordnungsgemäße Haltung, Fütterung und Pflege als auch alle tierschutzrelevanten Eingriffe an den Versuchstieren erfolgten unter strikter Einhaltung der Maßgaben der FELASA (Federation of European Laboratory Animal Science Associations).

2.1.1 Versuchstiere

Für die Untersuchungen wurden drei Schafe der Rasse Merino verwendet (Tabelle 2.1). Das Gewicht der Tiere betrug 86, 83 und 102 kg. Die Tiere wurden von einem nahegelegenen Schäfer ca. 4 Wochen vor Versuchsbeginn im Tierforschungszentrum „Oberberghof“ der Universität Ulm eingestallt. Transport, Ortswechsel und Änderung des gewohnten Personenkreises stellen Stressoren für die Tiere dar. Durch den vierwöchigen Eingewöhnungszeitraum konnten sich die Tiere mit der neuen Umgebung, dem Stall und dem Pflegepersonal sowie den versuchsdurchführenden Personen vertraut machen und auf diesem Wege den

Stress vor Versuchsbeginn abbauen. Gehalten wurden die Tiere in der Gruppe zusammen mit Schafen aus anderen Tierversuchsprojekten in einem Stall in Tiefstreuboxen auf Sägespänen und Stroh. Die Tiere unterlagen einem natürlichen Tag-/ Nachtrhythmus aus je 12-stündiger Licht- und Dunkelphase. Bei freier Bewegung bestand jederzeit Zugang zu Heu und Wasser aus Selbsttränken.

Tabelle 2.1: Angaben zu den Versuchstieren.

Identifikationsnummer	Körpergewicht	Alter	Implantierte Bandscheibenfächer
201	86 kg	ca. 4	L2-L3, L4-L5
202	83 kg	ca. 3	L2-L3, L4-L5
107	102 kg	ca. 5	L2-L3, L4-L5

2.1.2 Messtechnik

Für die Messungen wurden Siliziumsensoren (\varnothing 1,45 mm, FMSPEZ50, Mammendorfer Institut für Physik und Medizin GmbH, Mammendorf, Deutschland, Abb. 2.1) verwendet, die das aufgrund einer Deformation der druckempfindlichen Membran an der stahlummantelten Spitze der Sonde erzeugte Spannungssignal über ein Silikonkabel an den Sender einer Telemetrieinheit (BIOTEL 33 hybrid, Glonner Electronic GmbH, Martinsried, Germany) weiterleiteten.

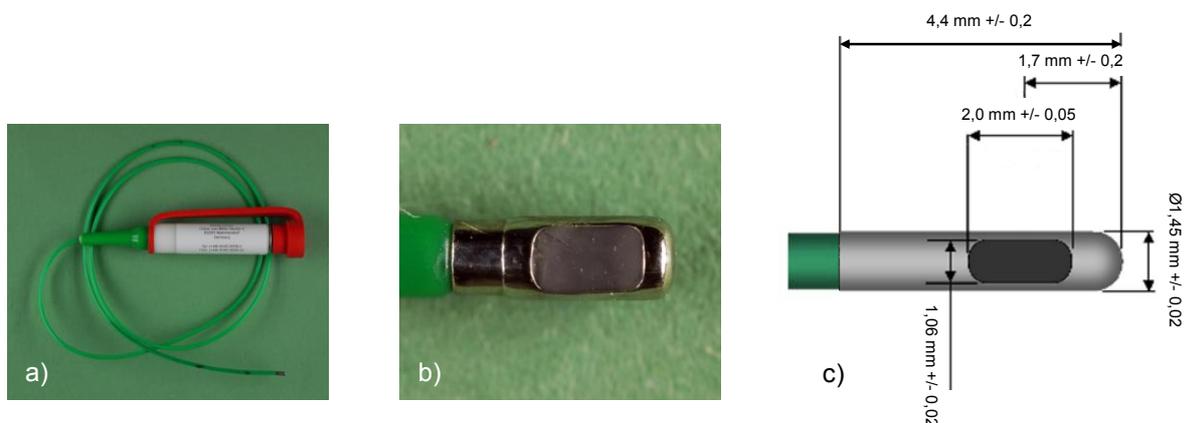


Abb. 2.1: Messelektronik. a) Verwendeter Messsensor zur intradiskalen Druckmessung. Die makroskopische (b) als auch die schematische Nahaufnahme (c) zeigen den stahlummantelten Sensorkopf inklusive der Aussparung für die druckempfindliche Membran.

Das mechanische Messprinzip der Sonde basiert auf dem eines piezoresistiven Druckwandlers, bei dem die Generierung des Signals über eindiffundierte Siliziumkristalle als Messwiderstände erfolgt. Durch Dehnung der Membran entsteht eine zur Dehnung proportionale Spannung, die gemessen werden kann. Die Messungen erfolgen direkt, d.h. ohne Dämpfung der Signale durch ein Übertragungsmedium.

Für den Tierversuch wurde der batteriebetriebene Sender in einem kleinen Rucksack auf dem Rücken der Schafe befestigt. Nach Einspeisen des analogen Spannungssignals in den Empfänger der Telemetrieinheit wurde dieses mittels eines Messverstärkers (DMCplus; HBM Hottinger Baldwin Messtechnik, Darmstadt, Deutschland) potenziert und computergestützt (catman[®], HBM Hottinger Baldwin Messtechnik, Darmstadt, Deutschland) zeitsynchron in einer Frequenz von 50 Hz aufgezeichnet.

Bedingt durch den Aufbau des Sensors werden Spannungskomponenten nur in vertikaler Richtung bei entsprechender Platzierung erfasst. Die Gesamtspannung setzt sich im Wesentlichen aus zwei Spannungskomponenten zusammen, einem hydrostatischen Druck der interstitiellen Flüssigkeit und einer axialen effektiven Spannung aller im Nukleus befindlichen soliden Strukturen wie kollagenen Fasern, Proteoglykanen etc. Der Schafsnukleus besteht zu etwa 80 - 90% aus Wasser (Beckstein et al., 2008). Dementsprechend überwiegt der hydrostatische Druck. Durch äußere Belastung verliert die Bandscheibe an Wasser, was dazu führt, dass die effektive Spannung der soliden Struktur vergrößert wird. Der Nukleus wird in der Folge dann nicht mehr überwiegend von der hydrostatischen Spannung, sondern auch durch deviatorische Spannungskomponenten (z.B. unterschiedliche Scherspannungskomponenten) geprägt, die mit dem Messsensor nicht erfassbar sind und eben nur durch die axiale Spannungskomponente ausgedrückt wird. Unter Berücksichtigung all dieser technischen Details wird das output-Signal der Druckmesssonde in der vorliegenden Arbeit im Weiteren zusammengefasst als intradiskaler Druck bezeichnet.

Die Aufzeichnung und Echtzeitdarstellung der ursprünglichen Spannungswerte in Volt (V) erfolgte durch die vor dem Versuch durchgeführte Kalibrierung der Sonden als Druckwert in Megapascal (MPa). Für die Kalibrierung wurden die Druckmesssonden in einen dicht abschließenden, wassergefüllten Druckbehälter

eingebraucht und unter Aufbringung einer Kompressionslast auf den Stempel des Behälters wurde ein kontinuierlich steigender Druck erzeugt. Dem jeweils eingestellten Druckwert, der über ein am Druckbehälter angebrachtes Manometer genau eingestellt und abgelesen werden konnte, wurde der entsprechende, von der Messsonde detektierte Spannungswert zugeordnet und auf diesem Wege eine individuelle Kalibrierkurve der Druckmesssonde erstellt, die für die Messungen im Programm hinterlegt wurden.

2.1.3 Operationsvorbereitung

Zwei Tage vor der Operation wurden die Tiere nüchtern gestellt. Sie erhielten kein Futter bei weiterhin uneingeschränktem Zugang zu Wasser. Am Operationstag wurden die Tiere im Stall mittels Xylazin (Rompun[®] 2 %, 0,2 mg/kg KG, Bayer, Leverkusen, Deutschland) i.m. sediert, zum perioperativen Infektionsschutz mit Amoxicillin-Trihydrat (Veyxyl[®], 7,0 mg/kg KG, VeyxPharma GmbH, Schwarzenborn, Deutschland) und als Schmerzprophylaxe mit Carprofen (Rimadyl[®], 4,0 mg/kg KG, Pfizer, Karlsruhe, Deutschland) versorgt. Nach merklichem Eintreten der Sedation wurden die Tiere in einem Transportwagen in den OP-Vorbereitungsraum gebracht. Zur intravenösen Narkoseeinleitung mittels Thiopental (Thiopental Inresa 0,5 g, 5,0 mg/kg KG, Dosierung titriert nach Wirkung, Inresa GmbH, Freiburg, Deutschland) wurde den Tieren ein Venenkatheter in die Ohrtrandvene gelegt, über welchen den Tieren zur perioperativen Kreislaufstabilisierung Infusion zugeführt wurde. Nach Abliegen der Tiere und Erlöschen des Schluckreflexes, des Lidreflexes und Nachlassen der Kieferspannung, wurden die Tiere mittels eines Laryngealtubus der Größe 12 intubiert. Zum Schutz des Tubus wurde dieser durch einen Maulkeil geführt und zusätzlich an diesem sicher fixiert.

Nach Sicherung der Atemwege wurden die Tiere unverzüglich zur Sicherstellung einer ausreichenden Sauerstoffsättigung an das Narkosegerät angeschlossen und auf einem fahrbaren Tisch in rechter Seitenlage abgelegt. Die Aufrechterhaltung der Narkose erfolgte mittels Isofluran (Forene[®], Abbott GmbH, Wiesbaden, Deutschland) per inhalationem. Nach Narkoseeinleitung und mehrfach im Verlauf der Operation, wurden die Augen mit Augensalbe (Vidisc[®], Dr. Gerhard Mann GmbH, Berlin, Deutschland) versorgt. Zum Schutz vor Aufgasung wurde den Tieren eine

Pansensonde gelegt, die für die gesamte Operationsdauer belassen wurde. Die Überwachung der Vitalfunktionen Sauerstoffsättigung und Puls erfolgte neben der visuellen Überprüfung der Schleimhautfarbe, des palpatorischen Befundes der Pulsqualität und Auskultation des Herzens zudem mithilfe eines Pulsoximeters das an einer unpigmentierten Stelle am Ohr angebracht wurde.

Nach großzügigem Ausscheren des OP-Feldes im Bereich der Lendenwirbelsäule und der linken Flanke wurde die Haut sorgfältig mit Jodseife (Jodosept Gel 250 ml, Vetoquinol GmbH, Ravensburg, Deutschland) gewaschen, mit Wundbenzin entfettet und mit einem Hautdesinfizienz (FrekaDerm, Dr. Schumacher GmbH, Melsungen, Deutschland) desinfiziert.

Für den chirurgischen Eingriff wurden die Tiere aus der OP-Vorbereitung in den benachbarten OP-Saal gefahren. Die Lagerung der Tiere erfolgte in rechter Seitenlage unter Polsterung des Radialis- und des Facialisgebietes auf einem abwaschbaren Holztisch, der für die intraoperative Röntgenkontrolle notwendig war. Nach korrekter Positionierung der Tiere wurde das OP-Feld abschließend mehrfach desinfiziert und mit sterilen Tüchern abgedeckt.

2.1.4 Chirurgischer Zugang

Der Zugang für den geplanten Eingriff an der Lendenwirbelsäule der Schafe erfolgte retroperitoneal von links (Abb. 2.2). Dieser Zugang stellt ein gängiges chirurgisches Verfahren sowohl beim Menschen als auch für multisegmentale experimentelle Eingriffe an der Lendenwirbelsäule des Schafes dar (Baramki et al., 2000). Die Zielbandscheiben L2-L3 und L4-L5 waren durch diesen Zugang gut darzustellen und erreichbar.

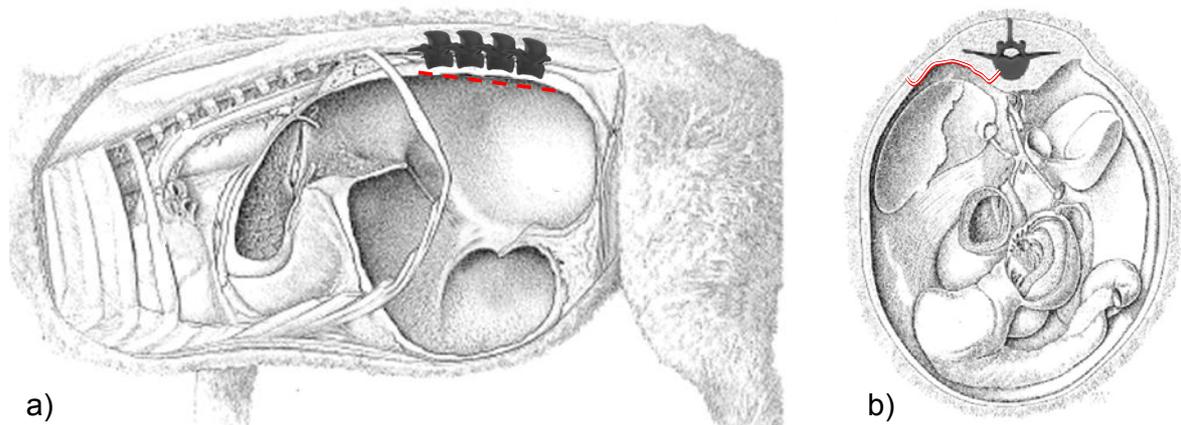


Abb. 2.2: Topografische Anatomie und Operationssitus des Schafes nach retroperitonealem Zugang zur Lendenwirbelsäule (Schnittführung in rot). Ansicht von a) lateral links und b) kaudal auf den abdominalen Querschnitt auf Höhe L2 (modifiziert nach Nickel et al., 1997).

Vor Anlegen des Hautschnittes wurden die lumbalen Bandscheiben mittels eines sterilen Stiftes unter C-Bogen-Kontrolle (Exposcop CB7-D, Ziehm Imaging GmbH, Nürnberg, Deutschland) auf die Haut skizziert (Abb. 2.3). Hierdurch konnte eine genaue und vor allem individuelle Ausrichtung und Größe des Hautschnittes gewährleistet werden.



Abb. 2.3: Vorbereitungen im Operationssaal. a) Ein Team aus drei Operateuren nahm die Implantation der Druckmesssonden vor. Um eine möglichst exakte Ausrichtung des chirurgischen Zugangs zu gewährleisten, erfolgte unmittelbar präoperativ die Lokalisierung der Zielbandscheiben der Lendenwirbelsäule mittels C-Bogen. b) Röntgenologische Darstellung des kranialen Lendenwirbelsäulenabschnittes. c) Instrumententische.

Die Schnittrichtung durch Haut und Unterhaut erfolgte mit leicht diagonalen Tendenz von kraniodorsal nach kaudoventral über das skizzierte OP-Feld. Durch stumpfe Präparation des subkutanen Fettes mittels Kornzange und Tupfer wurde die äußerste der drei Bauchmuskelschichten (m. obliquus externus abdominis)

identifiziert (Abb. 2.4 a,b). Einige Zentimeter ventral seines Ansatzes an den lumbalen Transversalfortsätzen wurde der Bauchmuskel stumpf mittels Metzenbaumschere in Faserrichtung gespalten. Dieses Vorgehen erfolgte in gleicher Weise für die beiden anderen beim Schaf äußerst dünnen Bauchmuskeln m. obliquus internus abdominis und m. transversus abdominis. Um das unmittelbar dem m. transversus abdominis bauchseitig anliegende und äußerst fragile Peritoneum nicht zu verletzen, wurde dieses vorsichtig mittels Kornzange und Tupfer durch streifende Bewegungen von dorsal nach ventral mobilisiert und mittels langer, stumpfer Wundhaken nach Hösel bzw. nach Kocher-Langenbeck zusammen mit der darunter befindlichen Pansenkuppel unter ventralem Zug von einem Assistenten retrahiert (Abb. 2.4 c,d). Der Retroperitonealraum konnte auf diesem Wege weiter in Richtung Wirbelsäule bis auf den linken m. psoas verfolgt werden. Dieser liegt der Wirbelsäule von ventrolateral beidseitig symmetrisch an. Durch einen sog. Psoassplit in Faserverlaufsrichtung (Abb. 2.4 e,f) wurde der Muskel getrennt und so Zugang zu den Bandscheiben erreicht. Die zwischen den einzelnen Bandscheibenfächern verlaufenden Segmentalgefäße waren dabei äußerst sorgfältig darzustellen, um Blutungen zu vermeiden.

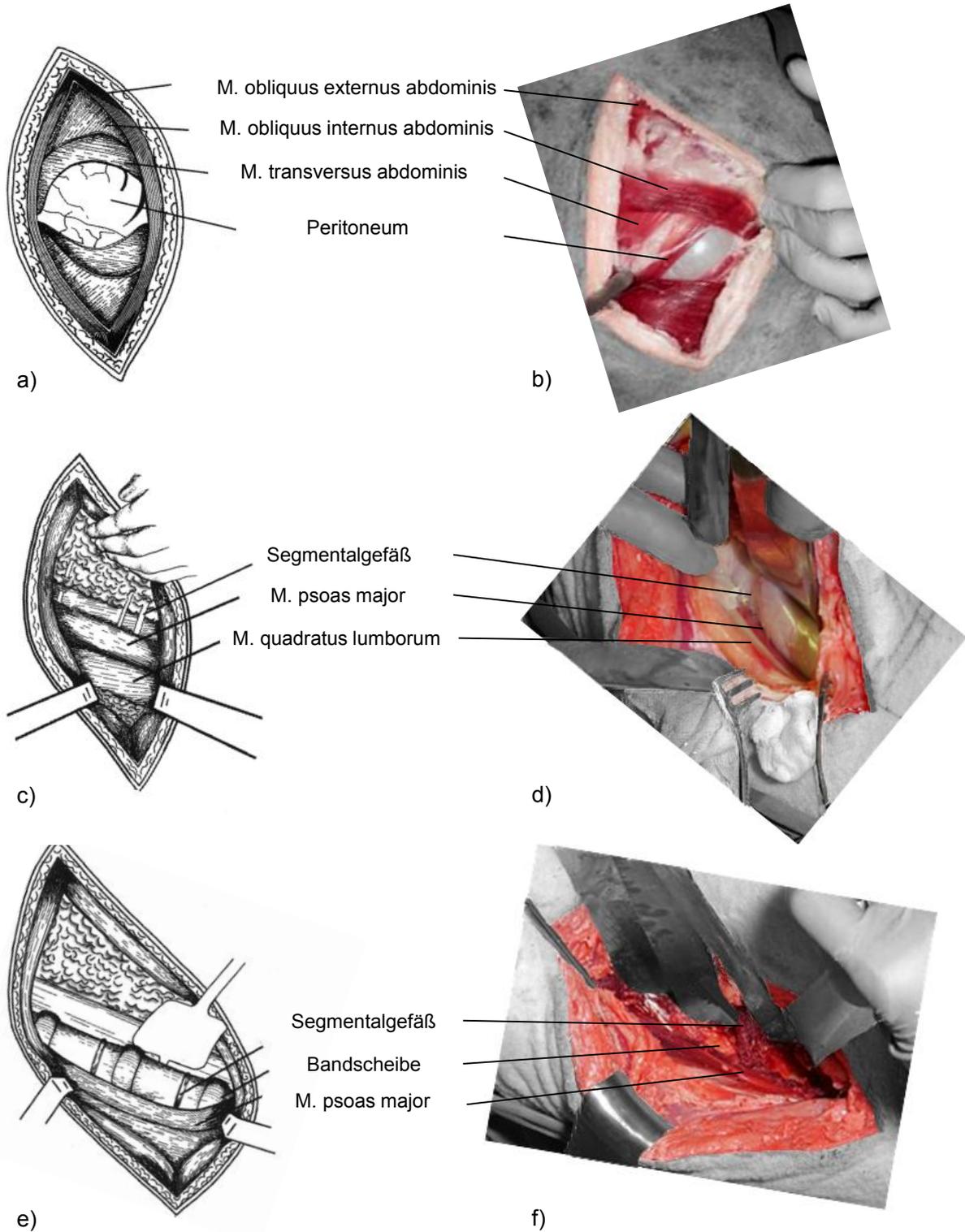


Abb. 2.4: Schrittweiser Ablauf des retroperitonealen Zuganges zur Lendenwirbelsäule des Schafes. a), c), e) Schematische Darstellung nach Baramki et al. (2000). b), d), f) Intraoperativ angefertigte Aufnahmen zur Darstellung des eröffneten Operationsgebietes.

2.1.5 Implantation der Druckmesssonde

Zur Implantation der Druckmesssonden wurden die Zielbandscheiben nach deren intraoperativen Darstellung mittels eines Kirschnerdrahtes (Außendurchmesser: 1,5 mm) punktiert und die korrekte Positionierung der Drahtspitze im Zentrum der Bandscheibe unter Röntgenkontrolle verifiziert (Abb. 2.5 a,b). Die Röntgenkontrolle erfolgte in zwei Richtungen: laterolateral und 45° oblique. Eine anterioposteriore (ap) Kontrolle des Sitzes der Draht- bzw. später der Sondenspitze war aufgrund der Größe und der Beschaffenheit des Verdauungsapparates beim Schaf und der dadurch hervorgerufenen Überlagerungen im Röntgenbild nicht möglich. Das Pansenvolumen (feste Bestandteile, Flüssigkeit und Gas) verhinderte die Bildgebung im ap-Strahlengang, weswegen auf das maximal mögliche Maß an schräger Projektion, in diesem Fall 45°, zurückgegriffen werden musste.

Über den mit der Spitze im Bandscheibenzentrum positionierten Draht, dessen Ende einige Zentimeter aus der Bandscheibe herausragte, konnte anschließend eine selbstgefertigte Hohlhülse aus rostfreiem Edelstahl (Innendurchmesser: 1,5 mm), die zur besseren Handhabung an der Spitze einer stiftartigen Konstruktion verankert war, in die Bandscheibe vorgeschoben werden. Nach Entfernung des Handstückes der Hohlhülse stellte eine erneute Röntgenkontrolle (Abb. 2.5 c,d) die korrekte Platzierung im Zentrum der Bandscheibe sicher. Anschließend wurde der Kirschnerdraht entfernt und über die Hülse der Sensor in die Bandscheibe eingeführt. Unter konstant gegenläufigem Vorschieben des Sensors in die Bandscheibe wurde die Hülse vorsichtig aus der Bandscheibe herausgezogen und außerhalb des Tierkörpers am Silikonkabel des Sensors belassen. Die Fixation der Sonde an der Bandscheibe erfolgte nach erneuter röntgenologischer Kontrolle ihres korrekten Sitzes mittels zirkulärer Naht (vergleichbar einer Tabaksbeutelnaht) an den äußeren Schichten des Anulus fibrosus (Abb. 2.5 e,f) in unmittelbarer Nähe der Eintrittsöffnung der Sonde in den Bandscheibeninnenraum.

Nach Abschluss der Sondenimplantation erfolgte der Verschluss des Operationsgebietes in mehreren Schichten. Die gesplittete Psoasmuskulatur wurde ohne Naht readaptiert und anschließend die Bauchmuskelschichten und die Unterhaut mit resorbierbarem Nahtmaterial (Vicryl 2-0, Ethicon, Johnson & Johnson Medical GmbH, Norderstedt, Deutschland) mittels Sultanscher Diagonalhefte

schichtweise verschlossen. Der Verschluss des Hautschnittes erfolgte durch Einzelhefte mit nicht-resorbierbarem Nahtmaterial (Resolon 3-0, RESORBA Wundversorgung GmbH & Co. KG, Nürnberg, Deutschland).

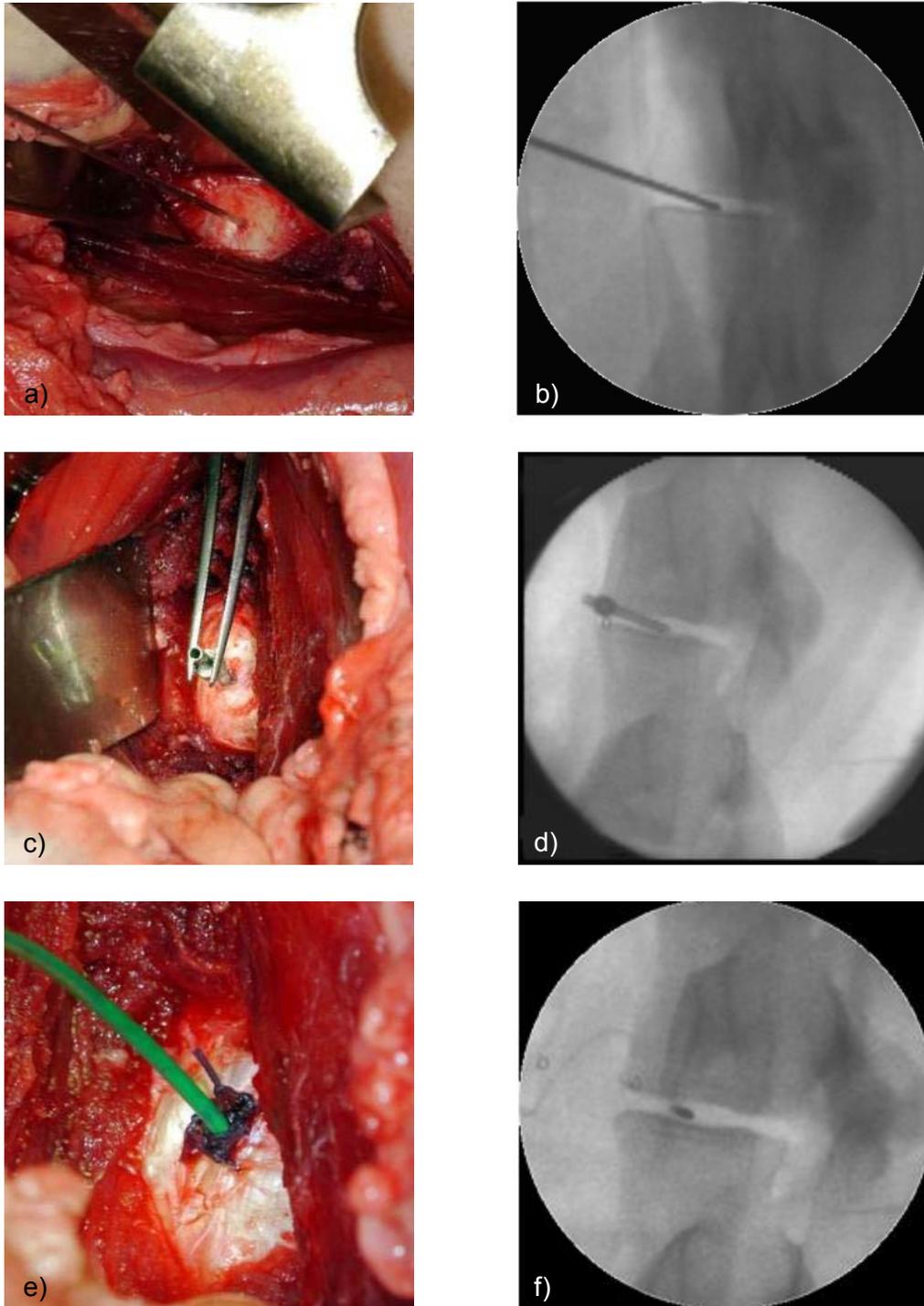


Abb. 2.5: Implantation der Druckmesssensoren. Operationssitus (links) bzw. röntgenologische Darstellung (rechts) der Sensorpositionierung im Verlauf. a), b) Punktion des Bandscheibenfaches L2-L3 mittels Kirschnerdraht. c), d) Platzierung der Hohlhülse und anschließende e), f) Positionierung des Sensors im Zentrum des Nucleus pulposus.

2.1.6 Versuchsablauf

Die Dauer der In-vivo-Messungen betrug 24 Stunden für jedes Schaf. Die Messungen begannen unmittelbar nach Fixierung der Sonde am Anulus fibrosus. Durch die Echtzeitdarstellung der Messergebnisse war gewährleistet, dass die mit einer Bewegung des Tieres einhergehende Druckveränderung in der Bandscheibe sofort angezeigt und in Amplitude und Dauer sichtbar mitverfolgt werden konnte. Dies diente neben der Kontrolle der ordnungsgemäßen Funktionalität der Sonde (ein Ausfallen des Signales durch Herausrutschen der Sonde aus dem Bandscheibenfach oder einen Defekt wäre sofort bemerkt worden), in erster Linie dazu, dass die intradiskalen Druckwerte jeder Aktivität des Tieres in ihrer Amplitude und Dauer im Testprotokoll dokumentiert werden konnten. Dies ist für die Auswertung von In-vivo-Messungen am Tier von immenser Bedeutung, da anders als beim Menschen, das Tier nicht auf Anweisung bestimmte Bewegungsmuster durchführt, sondern vielmehr alle Bewegungsmuster unvorhersehbar und ohne äußeren Zwang ablaufen. Die Schafe konnten sich während des gesamten Untersuchungszeitraumes frei in ihrer mit Stroh eingestreuten Box bewegen (Abb. 2.6).



Abb. 2.6: Durchführung der In-vivo-Messungen. a) Mit Messelektronik instrumentiertes Versuchstier und b) experimenteller Versuchsaufbau im Stall zur Überwachung und Aufzeichnung der Messergebnisse.

In Vorbereitung auf die Versuchsdurchführung wurde sowohl das Tragen des Rucksackes als auch das Handling und evtl. Manipulationen durch das Testpersonal

frühzeitig mit den Tieren trainiert und diese dadurch an die Bedingungen während der Testdurchführung gewöhnt.

Zusätzlich zur schriftlichen Dokumentation der Aktivitäten der Schafe, die durch das während des gesamten Versuchszeitraumes anwesende Testpersonal erstellt wurde, wurden Videoaufnahmen der Tiere über den gesamten Beobachtungszeitraum angefertigt. Nach Ablauf des 24-stündigen Testprotokolls wurden die Tiere nach Bolzenschussbetäubung durch Entbluten getötet.

2.1.7 Auswertung

Im ersten Teil der In-vivo-Untersuchungen wurden die für die nachgeschalteten In-vitro-Untersuchungen notwendigen Drücke ermittelt, die während Erholungs- und Aktivitätsphasen der Tiere in der Bandscheibe entstanden. Um diese Werte zu erhalten, erfolgte mittels der grafischen Darstellung der Messergebnisse in einem Histogramm eine Einteilung der Datensätze in zwei Zeitabschnitte. Als Erholungsphase definiert wurden die Zeitabschnitte, in denen die Tiere mit abgelegtem Kopf auf dem Boden lagen. Aktivitätsphasen wiederum stellten die Perioden dar, in denen das Tier mit aufgerichtetem Kopf alle vier Gliedmaßen gleichmäßig belastend stand, sich allerdings nicht fortbewegte.

2.2 Ex-vivo-Untersuchungen

2.2.1 Präparation

Nach Tötung der drei Schafe der In-vivo-Untersuchungen wurde jeweils die Lendenwirbelsäule aus dem Tierkörper entnommen und sorgfältig präpariert. Unter Erhalt sämtlicher Bandstrukturen (Lig. longitudinale anterior, Lig. longitudinale posterior, Lig. intertransversalis, Lig. flavum, Lig. interspinale, Lig. supraspinale) sowie der Capsula articularis der Facettengelenke, wurden die Lendenwirbelsäulen von umgebenden Fett-, Muskel- und Bindegeweben befreit und die Bewegungssegmente L2-L3 und L4-L5, jeweils aus den beiden Lendenwirbelkörpern und der dazwischenliegenden Bandscheibe bestehend, abgetrennt. Die Segmente

wurden über das kraniale bzw. kaudale Ende des oberen bzw. unteren Wirbelkörpers in Polymethylmethacrylat (PMMA, Technovit 3040, Heraeus Kulzer, Werheim, Deutschland) eingebettet. Zur stabilen Verankerung der Wirbelkörper in den PMMA-Blöcken wurden Schrauben in unterschiedlicher Winkelung in den freien Deckplatten der Wirbel befestigt bevor diese in PMMA eingegossen wurden (Abb. 2.7 a). Für die Fixierung der Bewegungssegmente in der Materialprüfmaschine konnten an den PMMA-Blöcken Metallflansche angebracht werden. Auf diese Weise wurde ein Verkippen der Segmente während des Tests verhindert. Die für die In-vivo-Messungen implantierten Sonden wurden während des gesamten Präparationsprozesses sorgfältig in der Position belassen, in der sie operativ implantiert wurden (Abb. 2.7 b).

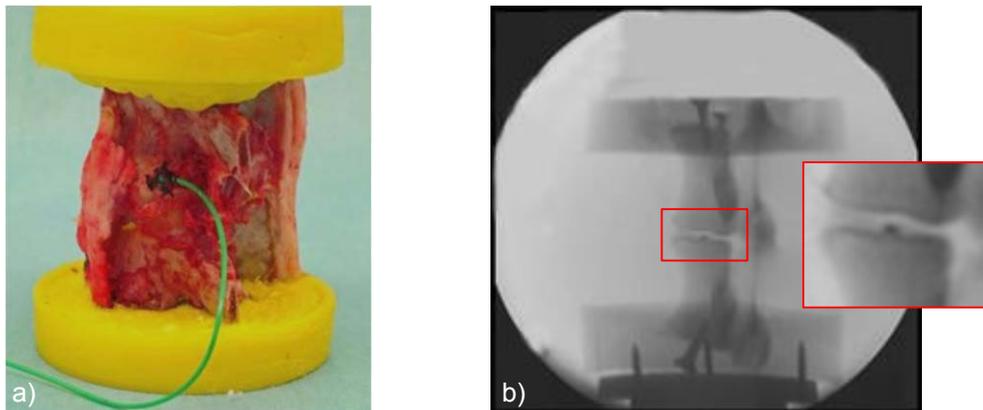


Abb. 2.7: Vorbereitungen zur Durchführung der Ex-vivo-Messungen. a) Makroskopisches Erscheinungsbild des Bewegungssegmentes L2-L3 im Anschluss an den Präparationsprozess und b) röntgenologische Verifikation der korrekten Sensorposition im Zentrum der Bandscheibe nach Tötung eines Tieres des In-vivo-Versuches.

2.2.2 Testprotokoll

Um den in vivo untersuchten Bewegungssegmenten L2-L3 (Schaf 1-3) sowie L4-L5 (Schaf 3) eine Kraft-Druck-Korrelation zuordnen zu können, wurden diese einem axialen Kompressionstest in einer servohydraulischen dynamischen Materialtestmaschine (Z010, Zwick GmbH & Co. KG, Ulm, Deutschland) unterzogen und so deren individuelle Regressionsgleichung erstellt (Abb. 2.8). Zur Präkonditionierung wurden die Segmente zunächst für 15 min unter 20 N axialer Kompression belastet und anschließend kraftgesteuert drei wiederkehrenden

Lastzyklen bis zu einer Maximallast von 1000 N ausgesetzt, von denen die ersten beiden Zyklen als weitere Präkonditionierungsmaßnahme dienten und der letzte Zyklus zur Auswertung herangezogen wurde. Die Lastrate betrug 30 N/s und die Aufzeichnungsfrequenz des IDP sowie der Höhenänderung des Segmentes und der applizierten Kompressionskraft 50 Hz.

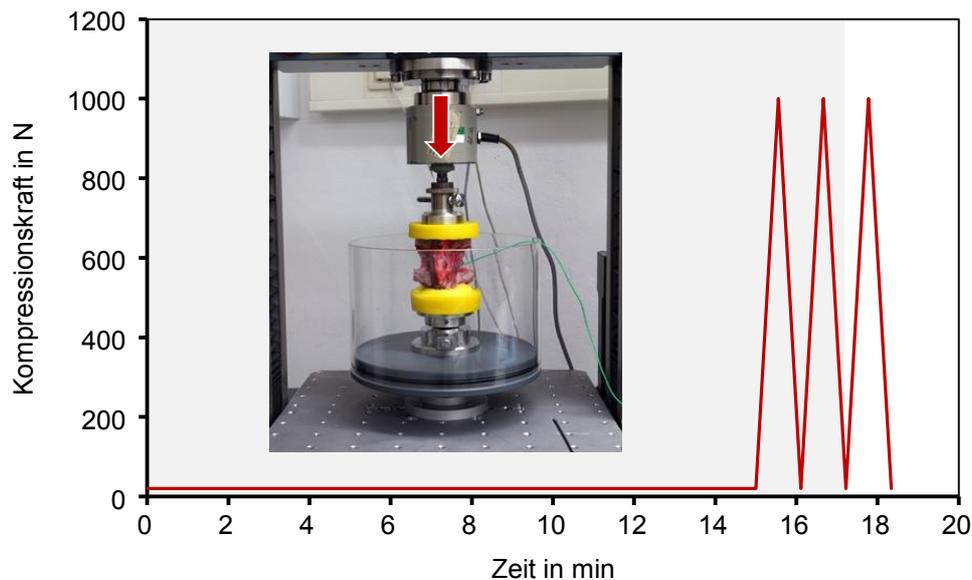


Abb. 2.8: Lastprotokoll. Darstellung des experimentellen Test-Setups mit eingespanntem ovinen Bewegungssegment in einer servohydraulischen Materialprüfmaschine (Foto) und des applizierten Lastprotokolls bestehend aus einer Präkonditionierungsphase (hellgrau hinterlegt) und dem zur Auswertung herangezogenen dritten Zyklus.

2.3 In-vitro-Untersuchungen

2.3.1 Präparate

Für die In-vitro-Untersuchungen wurden frische Wirbelsäulen von 22 ausgewachsenen ca. zwei bis fünf Jahre alten Merinoschafen von einem Metzger bezogen. Dem Vorgehen des Ex-vivo-Versuches entsprechend wurden diese sorgfältig präpariert, die Bewegungssegmente L2-L3 (n=22) und L4-L5 (n=14), in der Summe 36 Präparate, entnommen, eingebettet und mit Flanschen versehen. Bis zur Testung wurden die Monosegmente bei -20°C in Tüten vakuumverpackt aufbewahrt.

Am Vorabend des Testtages wurden die Wirbelsäulen in einen Kühlraum bei 0°C gelegt und über Nacht schonend aufgetaut.

2.3.2 Testgruppen

Für die biomechanischen Untersuchungen wurden die 36 ovinen Präparate in sechs Gruppen á sechs Bewegungssegmente eingeteilt. In jeder Testgruppe wurde ein Sensor derselben Art wie er für die In-vivo- und Ex-vivo-Versuche Verwendung fand, zentral in den Nukleus implantiert und dem Vorgehen des In-vivo-Versuches entsprechend fixiert.

In der **INTAKT**-Gruppe erfolgte bis auf den Defekt, der durch die Implantation des Sensors verursacht wurde, kein weiterer Eingriff am Bewegungssegment. Die Segmente der Gruppe **DEF-AN** hingegen wurden mit einem linksseitigen diagonal entlang der äußeren Faserorientierung des Anulus ausgerichteten Schnitt versehen (Abb. 2.9 a), der sich über die komplette Tiefe des Anulus erstreckte, jedoch ohne Miteinbeziehung des Nukleus. Als vollständig wurde der Anulusdefekt nach Penetration der innersten Anuluslamellen erachtet, welche mit einem fühlbaren Widerstandsverlust während des Stiches mit der Skalpellklinge einherging. Die Anulusinzision wurde in den Defektgruppen DEF-AN, DEF-NUK_{n+k}, DDAHA und iGG-MA) gleichermaßen durch eine Kombination aus Bioadhäsiv auf Cyanoacrylat-Basis (ADHBIO ADHESIVE[®], Adhesion and Adhesives Laboratory, Department of Inorganic Chemistry, Universität Alicante, Spanien) und zwei einfachen rückläufigen Nähten (U-Hefte) verschlossen. Sensoreintrittspforte (rechts) und Defektseite (links) mussten aufgrund eines ansonsten nur insuffizienten Defektverschlusses auf gegenüberliegenden Seiten zu liegen kommen. Der Nukleusdefekt (**DEF-NUK_{n+k}**) beinhaltete neben der Eröffnung des Anulus ebenso die Entfernung und anschließende Reimplantation des natürlichen Nukleusgewebes (Tabelle 2.2). In Abwandlung von DEF-NUK_{n+k} wurde in der Testgruppe **DEF-NUK_p** (Abb. 2.9 b,c) ein Plug aus Polyurethan zum Defektverschluss verwendet. Dieser zunächst hohle Plug wurde so in den Defekt eingebracht, dass das Kopfstück in der Nukleuskavität zu liegen kam. Um ein Herausgleiten des Plugs zu verhindern, wurden die Außenseiten des Plugs mit demselben Kleber benetzt, der auch in den anderen Testgruppen Verwendung fand und die Enden des Plugs an den äußeren Anuluslamellen mittels

Naht fixiert. Nach korrekter Positionierung innerhalb der Defektstelle wurde der Plug abschließend mit schnellhärtendem Silicon (elite[®] implant LIGHT, Zhermack Clinical, Badia Polesine, Italien) gefüllt. In den Gruppen **DDAHA** und **iGG-MA** wurden im Anschluss an die Nukleotomie zwei Hydrogele zur Wiederauffüllung der Nukleuskavität verwendet.

Tabelle 2.2: Gruppeneinteilung der Schafspräparate für die biomechanischen Untersuchungen und Mengenangabe des entnommenen und reimplantierten Nucleus pulposus (NP) bzw. des injizierten Hydrogels.

Gruppe	Bandscheibenniveau	entferntes NP Gewebe in g	implantierte Menge in g
INTAKT	6 × L2-L3	---	---
DEF-AN	6 × L2-L3	---	---
DEF-NUK _{n+k}	6 × L4-L5	0,14 (0,1–0,15)	s. entfernte Menge
DEF-NUK _p	6 × L4-L5	0,14 (0,1–0,15)	s. entfernte Menge
DDAHA	4 × L2-L3 / 2 × L4-L5	0,16 (0,13–0,18)	0,15 (0,13–0,17)
iGG-MA	6 × L2-L3	0,22 (0,16–0,25)	0,22 (0,19–0,31)

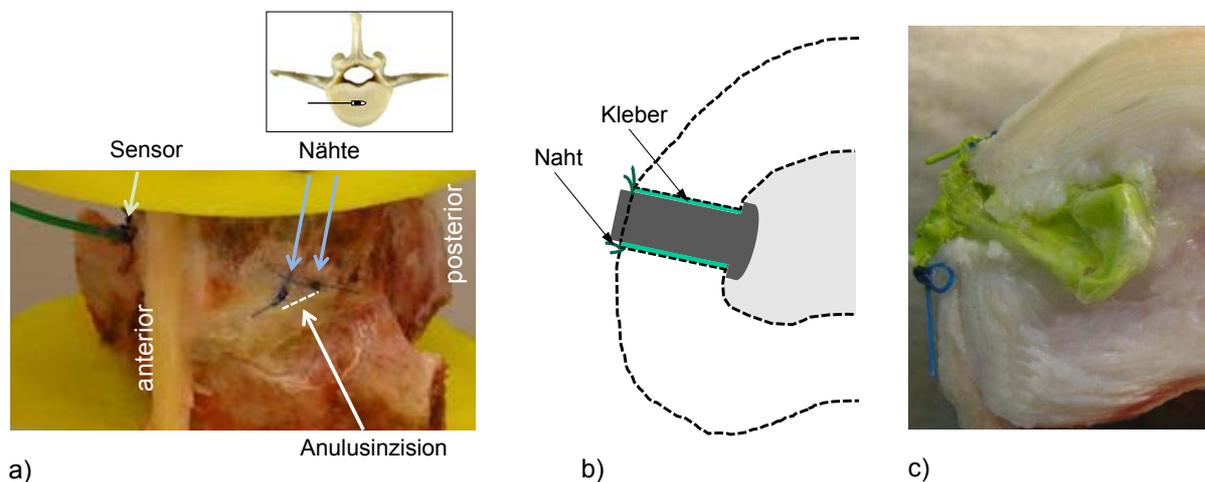


Abb. 2.9: Verschlussstechniken des Anulusdefekts. a) Instrumentiertes Bewegungssegment der Testgruppe DEF-NUK_{n+k}. Eintrittspforte des Sensors aus der Bandscheibe (rechts) und mittels Naht und Kleber verschlossener Anulusdefekt (links) an einem in PMMA eingebetteten Präparat. Abweichend die Verschlussstechnik durch Einbringen eines Polyurethan-Plugs der Testgruppe DEF-NUK_p im schematischen (b) und makroskopischen (c) Bandscheibenquerschnitt.

Verwendete Hydrogele

DDAHA (Anika Therapeutics, Abano Terme, Italien, Abb. 2.10) ist ein Amidderivat der Hyaluronsäure. Das Gel, das bei Raumtemperatur bis zu drei Jahre stabil bleibt und aus dem Ausgangsmaterial Hyaluronsäure-Ammoniumsalz hervorgeht, ist gekennzeichnet durch seine lipophilen und viskoelastischen Eigenschaften. Es entsteht biochemisch in zwei Phasen. Die erste Phase dient der Aktivierung der Carboxylgruppe, gefolgt von der zweiten Phase, der Verknüpfung zum Amid. Biomechanisch zeichnet es sich durch seine hohe Viskosität und sein nichtlineares Verhalten im Spannungs-Relaxationstest aus. Es weist einen Aggregatmodul von $H_0 = 0,2 \pm 0,04 \text{ kPa}$ und eine hydraulische Permeabilität von $k_0 = 520 \pm 130 \times 10^{-13} \text{ m}^4 \text{ N}^{-1} \text{ s}^{-1}$ auf. Die rheologischen Eigenschaften des Gels werden nachweislich nicht durch die Injektion mittels im klinischen Alltag routinemäßig verwendeter Kanülen beeinträchtigt. DDAHA erwies sich bereits in diversen muskuloskelettalen Anwendungsbereichen, sowohl in klinischen Studien als auch im Tiermodell, als geeignete Trägermatrix zur Unterstützung regenerativer Behandlungsstrategien mit und ohne Zellen (Giannini et al., 2009; Hemmrich et al., 2008). Darüber hinaus konnte in einer Tierstudie am Schwein bereits die Biokompatibilität von DDAHA im orthotopen Modell an der Bandscheibe nachgewiesen werden (Revell et al., 2007).

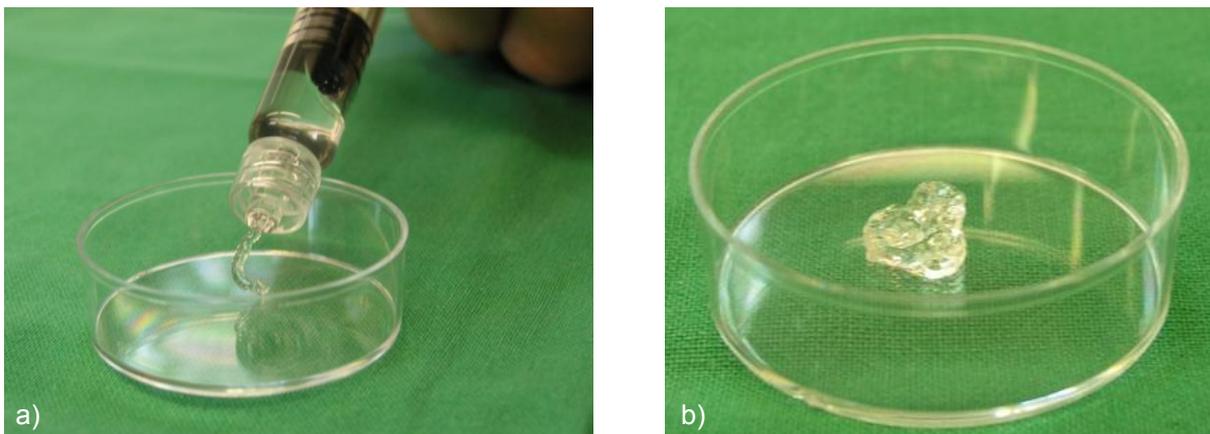


Abb. 2.10: Hydrogel. Makroskopisches Erscheinungsbild des Hydrogels DDAHA a) während und b) nach Injektion.

Das zweite Hydrogel, das im vorliegenden Versuch als Nukleusersatzmaterial Verwendung fand, ist Gellan Gum (3 B's Research Group, Universität Minho, Portugal). Im Gegensatz zu DDAHA handelt es sich hierbei um ein lineares, in seiner Ausgangsform anionisches Heteropolysaccharid mikrobiellen Ursprungs, das strukturell aus Glukose-Glukuronsäure-Glukose-Rhamnose Verbindungen aufgebaut ist. In Gegenwart von Metallionen bildet es ein transparentes Gel aus. Gellan Gum ist in zwei Variationen erhältlich; modifiziert durch den Einfluss von UV-Licht (photo-crosslinked Gellan Gum) und in der für die vorliegende Studie untersuchten Variante als ionisch vernetztes, methacryliertes Gellan Gum (ionically crosslinked Gellan Gum, iGG-MA) (Silva-Correia et al., 2011). Der Aggregatmodul sowie die hydraulische Permeabilität unterscheiden sich mit $H_0 = 10,5 \pm 3,1$ kPa und $k_0 = 1,7 \pm 0,6 \times 10^{-13} \text{ m}^4\text{N}^{-1}\text{s}^{-1}$ merklich von den Werten von DDAHA. Das Potential von iGG-MA als Scaffold für TE-Strategien sowie dessen Biostabilität und Biokompatibilität sind durch In-vitro- als auch In-vivo-Untersuchungen belegt (Oliveira et al., 2010; Oliveira et al., 2009; Pereira et al., 2011; Silva-Correia et al., 2011). Ein weiteres Charakteristikum, das iGG-MA für die Anwendung als Bandscheibenersatz geeignet erscheinen lässt, ist dessen anti-angiogenetisches Potential. Es verhindert nachweislich das Einsprossen von Blutgefäßen in die Trägermatrix in vivo (Silva-Correia et al., 2012).

2.3.3 Testprotokoll

An jedem der 36 Präparate wurden zwei unterschiedliche mechanische Tests durchgeführt: ein Steifigkeits- (a) und ein Kriech-Relaxations-Test (b). Beide Tests wurden unmittelbar nacheinander durchgeführt. Um die Präparate aufgrund der langen Testdauer vor Austrocknung zu schützen und möglichst physiologische Umgebungsbedingungen zu schaffen, wurden die Untersuchungen in einem Bassin, gefüllt mit physiologischer NaCl-Lösung, durchgeführt.

Im Steifigkeitstest (Abb. 2.11 a) wurden die Präparate in einer Materialprüfmaschine (Z010, Zwick GmbH & Co. KG, Ulm, Deutschland) ähnlich dem Vorgehen des Ex-vivo-Versuches einer axialen Kompression unterzogen, der nach einer Präkonditionierungsphase von 5 min bei 2 N, drei wiederholende Zyklen bis zu einer Maximallast von 500 N bei einer Lastrate von 30 N/s folgten. Gemessen wurde die

Höhenabnahme der Bandscheibe mit einer Aufzeichnungsfrequenz von 50 Hz. An der Entlastungsphase des letzten Zyklus wurde über die Steigung der Kraft-/Deformationskurve die Steifigkeit der Präparate an drei unterschiedlichen Intervallen abgeleitet: k_u : 500 – 480 N; k_m : 130 – 110 N; k_l : 58 – 38 N. Außer dem ersten Intervall von 500 – 480 N leiteten sich diese Kraftintervalle aus den Ergebnissen der In-vivo- / Ex-vivo-Versuche der vorliegenden Arbeit ab. Nur k_u reflektiert als das obere (engl. upper) Kraftintervall den Kraftbereich eines stehenden Menschen, während die Steifigkeiten im mittleren (engl. middle) und unteren Kraftbereich (engl. lower) die Bereiche beim stehenden bzw. ruhenden Schaf widerspiegeln.

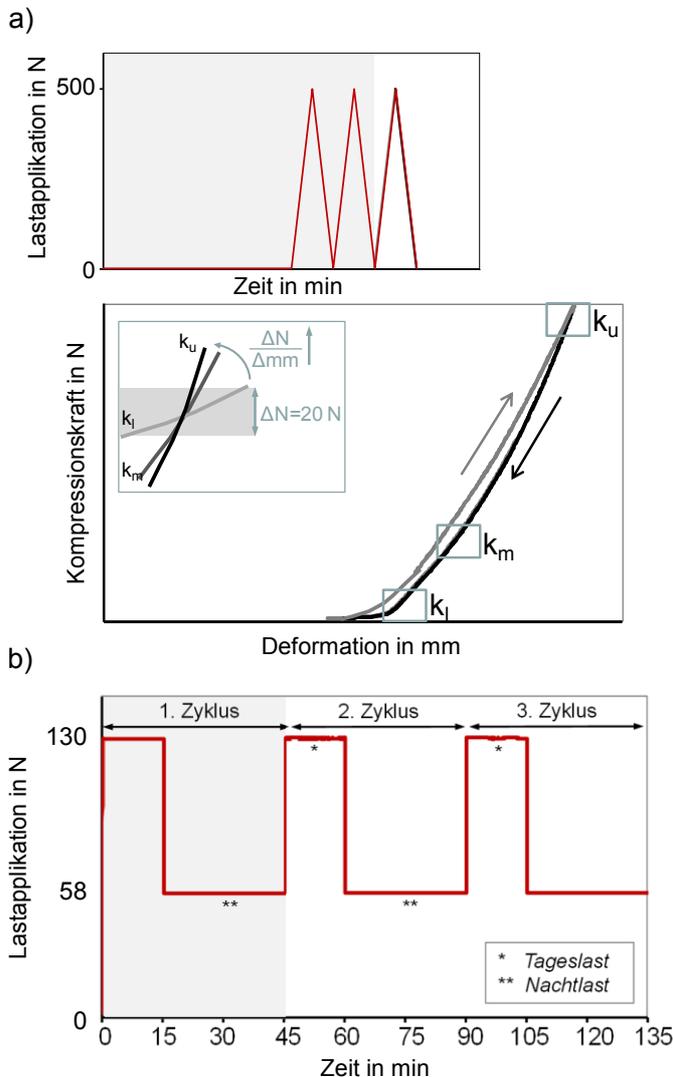


Abb. 2.11: Lastprotokolle der durchgeführten mechanischen Untersuchungen.

a) Steifigkeitstest. Aus dem dritten Zyklus des Lastprotokolls (oben) resultierte der dargestellte Kraft-/Deformationsgraph (unten). Steifigkeiten der Kraftintervalle k_u , k_m und k_l wurden aus der Steigung des abfallenden Hystereseastes (schwarz) berechnet.

b) Lastprotokoll des Kriech-Relaxations-Tests. Drei Zyklen im Wechsel aus 15-minütiger Tages- und 30-minütiger Nachtlast wurden appliziert. Die In-vitro-Lasten von 130 bzw. 58 N leiteten sich aus den In-vivo-/ Ex-vivo-Messungen ab.

Den Hauptversuch bildete der Kriech-Relaxations-Tests (Abb. 2.11 b). In drei Zyklen, jeweils unterteilt in eine 15-minütige Belastungs- und eine 30-minütige Erholungsphase, wurde der natürliche Tages-/ Nachtrhythmus, bestehend aus Aktivitäts- und Ruheperioden, im Zeitraffer im In-vitro-Versuch nachgeahmt. Die applizierten axialen Lasten für die Belastungs- und Erholungsphasen betragen 130 bzw. 58 N und wurden mit einer Lastrate von 30 N/s angefahren. Mit einer Frequenz von 50 Hz wurden sowohl der IDP als auch der Höhenverlust der Bandscheiben im zeitlichen Verlauf aufgezeichnet. Um möglichst robuste Daten zur Auswertung heranzuziehen, wurden ausschließlich der zweite und dritte Zyklus analysiert, während der erste Zyklus der Präkonditionierung der Segmente diente.

2.3.4 Auswertung

Die statistischen Auswertungen der Ergebnisse erfolgten unter Verwendung des Statistikprogrammes „R“ (R Development Core Team, 2011) mittels des nicht parametrischen Wilcoxon Signed Rank Tests, der einen Test auf Gleichheit zwischen nicht notwendigerweise normal verteilten Gruppen bei einem Signifikanzniveau von $p < 0,05$ darstellt. Zur Auswertung des Kriech-Relaxations-Tests wurde der Höhenverlust der unterschiedlichen Testgruppen in Relation zum Ende des ersten Zyklus, d.h. zum Ende der Belastungsphase von 58 N, gesetzt. Zum Vergleich der Testgruppen wurden nicht die gesamten Kurven, sondern vielmehr ausschließlich die Endpunkte der Be- bzw. Entlastungsphasen herangezogen.

2.4 In-silico-Untersuchungen

Um die in den vorgeschalteten In-vitro-Untersuchungen ermittelten Ergebnisse genauer interpretieren zu können, wurden numerische Analysen durchgeführt und nacheinander bzw. in Kombination verschiedene Materialparameter des FE-Modells variiert, um so deren Einfluss auf die Biomechanik des Bewegungssegments zu untersuchen.

2.4.1 Modellbeschreibung

Für die numerischen Analysen wurde ein FE-Modell eines humanen Bandscheibensegmentes L4-L5 herangezogen (Abb. 2.12 a). Dabei handelt es sich um ein biphasisches, nichtlineares Modell bestehend aus Nukleus pulposus, innerem und äußerem Anulus fibrosus, knorpeliger und knöcherner Deckplatte, sowie Teilen der angrenzenden Spongiosa des Wirbelkörpers.

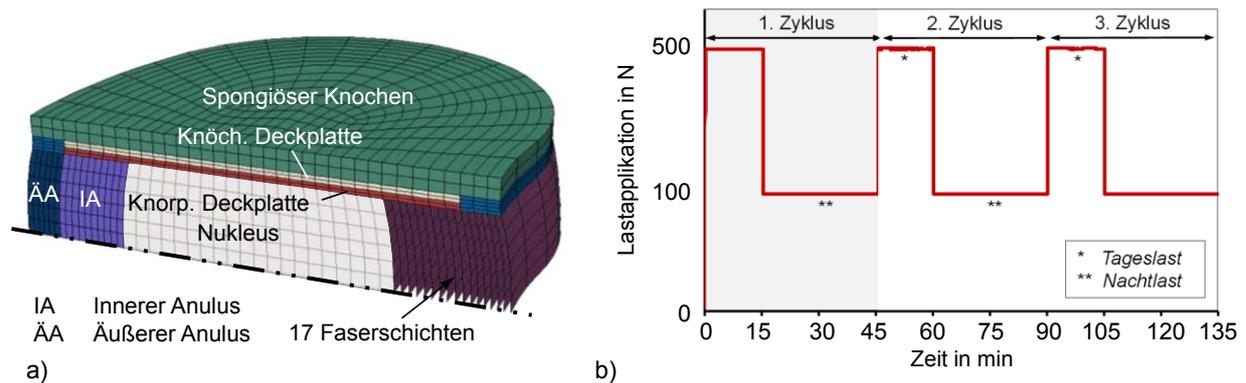


Abb. 2.12: In-silico-Untersuchungen. a) Das verwendete biphasische, in der Sagittal- sowohl Transversalebene symmetrische Modell L4-L5 einer humanen Bandscheibe besteht aus den Kompartimenten Nukleus pulposus, innerer und äußerer Anulus fibrosus, knorpeliger und knöcherner Deckplatten, sowie Teilen der angrenzenden Spongiosa. b) Das applizierte Lastprotokoll der In-silico-Untersuchungen entsprach, angesehen von den Beträgen der applizierten Kompressionslasten, dem der In-vitro-Untersuchungen und bestand aus drei wiederkehrenden Zyklen wechselnder Be- und Entlastungsphasen. 500 und 100 N wurden gewählt, um das humane FE-Modell mit physiologischen Lasten des Menschen zu speisen.

Das Modell ist bezüglich der mittleren Transversal- und der Sagittalebene symmetrisch gestaltet. Den Gesetzmäßigkeiten poroelastischer Materialien entsprechend, berücksichtigt es zwei Phasen; interstitielle Fluide und eine solide Phase. Letztere repräsentiert die Trockensubstanz der Proteoglykan-/Kollagen-Matrix. Im Intaktzustand spiegelt das Modell das biomechanische In-vivo-Verhalten der Bandscheibe wieder, Fluid während Belastungsphasen an die Umgebung zu verlieren und dieses in Phasen der Entlastung aus der Umgebung zurückzugewinnen. Die Materialeigenschaften für das Modell wurden aus einer früheren Studie entnommen, die am Institut für Unfallchirurgische Forschung und Biomechanik durchgeführt wurde (Galbusera et al., in press).

2.4.2 Last-und Randbedingungen

In Anlehnung an die In-vitro-Untersuchungen wurde ein Lastprotokoll für die numerischen Simulationen gewählt, das aus drei Zyklen wechselnder Be- und Entlastungsphasen bestand (Abb. 2.12 b). Als Präkonditionierungsmaßnahme wurde eine Schwellphase von 28-stündiger Dauer simuliert, in der das Segment seinen maximalen Sättigungszustand bis zum Equilibrium erreichte. Für die In-silico-Untersuchungen stand kein valides ovines FE-Modell zur Verfügung, sodass auf ein humanes Modell zurückgegriffen werden musste. Das Lastprotokoll wurde dementsprechend so abgeändert, dass es den physiologischen Anforderungen an die Bandscheiben, wie sie beim Menschen aus der Literatur bereits bekannt sind, entspricht (Rohlmann et al., 2009; Wilke et al., 2003). Die rein axialen Kompressionslasten beliefen sich demnach anstelle von 130 N, wie beim Schaf in der vorliegenden Studie in vivo ermittelt, auf 500 N (Belastungsphase) und anstelle von 58 N auf 100 N (Entlastungsphase).

2.4.3 Parameterstudien

Ein bekanntes Phänomen von In-vitro-Untersuchungen an der Bandscheibe ist der selbst unter Entlastung limitierte Fluideinstrom in die Bandscheibe (van der Veen et al., 2005). Der Grund hierfür wird in der Formation von Blutkoageln nach Eintritt des Todes gesehen, die einen Großteil der Blutgefäße der subchondralen Deckplatte verstopfen und so einen Flüssigkeitseintritt in die Bandscheibe in vitro erschweren, wenn nicht sogar vollständig blockieren. Um die Bedingungen des In-vitro-Versuches möglichst genau nachzuahmen, wurde daher auch der Effekt untersucht, den ein mangelnder Flüssigkeitsstrom in das Bandscheibeninnere auf das Segmentverhalten nimmt. Die Auswirkung der Veränderung einzelner Materialparameter erfolgte dementsprechend jeweils separat unter der Annahme einer permeablen (###FE-perm) und einer blockierten (###FE-block) Deckplatte. Da die Simulation des Anulusdefekts, der im In-vitro-Test für die Durchführung der Nukleotomie unumgänglich war, in den numerischen Simulationen zu erheblichen Konvergenzproblemen (also zu keiner vollständig berechenbaren Lösung) führte, konnte dieser als solcher in den folgenden Untersuchungen nicht direkt berücksichtigt werden und musste so mit Annahmen nachempfunden werden.

- 1) INTAKT_{FE-perm} bzw. INTAKT_{FE-block} : bei der Simulation des Intaktzustands wurden keine Modifikationen an den oben beschriebenen Modellen vorgenommen.
- 2) DEF-NUK100_{FE-perm} bzw. DEF-NUK100_{FE-block} : In vitro werden mit der Durchführung einer Nukleotomie natürliche Grenzflächen zwischen Nukleus und Umgebung zerstört. Der Testgruppe DEF-NUK des In-vitro-Versuches entsprechend wurde in den Simulationen der Nukleus aus der Bandscheibe entfernt und zu 100% reimplantiert. Diese Testgruppe diente der Untersuchung des Einflusses zerstörter Grenzflächen auf die Biomechanik des Bewegungssegmentes. Der Unterschied zu INTAKT_{FE} lag darin, dass an der Grenzfläche zwischen Nukleus und Anulus bzw. zwischen Nukleus und benachbarten Deckplatten, Kräfte nicht mehr über gebundene Knoten unmittelbar übertragen wurden, sondern über Kontaktdefinitionen Relativbewegungen zwischen den an den Grenzflächen aufeinanderwirkenden Strukturen ermöglicht wurden. Unberücksichtigt blieb in dieser Testgruppe eine mögliche Verlagerung von Nukleusmaterial aus dem Bandscheibenzentrum in den Anulusdefekt.
- 3) DEF-NUK98_{FE-perm} bzw. DEF-NUK98_{FE-block} : Unter der Annahme, dass ein insuffizient verschlossener Anulus zu einer Verschiebung des reimplantierten Nukleusgewebes in den von innen aufklaffenden Defektspace führen kann, die Simulation des Anulusdefektes allerdings mit erheblichen Konvergenzproblemen verbunden war, wurden die möglichen mechanischen Auswirkungen eines Anulusdefektes durch eine reduzierte Reimplantationsmenge von 98% nachgestellt. Hierdurch entstand ein zirkulärer Spalt zwischen Nukleus und Umgebung von 0,1 mm. Dieses Modell diente des Weiteren als Grundlage für die numerischen Untersuchungen der Testgruppen 5-7 (siehe unten).
- 4) WG80_{FE-perm} bzw. WG80_{FE-block} : Um einen potentiellen Wasserverlust der proteoglykanreichen Nukleusgrundsubstanz durch das Handling in vitro zu simulieren, wurde der Wassergehalt des Nukleus um 20% reduziert. Hieraus ergab sich ein Gesamtvolumen des Nukleus von 84% und ein zirkulärer Spalt um das reimplantierte Nukleusgewebe von 0,7 mm.

Die stückchenweise Entfernung des Nukleus mittels Rongeuren in vitro geht mit der Zerstörung des Nukleusverbundes und damit mit einer Veränderung unterschiedlicher Materialeigenschaften einher, deren Einfluss durch die Modifikation der folgenden Modellparameter untersucht wurde:

- 5) $EL75_{FE-perm}$ bzw. $EL75_{FE-block}$: Reduktion des Elastizitätsmodulus um 25%.
- 6) $K75_{FE-perm}$ bzw. $K75_{FE-block}$: Reduktion des Kompressionsmoduls um 25%
und
- 7) $OP90_{FE-perm}$ bzw. $OP90_{FE-block}$: Reduktion des osmotischen Potentials um 10%.

2.4.4 Analyse des intradiskalen Kraftflusses

Neben der Möglichkeit, unter Verwendung numerischer Modelle eine Erklärung für mechanische In-vitro-Phänomene zu erlangen, offeriert die FE-Simulation zusätzlich ein nützliches Werkzeug zur Ermittlung des Kraftflusses innerhalb der einzelnen Bandscheibenkompartimente über das Bewegungssegment hinweg. Berücksichtigt werden hierbei die drei umschriebenen Kompartimente Nukleus pulposus, Anulusgrundsubstanz und Anulusfasern.

Während gerade die Messung des IDP lediglich auf den Veränderungen eines streng umschriebenen, zentral im Nukleus gelegenen Bereiches basiert, liegt der Analyse des Kraftflusses über das Segment hinweg die gesamte Struktur zugrunde. Ob ein Abfallen des Druckes im Bandscheibenzentrum notwendigerweise mit einem Verlust der mechanischen Kompetenz des Nukleus und daran anschließend mit Kompensationsmechanismen im Anulus einhergeht, kann daher nur über die Bestimmung des Kraftflusses entlang des zu untersuchenden Kompartimentes beurteilt werden. Um detailliert zu untersuchen, welchen Einfluss strukturelle Veränderungen am Bewegungssegment auf den Kraftfluss über das Bandscheibensegment hinweg nehmen, wurde daher die Verteilung der eingeleiteten Kraft auf Nukleus pulposus, Anulusgrundsubstanz und Anulusfasern unter Berücksichtigung der FE-Testgruppen untersucht. Kompressionslasten im Nukleus pulposus und der Anulusgrundsubstanz werden dabei als positive, Zugspannungen in den Anulusfasern hingegen als negative Kräfte verzeichnet.

2.5 In-vivo-Untersuchungen (Teil 2)

Den zweiten Teil der Auswertungen des vorliegenden In-vivo-Versuches bildete die detaillierte Untersuchung des intradiskalen Druckes beim Schaf während unterschiedlicher Aktivitäten. Dazu wurde der gesamte Datenpool, der die intradiskalen Druckwerte von drei Schafen über jeweils 24 h umfasste, systematisch unterschiedlichen Aktivitäten zugeordnet. Grundlegend wurde hierbei eine Einteilung der Bewegungsmuster in statische und dynamische Aktivitäten vorgenommen. Zu den statischen Aktivitäten wurden Liegen intra-operativ, Liegen post-operativ, Schlafen und entspanntes Stehen und zu den dynamischen Aktivitäten Hinlegen, Aufstehen, Drehen und Laufen gezählt. Zur Auswertung der Daten wurde zu jeweils sechs über den gesamten Testzeitraum zufällig verteilten Zeitpunkten im Falle der statischen Aktivitäten der Mittelwert des jeweiligen Bewegungsmusters über die Zeit gebildet, während für die dynamischen Aktivitäten das Maximum der jeweiligen Bewegung verzeichnet wurde. Die Darstellung der Ergebnisse jedes Bewegungsmusters erfolgte mittels Median und Range. Über die Ermittlung des IDP während unterschiedlicher Aktivitäten im Tagesverlauf hinaus konnte anhand der im Ex-vivo-Versuch (siehe 2.2) für jedes Schaf ermittelten Regressionsgleichung, die dem in vivo aufgetretenen IDP entsprechende axiale Last zugeordnet werden.

Aus In-vivo-Untersuchungen am Menschen ist bekannt, dass im Tagesverlauf der Bandscheibendruck sinkt und sich während der Erholungsphasen nachts wieder aufbaut. Um zu untersuchen, ob die Bandscheibe des Schafes in vivo einen ähnlichen Funktionsmechanismus aufweist wie die des Menschen, wurde dieses Phänomen auch beim Schaf untersucht und über einen kontinuierlichen Zeitraum von drei Stunden der Verlauf des IDP während der Aktivphasen und von einer Stunde während der Erholungsphasen der Schafe analysiert.

3 Ergebnisse

3.1 In-vivo-Ergebnisse (Teil 1)

3.1.1 Postoperativer Gesundheitszustand der Tiere

Die Implantation der Druckmesssonden in Allgemeinanästhesie sowie die postoperative Rekonvalenzphase verliefen ohne Komplikationen. Bereits unmittelbar nach Erwachen aus der Narkose begannen die Tiere zu fressen und knapp zwei Stunden nachdem die drei Tiere im Anschluss an die Operation in den Stall gebracht wurden, waren keine narkosebedingten Einschränkungen mehr zu bemerken. Die Schafe verhielten sich ohne merkliche Defizite des Bewusstseins bzw. das Gangbild betreffend, belasteten die Gliedmaßen gleichmäßig und zeigten weder Lahmheits- noch Lähmungserscheinungen. Die Messtechnik wurde von den Tieren gut toleriert und behinderte sie nicht in ihren arttypischen Bewegungen.

3.1.2 Ermittlung der Erholungs- und Aktivitätslasten

Zur Visualisierung der Belastungsbereiche der ovinen Bandscheiben wurde der gesamte IDP-Datenpool eines jeden Schafes in einem separaten Histogramm dargestellt (Abb. 3.1). Die Häufigkeiten der gemessenen IDP-Werte der drei untersuchten Schafe über den 24-stündigen Testzeitraum waren in ihrer Grundgesamtheit nicht normalverteilt. Die Häufigkeitsverteilung des gesamten Datensatzes aller drei Schafe folgte vielmehr einem bimodalen Muster mit einer deutlichen Polarisierung der Werte und dem Auftreten von zwei lokalen Maxima.

Im Zuge der Messwertanalyse wurde eine artifizielle Einteilung der Ergebnisse in individuelle Erholungs- und Aktivitätsphasen der Tiere vorgenommen. Diese standen mit ihren Mittelwerten durch ihre jeweils unimodale Verteilung in guter Übereinstimmung zu den beiden im Gesamttestzeitraum ermittelten Modalwerten. Um den Mittelwert der Erholungs- bzw. Aktivitätsphasen herum zeigten die Beobachtungen eine nahezu symmetrische Verteilung, im Falle der Aktivitätsphasen mit einem teils leicht rechtsschiefen Verteilungsmuster. In den Ruhephasen kamen die Daten nahe um den Mittelwert zu liegen. Die resultierenden Mittelwerte der

Erholungs- bzw. Aktivitätsphasen lagen für die drei Versuchstiere bei ca. 0,42 bzw. 0,75 MPa (S1), 0,6 bzw. 1,1 MPa (S2) und 0,3 bzw. 0,8 MPa (S3). Dabei bezeichnen die Abkürzungen „S1“, „S2“ und „S3“ jeweils die Ergebnisse des Schafes Nr. 1, Nr. 2 bzw. Nr. 3.

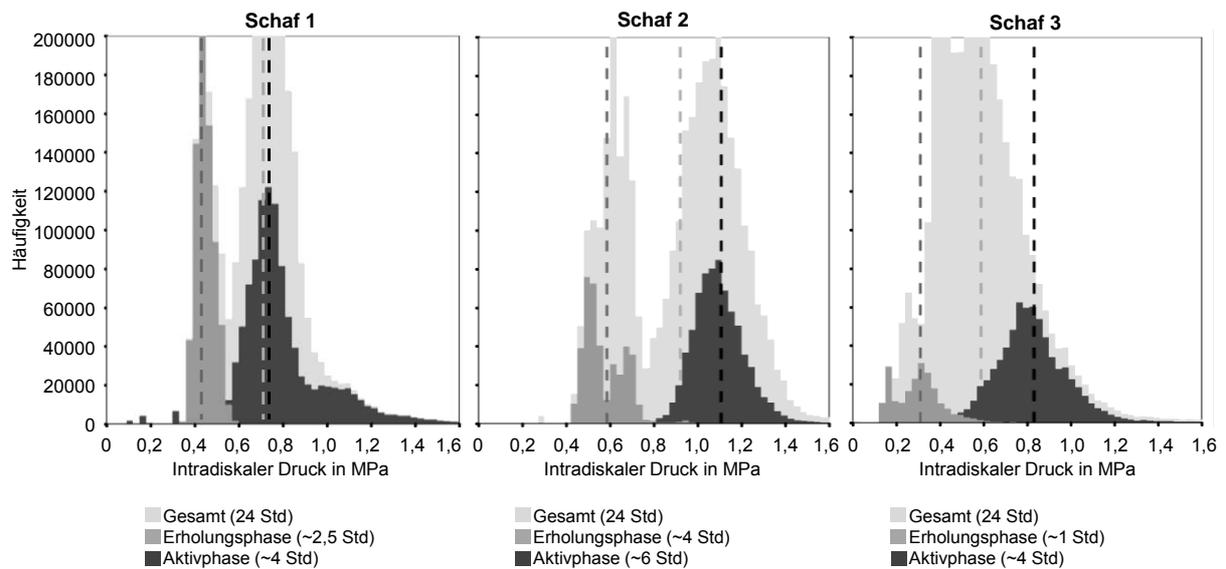


Abb. 3.1: Häufigkeitsverteilung der Messergebnisse. Die Häufigkeiten der IDP-Werte der 24-stündigen Druckmessungen wurden insgesamt und unterteilt in Erholungs- und Aktivitätsphasen für jedes Schaf in einem Histogramm aufgetragen. Die hieraus abgeleiteten Mittelwerte der beiden Phasen von Schaf 1 dienten der Ermittlung der axialen Kompressionslasten des anschließenden In-vitro-Tests.

3.2 Ex-vivo-Ergebnisse

Ermittlung axialer Kompressionskräfte

Da die In-vitro-Untersuchungen aus zeitlichen und organisatorischen Gründen unmittelbar im Anschluss an die In-vivo-Messungen des ersten Versuchstieres beginnen mussten, wurden den physiologischen Lasten des nachgeschalteten In-vitro-Experiments zum Nucleusersatz auch ausschließlich die Ergebnisse des ersten Schafes zugrunde gelegt.

Im Kompressionstest zeigte sich ein linearer Zusammenhang zwischen IDP und extern applizierter Kompressionskraft (Abb. 3.2). Den in vivo gemessenen Druckwerten von ca. 0,75 MPa während der Aktivitätsphasen des Schafes bzw. ca.

0,5 MPa während der Erholungsphasen entsprachen demzufolge axiale Kompressionskräfte von 58 bzw. 130 N, die in vitro als Tages- bzw. Nachtlast Verwendung fanden. Der genaue aus dem Histogramm abgeleitete Mittelwert für die Erholungsphase des ersten Schafes lag bei 0,42 MPa. Für die In-vitro-Tests wurde dieser Wert auf 0,5 MPa angepasst, um die ohnehin relativ geringen Lasten während der Erholungsphase und einen evtl. postmortem reduzierten Hydratationszustand der Bandscheiben des anschließenden In-vitro-Versuches auszugleichen.

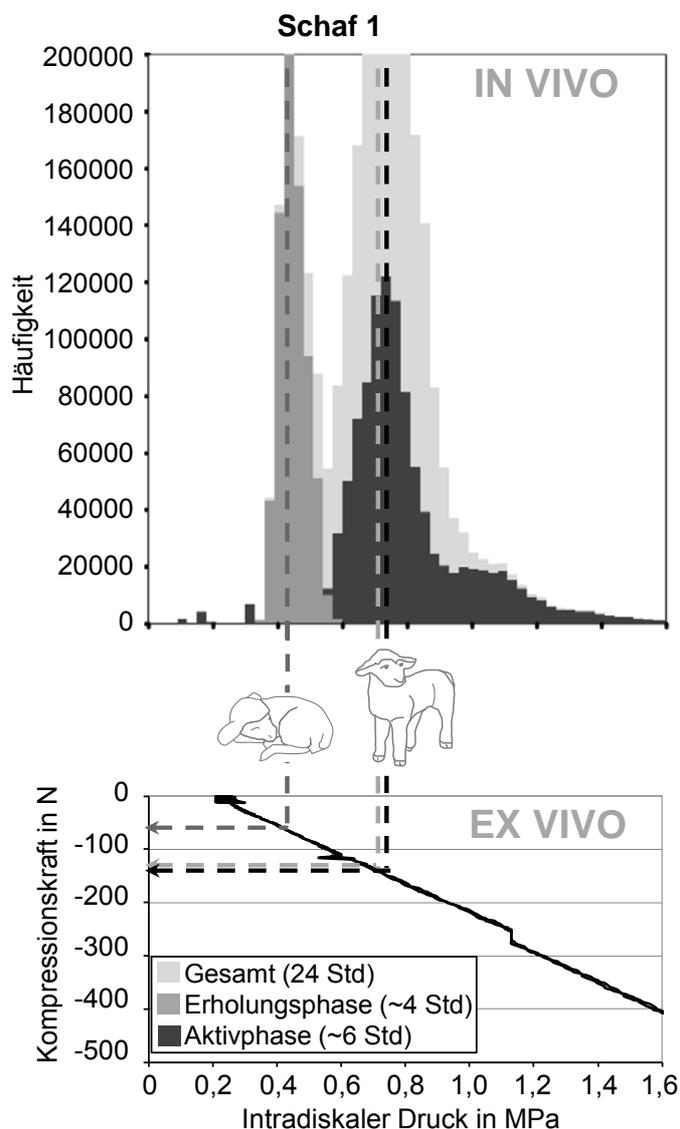


Abb. 3.2: Ermittlung physiologischer Kompressionskräfte während Aktivitäts- und Ruhephasen.

Den für Schaf 1 in vivo errechneten Mittelwerten für die Erholungs- bzw. Aktivitätsphasen in Höhe von 0,5 bzw. 0,75 MPa (oben) konnten ex vivo (unten) anhand der linearen Korrelation zwischen IDP und applizierter Kompressionskraft, axiale Lasten von 58 bzw. 130 N zugeordnet werden.

3.3 In-vitro-Ergebnisse

3.3.1 Steifigkeitstest

Der Steifigkeitstest zeigt einen nichtlinearen Zusammenhang zwischen applizierter Kraft und gemessener Verformung. Dabei stieg die Steifigkeit der Präparate mit zunehmender Kraft an.

Hieraus resultierte für alle Testgruppen gleichermaßen eine Rangfolge der Steifigkeitsbeträge von k_l (niedriger Kraftbereich) < k_m (mittlerer Kraftbereich) < k_u (oberer Kraftbereich), die sich zueinander signifikant unterschieden (Abb. 3.3). Innerhalb der drei untersuchten Testintervalle k_l , k_m und k_u konnten bis auf zwischen k_l (INTAKT) und k_l (DEF-NUK_{n+k}) keine signifikanten Unterschiede zwischen den Testgruppen festgestellt werden.

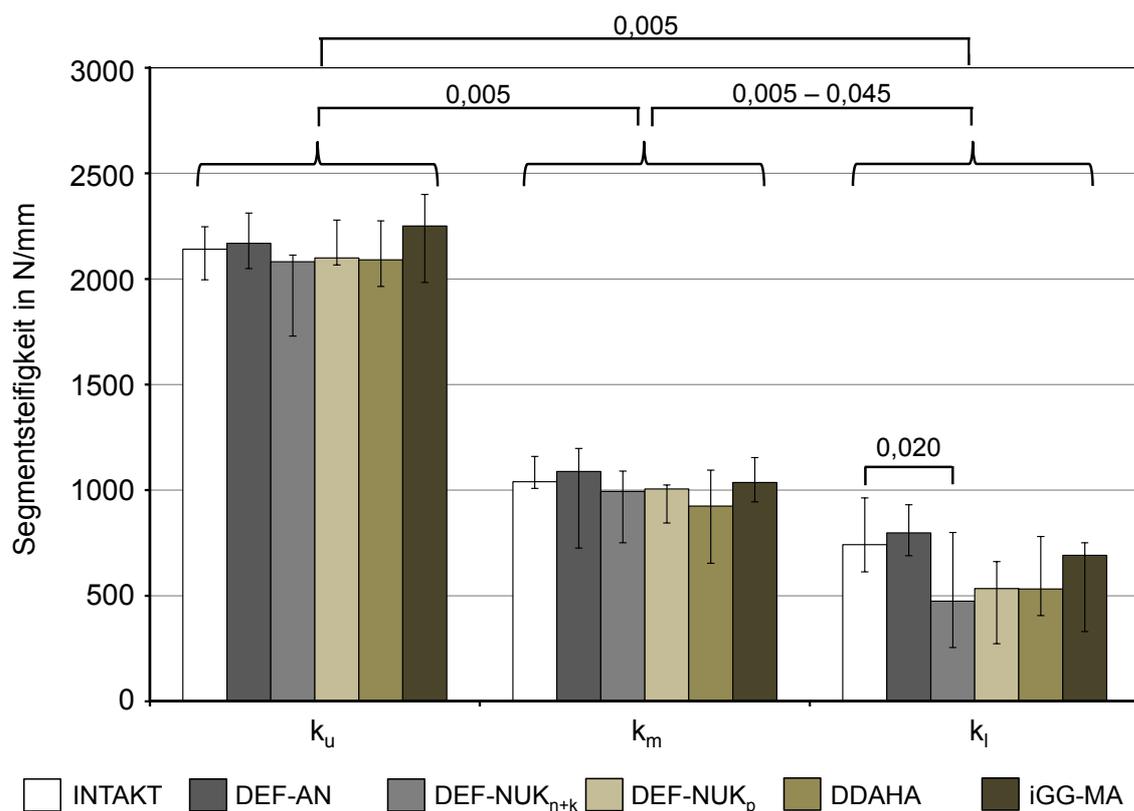


Abb. 3.3: Segmentsteifigkeiten. Darstellung von Median und Ranges der innerhalb der Kraftintervalle k_u , k_m und k_l ermittelten Steifigkeiten der Präparate. Die Zahlenwerte repräsentieren signifikante Unterschiede zwischen den Testgruppen (Signifikanzniveau: $p < 0,05$).

3.3.2 Kriech-Relaxations-Test

Das alternierende Lastprotokoll des In-vitro-Tests aus 130 und 58 N axialer Kompressionskraft resultierte aus den physiologischen Zielgrößen des in vivo gemessenen IDP von 0,75 (Aktivitätsphase) bzw. 0,5 MPa (Erholungsphase).

Allen Testgruppen gemein war ein charakteristisches mechanisches Verhalten viskoelastischer Materialien. Während der Belastungsphasen zeigten die Segmente ein typisches Kriech-, während der Entlastungsphasen hingegen ein typisches Relaxationsverhalten (Abb. 3.4) mit einem nichtlinearen, einen Grenzwert ansteuernden Verlauf, der zwar in beiden Phasen approximiert, aber nicht vollständig erreicht wurde. Da der erste Zyklus des Lastprotokolls komplett zur Präkonditionierung verwendet wurde, sind ausschließlich die Ergebnisse des zweiten und dritten Zyklus dargestellt. Die Präparate aller Testgruppen erreichten weder in der Kriech- noch in der Relaxationsphase ihren Equilibriumszustand. Eine 30-minütige Relaxationsphase reichte nicht aus, den durch eine 15-minütige Belastungsphase am Bewegungssegment entstandenen Höhenverlust auszugleichen.

Bewegungssegmente der INTAKT-Gruppe resultierten am Ende des Testprotokolls in einem mittleren Höhenverlust von $\sim 0,03$ mm (Standardabweichung 0,011 mm). Am deutlichsten wich iGG-MA von INTAKT ab, allerdings ließen sich keine signifikanten Höhenunterschiede am Ende des gesamten Testprotokolls zwischen INTAKT und den verschiedenen Defekt- und Implantatgruppen herausstellen, die für DEF-AN bei 0,03 mm (Standardabweichung 0,006 mm), für DEF-NUK_{n+k} bei 0,02 mm (Standardabweichung 0,016 mm), für DEF-NUK_p bei 0,04 mm (Standardabweichung 0,02 mm) für iGG-MA bei 0,05 mm (Standardabweichung 0,02 mm) und für DDAHA bei 0,03 mm (Standardabweichung 0,02 mm) lagen.

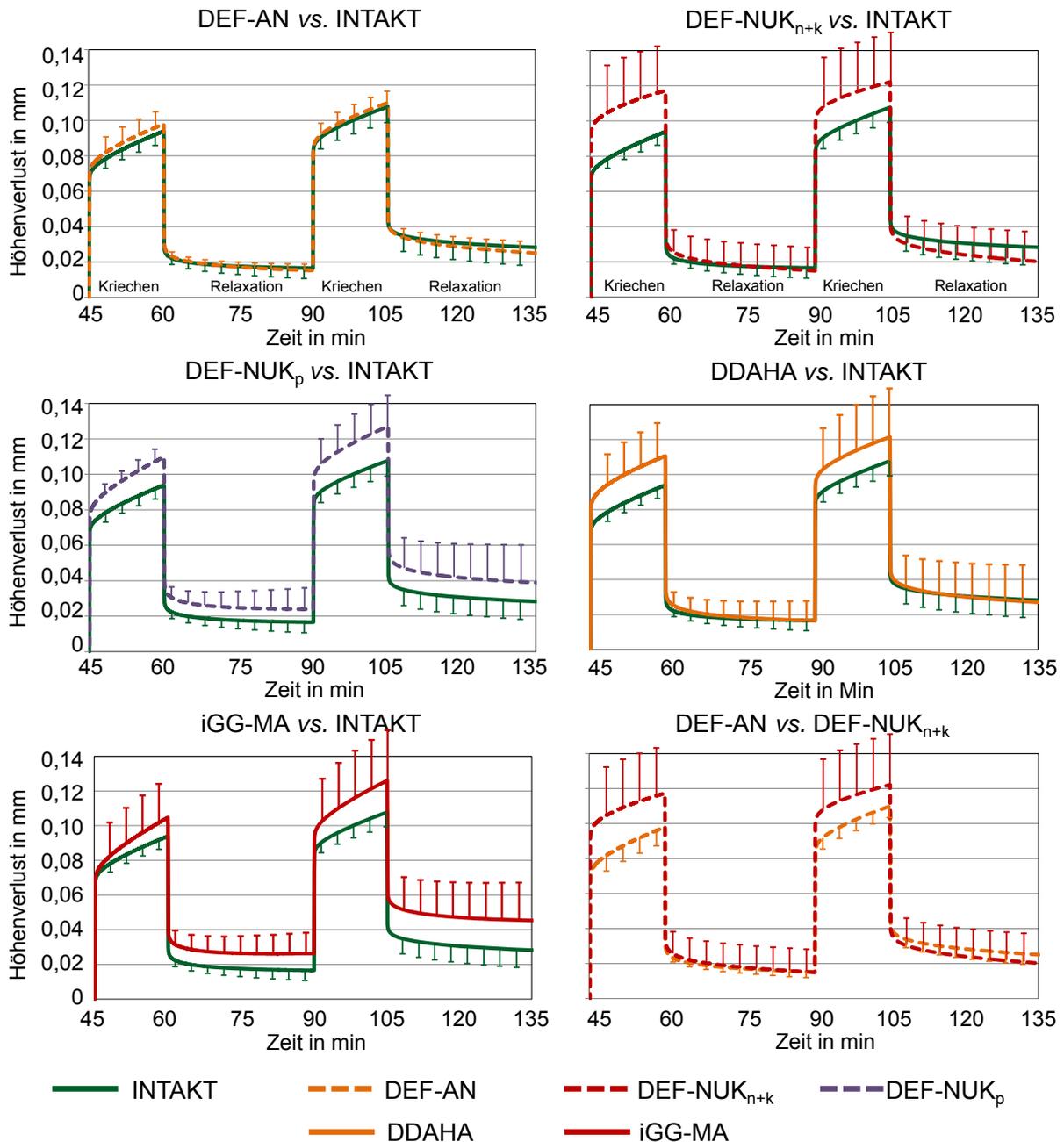


Abb. 3.4: Höhenverlust während des Kriech-Relaxations-Tests. Höhenverlust der unterschiedlichen Testgruppen im Zeitverlauf. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen des 2. und 3. Zyklus jeweils bezogen auf den Wert am Ende des 1. Zyklus.

Eine isolierte Untersuchung des Kriech- bzw. Relaxationsverhaltens (Abb. 3.5) ergab keine signifikanten Unterschiede im Gruppenvergleich zwischen INTAKT und DEF-AN bzw. zwischen INTAKT und DDAHA. Die Entfernung und Reimplantation des natürlichen Nukleusgewebes (DEF-NUK_{n+k}) führte zu signifikanten Abweichungen im Verlauf der Relaxationsphasen des zweiten und dritten Zyklus, während sich in DEF-NUK_p lediglich der dritte Belastungszyklus signifikant zu INTAKT unterschied. Signifikante Unterschiede ergaben sich auch zwischen INTAKT und iGG-MA, hier wichen die Kriechphasen deutlich voneinander ab.

Während die Unterschiede in den Höhenverlusten zwischen INTAKT und den einzelnen Testgruppen meistens nicht signifikant ausfielen, zeigten sich bei der Analyse des IDP meist deutliche Veränderungen (Abb. 3.6). Allein ein isolierter Anulusdefekt (DEF-AN) zeigte keine signifikante Abnahme des IDP gegenüber INTAKT. Der größte Druckverlust im Mittel von 37% wurde für die Präparate der Testgruppe iGG-MA ermittelt, gefolgt von der Testgruppe DDAHA, bei der der Druckverlust bei 32% lag. Die beiden Nukleusdefekte (DEF-NUK_{n+k} und DEF-NUK_p) kamen in der Ausprägung des IDP zwischen INTAKT und den beiden Implantatgruppen zu liegen. Dabei führte mit einem 26%igen Druckverlust DEF-NUK_{n+k} zu einer signifikanteren Beeinträchtigung des Segmentverhaltens als DEF-NUK_p mit 17%. Signifikant war darüber hinaus der Druckunterschied zwischen den beiden Defektvarianten DEF-AN und DEF-NUK_{n+k}, die im Mittel um 22% voneinander abwichen.

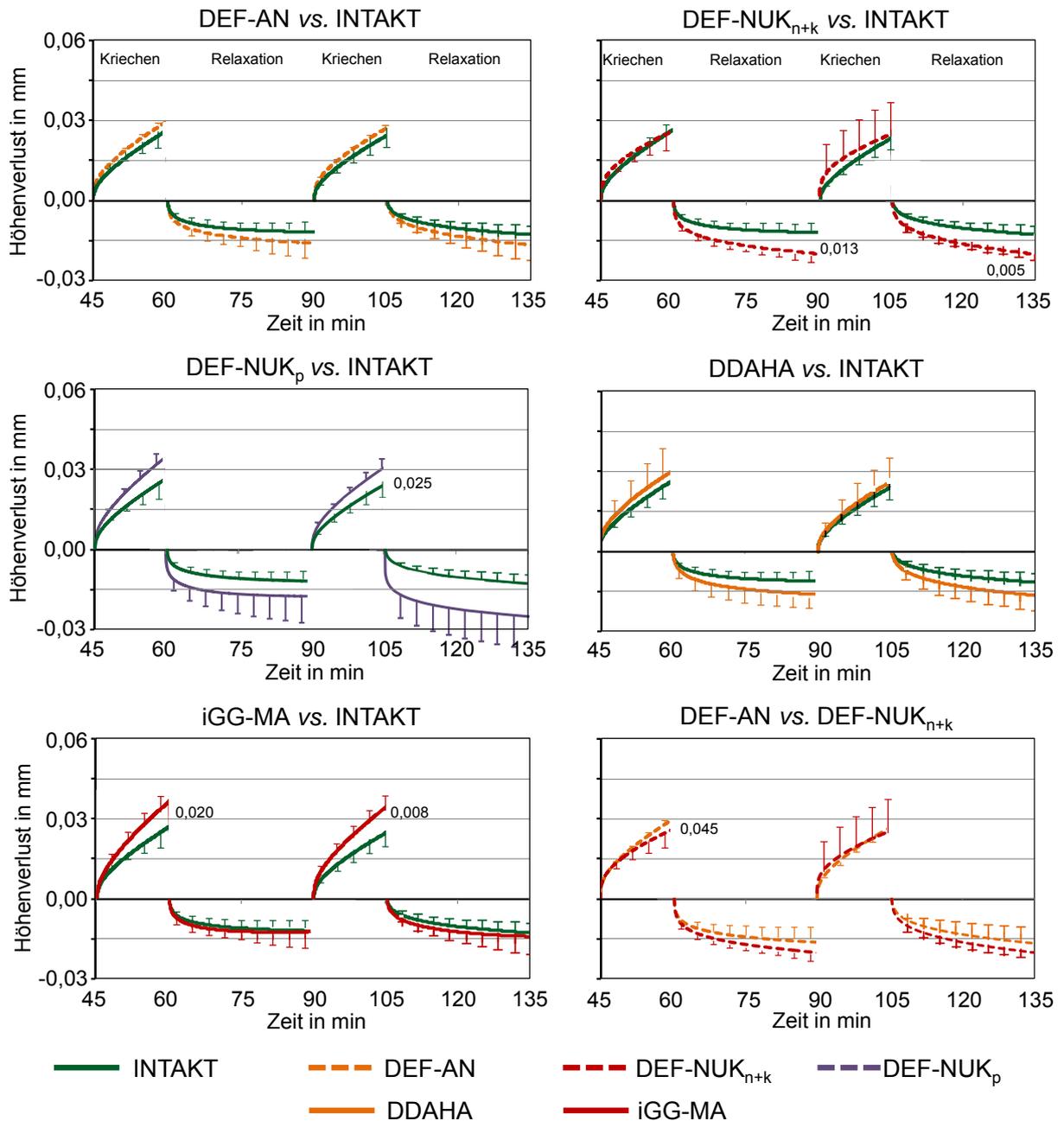


Abb. 3.5: Kriech- und Relaxationsphasen. Isoliertes Verformungsverhalten der unterschiedlichen Testgruppen während des Kriechens und der Relaxation. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen des 2. und 3. Zyklus jeweils bezogen auf den Wert am Beginn der Kriech- bzw. Relaxationsphase. Die Zahlenwerte repräsentieren signifikante Unterschiede zwischen den Testgruppen (Signifikanzniveau: $p < 0,05$).

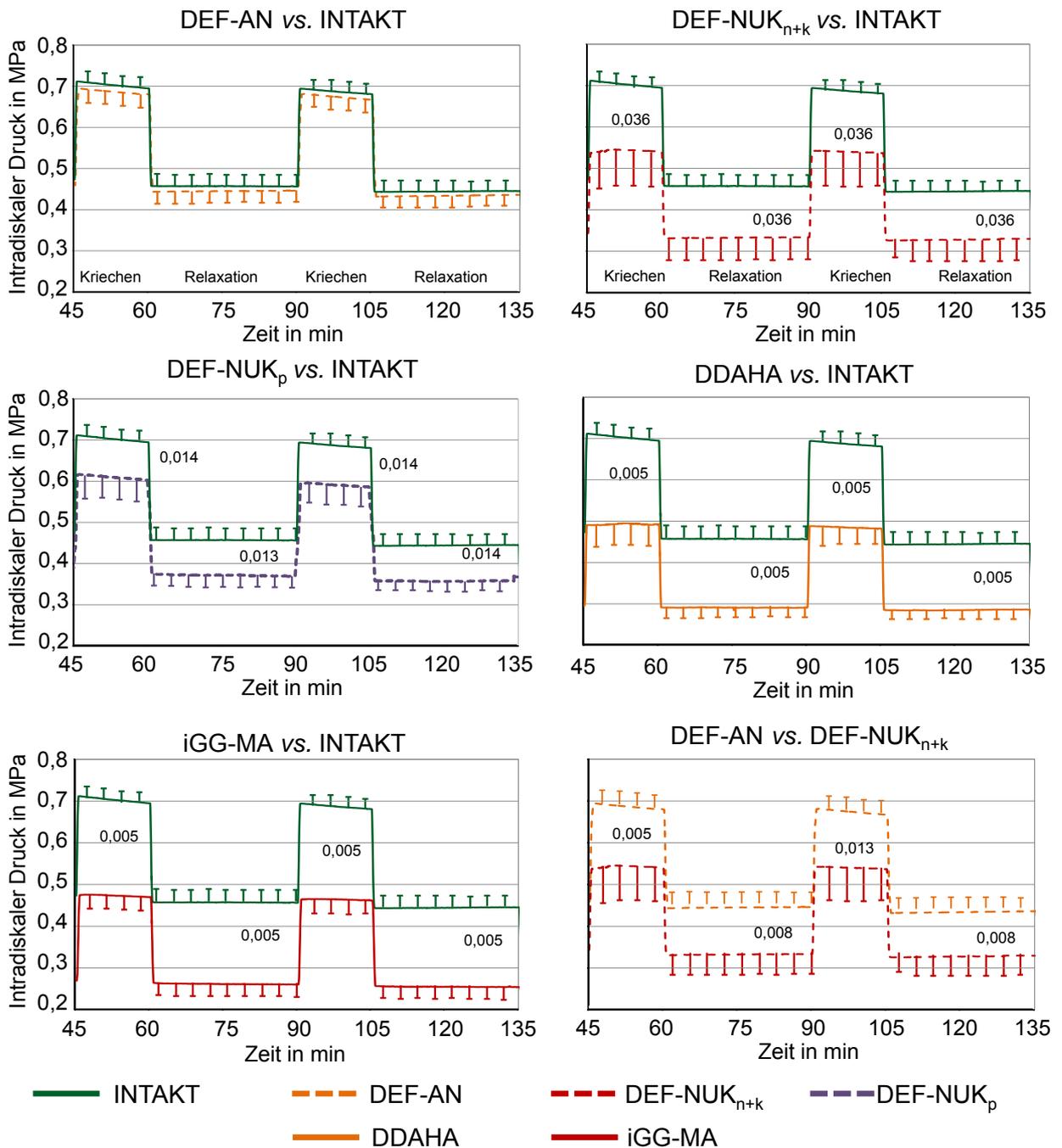


Abb. 3.6: Intradiskaler Druck im Zeitverlauf. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen des 2. und 3. Zyklus. Die Zahlenwerte repräsentieren signifikante Unterschiede zwischen den Testgruppen (Signifikanzniveau: $p < 0,05$).

3.4 In-silico-Ergebnisse

Die Simulation der In-vivo-Bedingungen mit permeablen Deckplatten (INTAKT_{FE-perm}) führte am Ende eines jeden Entlastungszyklus zu einer vollständigen Wiederstellung der Bandscheibenhöhe, während impermeable Deckplatten vergleichbar den Umständen in vitro, eine Wiederherstellung der Segmenthöhe durch Fluidrückgewinnung verhinderten und zu einem stufenweisen Verlust an Bandscheibenhöhe pro Belastungszyklus beitrugen, der am Ende des dritten Belastungszyklus mit einem persistierenden Höhenverlust von ca. 0,1 mm für INTAKT_{FE-block} endete (Abb. 3.7). Diesem Resultat geschuldet wurden für die Interpretation der In-vitro-Ergebnisse im Weiteren ausschließlich die Modellvarianten mit geblockten Deckplatten berücksichtigt.

3.4.1 Höhenverlust und intradiskaler Druck

Unter Berücksichtigung einer vollständigen Entfernung und anschließenden Reimplantation des Nukleus (DEF-NUK100_{FE-block}) führte dies nur zu einer geringfügigen Beeinträchtigung des Bandscheibenverhaltens gegenüber INTAKT_{FE-block} (Abb. 3.7). Während es in den Entlastungsphasen unter 100 N Kompression zu einer vernachlässigbaren Beeinträchtigung des Segmentverhaltens kam, fiel unter den Belastungsphasen von 500 N der Druck im Zentrum des Nukleus nur um ca. 10% und der Höhenverlust stieg um ca. 5%.

Wurde eine reduzierte Reimplantationsmenge von 98% (DEF-NUK98_{FE-block}) angenommen, konnte in Übereinstimmung mit den In-vitro-Untersuchungen eine Steigerung des Höhenverlustes um ca. 50% und ein ca. 25%iger Druckverlust während Belastung im Vergleich zum Intaktzustand beobachtet werden (Abb. 3.7). Unter Entlastung führte diese Annahme allerdings im Gegensatz zu den Beobachtungen in vitro und INTAKT_{FE-block} zu einem Erholungsverhalten, das der In-vivo-Situation deutlich näherkam. Der Höhenverlust konnte komplett und die Abnahme des IDP zu 50% ausgeglichen werden.

Unter Variation der Materialparameter des Modells (Abb. 3.8) nahm die Reduktion des osmotischen Potentials (OP90_{FE-block}) mit nur 5 bzw. 8% vernachlässigbaren Einfluss auf den Höhenverlust und IDP des Segments. Den größten Einfluss auf das

Segmentverhalten hingegen hatte die Reduktion des Wassergehaltes ($WG_{80_{FE-block}}$) über eine Verdoppelung des Höhenverlustes und eine mehr als 50%ige Senkung des IDP während der Tageslast. Ein um 25 % reduzierter Elastizitätsmodul ($EL_{75_{FE-block}}$) führte während der Belastung zu einer 30%igen Steigerung des Höhenverlustes der Bandscheibe, in der Entlastung hingegen konnten keine Unterschiede im Höhenverlust zu $INTAKT_{FE-block}$ beobachtet werden. Der Einfluss auf den IDP war gegenüber $INTAKT_{FE-block}$ vernachlässigbar gering ausgeprägt.

Bezogen auf den Kompressionsmodul bewirkte weder eine Verringerung des Kompressionsmoduls von 5,2 auf 3,9 MPa ($K_{75_{FE-block}}$) noch eine drastische Minderung von 5,2 auf 0,1 MPa eine Auswirkung auf die mechanische Antwort der Bandscheibe.

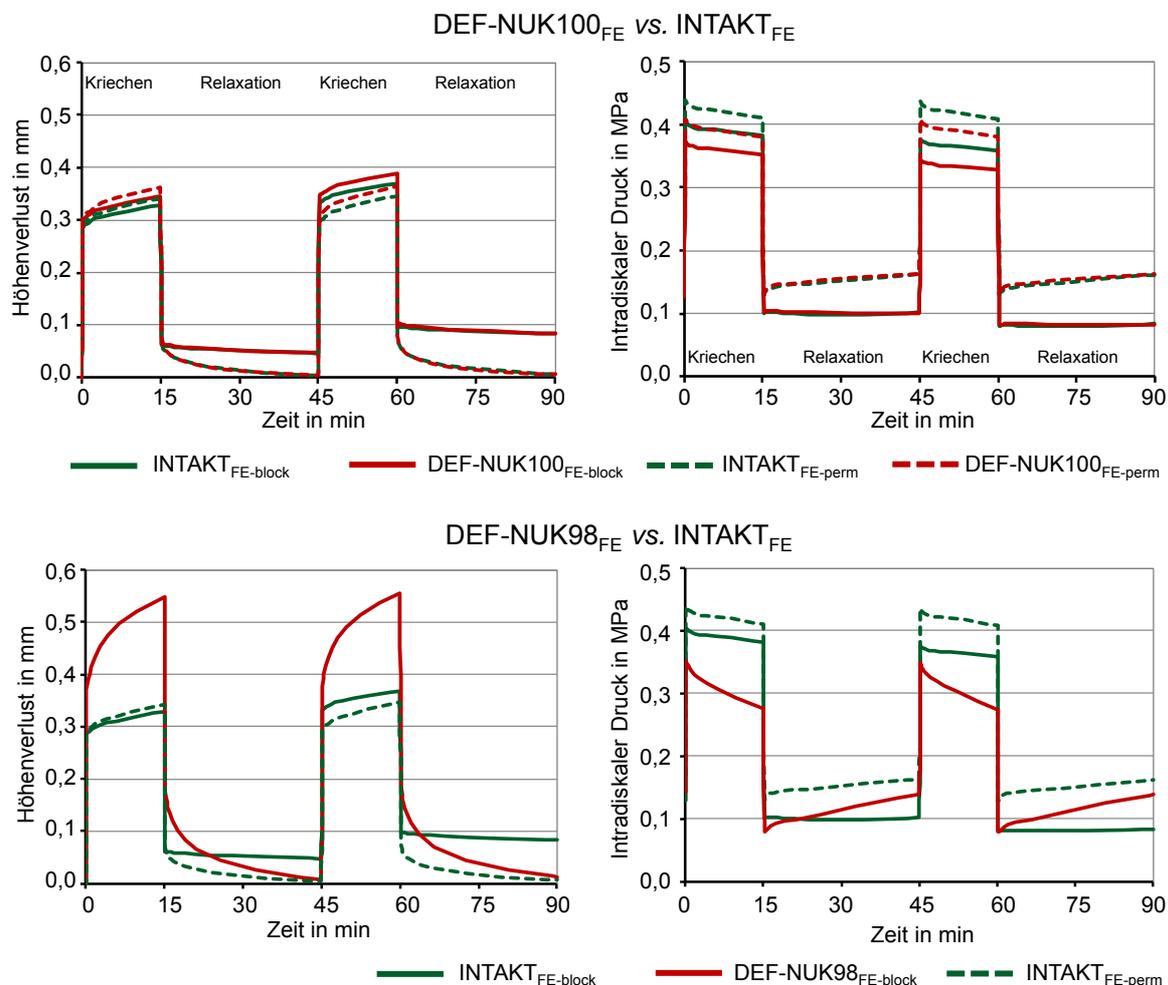


Abb. 3.7: Einfluss des Reimplantationsvolumens im FE-Modell. Zeitabhängiger Verlauf des Höhenverlustes (links) und des intradiskalen Drucks (rechts) bei vollständigem ($DEF-NUK100_{FE-block}$) bzw. 98%igem Reimplantationsvolumen ($DEF-NUK98_{FE-block}$).

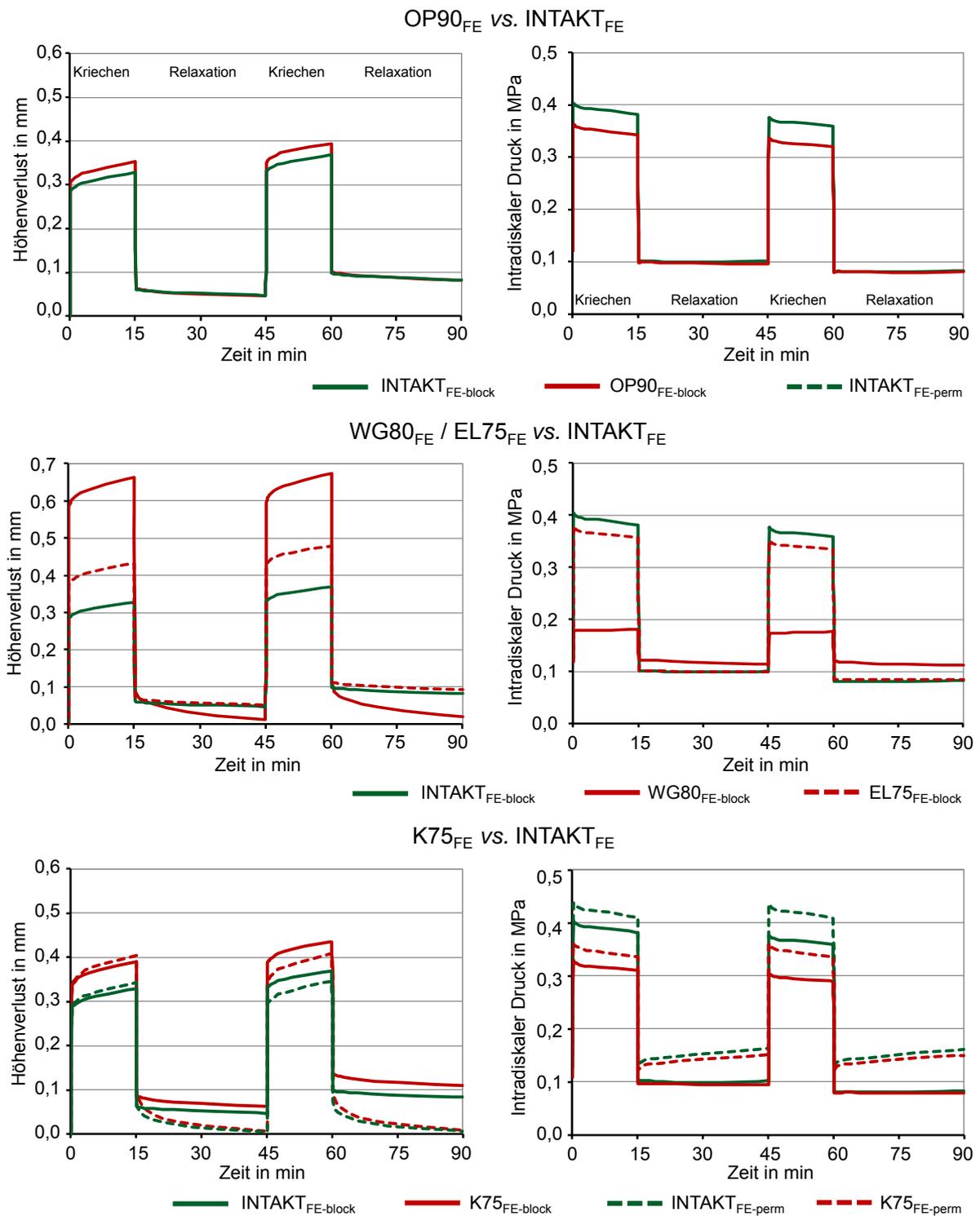


Abb. 3.8: Einfluss diverser Materialparameter im FE-Modell. Zeitabhängiger Verlauf des Höhenverlusts (links) und des intradiskalen Drucks (rechts) nach Reduktion des osmotischen Potentials (OP90_{FE-block}), des Wassergehalts (WG80_{FE-block}) und des Kompressionsmoduls (K75_{FE-block}).

3.4.2 Kraftfluss innerhalb der Bandscheibe

Durch die Kompression der Bandscheibe kommt es infolge der Druckbelastung des Nukleus zu dessen Verformung und in der Folge über die Ausbeulung der Bandscheibe zur Zugdehnung in den Anulusfasern. Während Kompressionslasten in den auf Druck ausgerichteten Bandscheibenkompartimenten Nukleus pulposus und Anulusgrundsubstanz im Modell als positiver Kraftbetrag verrechnet werden, fließen Zugdehnungen der Anulusfasern, die keine Drucksteifigkeit besitzen, als negative Lasten in das Modell ein.

In INTAKT_{FE-block} (Abb. 3.9) resultierten aus den eingeleiteten Kompressionskräften von 500 N im dritten Zyklus Belastungen von ca. 280, 250 bzw. -30 N im Nukleus pulposus, der Anulusgrundsubstanz bzw. den Anulusfasern, in der Summe also wieder 500 N. Für INTAKT_{FE-block} ergab sich dementsprechend durch die vermehrte Zugspannung der Kollagenfaserbündel im Anulus unter Tageslast eine Steigerung der Kompressionslast für das komplette Bandscheibensegment von ca. 10 %. Den Hauptanteil der eingeleiteten Kraft trug mit ca. 60 % der Nukleus. Unter Nachlast (100 N) war der Einfluss der Anspannung der Kollagenfaserbündel mit knapp 2 N am Ende des dritten Zyklus vernachlässigbar, sodass die Lastverteilung in einem Verhältnis zwischen Nukleus und Anulusgrundsubstanz von etwa 68 : 32 erfolgte.

DEF-NUK100_{FE-block} (Abb. 3.9) bewirkte keine Veränderungen in der Lastverteilung zu INTAKT_{FE-block} unter 100 N Kompressionslast. Unter 500 N Kompression sank der Kraftfluss über den Nukleus um 25 N auf 255 N. Die Dehnungsbelastung der Anulusfasern stieg mit 5 N nur geringfügig, die Kompressionsbelastung der Anulusgrundsubstanz im dritten Zyklus mit ca. 30 N auf 280 N jedoch etwas deutlicher an. Selbst unter Simulation eines 100%igen Reimplantationsvolumens führte allein die Aufhebung der Kontinuität der Elemente zwischen Nukleus und Umgebung zu einer Verringerung der lasttragenden Funktion des Nukleus von ca. 60 % (INTAKT_{FE-block}) auf ca. 50 % in DEF-NUK100_{FE-block}.

Wurde über die Beschreibung der Grenzflächenkontakte wie in DEF-NUK100_{FE-block} hinaus zusätzlich das Reimplantationsvolumen auf 98 % verringert (DEF-NUK98_{FE-block}, Abb. 3.9) führte dies zu einer merklichen Abnahme der Belastung des Nukleus auf nur mehr ca. 36 %. Mit 13 N waren die Anulusfasern fast

60 % weniger beansprucht verglichen mit INTAKT_{FE-block}. Gleichzeitig führte die Steigerung der Kompressionslast auf die Anulusgrundsubstanz dazu, dass diese mit ca. 66% zum Hauptträger der mechanischen Last am Bewegungssegment wurde.

Auch die Veränderung der untersuchten Materialparameter (Abb. 3.10) beeinflusste die Lastverteilung im Bewegungssegment. OP90_{FE-block} als auch EL75_{FE-block} resultierten in einer Steigerung der Kompressionsbelastung des Anulus bei gleichzeitiger Abnahme der mechanischen Kompetenz des Nukleus von ca. 10 % und bewirkten damit die Umkehr der Verhältnisse vom Nukleus als primär lasttragender Instanz hin zum Anulus. Ein marginaler Einfluss der Kollagenfasern zeigte sich lediglich unter Tageslast in EL75_{FE-block}.

Die weitreichendsten Effekte auf den Kraftfluss innerhalb der Bandscheibe zeigte WG80_{FE-block}. Eine 20%ige Reduktion des Wassergehalts im Nukleus senkte den Kraftfluss über den Nukleus verglichen mit INTAKT_{FE-block} um 80% und führte damit über eine verbleibende Lastaufnahmekapazität des Nukleus von nur noch 10 % der applizierten Last, zum nahezu vollständigen Verlust der mechanischen Funktion des Nukleus. Die Steigerung der Kompressionslast auf die Anulusgrundsubstanz war mit 80% immens, sodass die Anulusfasern kaum mehr eine physiologische Dehnungsbelastung erfuhren und stattdessen einer unphysiologischen Kompression ausgesetzt zu sein schienen. Diese Ergebnisse untermauern die Bedeutung des Wassergehaltes für die Biomechanik der Bandscheibe.

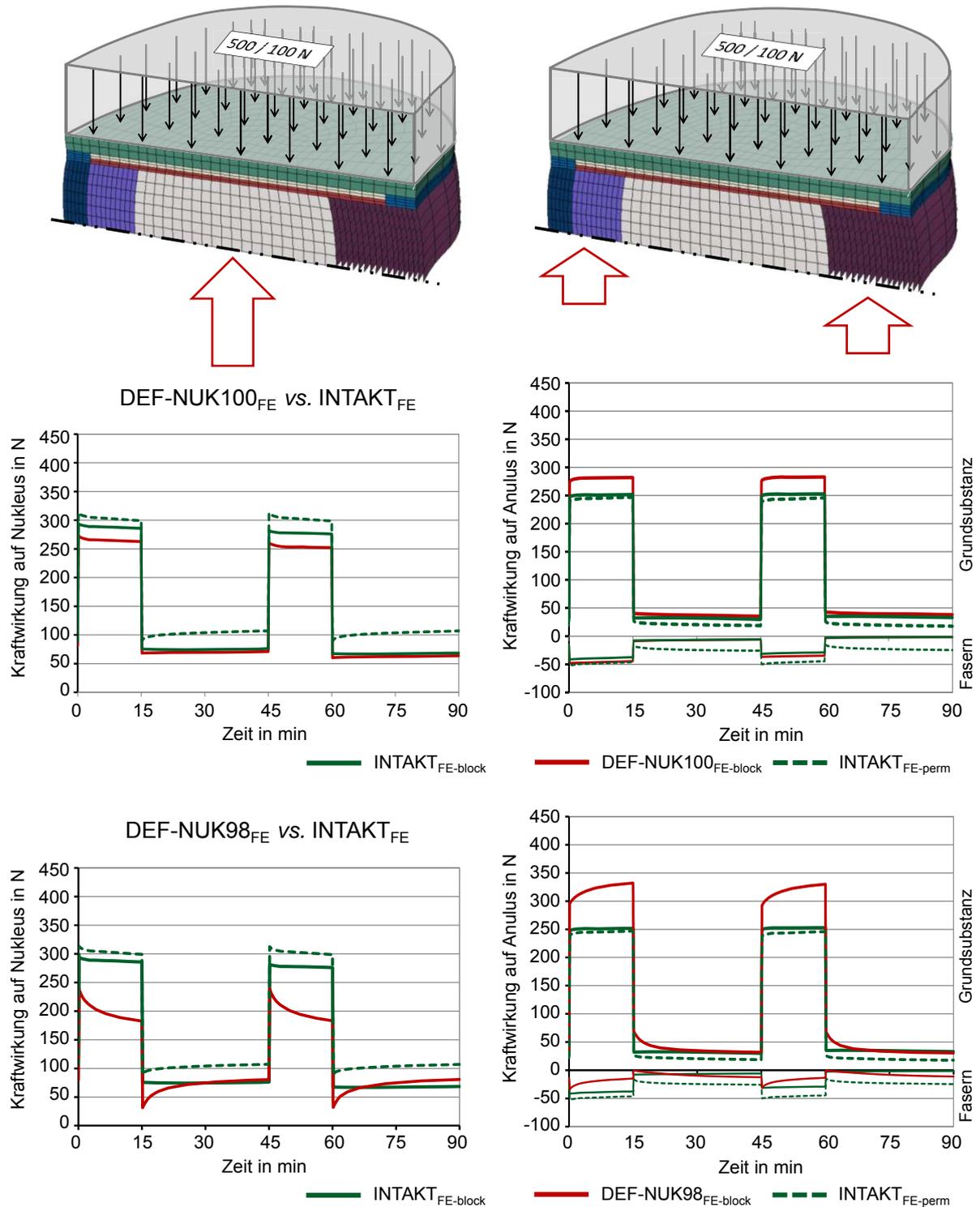


Abb. 3.9: Kraftfluss im FE-Modell. Zeitabhängiger Verlauf der Lastüberleitung über den Nukleus (links) bzw. den Anulus (rechts) bei vollständigem (DEF-NUK100_{FE-block}) bzw. 98%igem Reimplantationsvolumen (DEF-NUK98_{FE-block}) nach Einleitung der Kompressionslasten von 500 N (Belastungsphase) bzw. 100 N (Entlastungsphase). Kompressionsbelastungen des Nukleus pulposus und der Anulusgrunds substanz sind in den Diagrammen positiv, Zugbelastungen in den Anulusfasern negativ dargestellt.

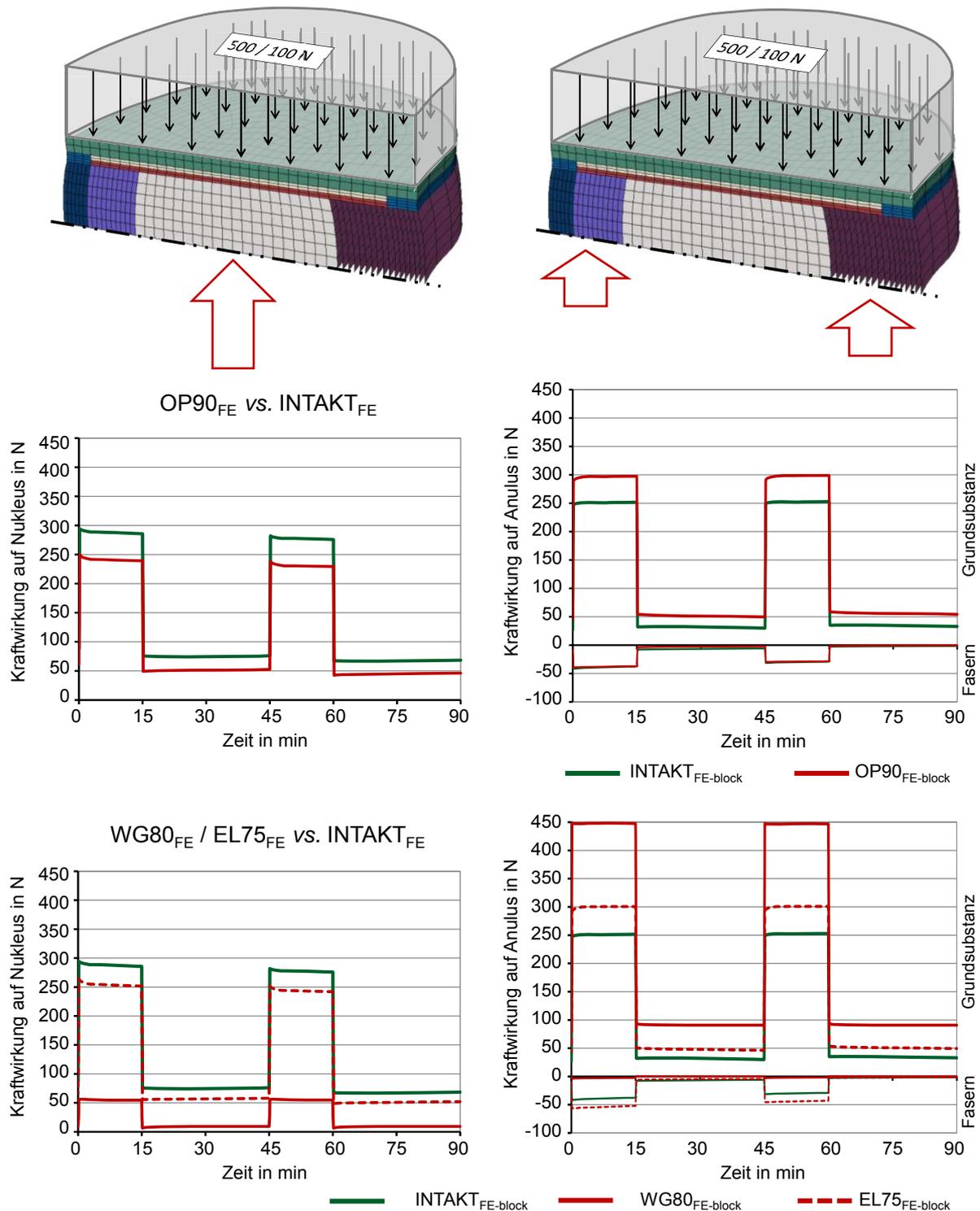


Abb. 3.10: Kraftfluss im FE-Modell. Zeitabhängiger Verlauf der Lastüberleitung über den Nucleus (links) bzw. den Anulus (rechts) nach Reduktion des osmotischen Potentials (OP90_{FE-block}), des Wassergehalts (WG80_{FE-block}) und des Elastizitätsmoduls (K75_{FE-block}) nach Einleitung der Kompressionslasten von 500 N (Belastungsphase) bzw. 100 N (Entlastungsphase). Kompressionsbelastungen des Nucleus pulposus und der Anulusgrundsubstanz sind in den Diagrammen positiv, Zugbelastungen in den Anulusfasern negativ dargestellt.

3.5 In-vivo-Ergebnisse (Teil 2)

3.5.1 Einfluss des Bandscheibenlevels auf den intradiskalen Druck

Bei zwei der drei Schafe wurde direkt nach der Fixierung der Druckmesssonden im Bandscheibenfach L4-L5 kein Signal gemessen/empfangen. Im Folgenden können daher nur die Ergebnisse für ein Schaf (in diesem Fall Schaf 3) gezeigt werden.

Der IDP im Bandscheibenfach L4-L5 war meistens höher als in L2-L3, zeigte aber bis auf den intraoperativen Wert keine signifikanten Unterschiede (Abb 3.11). Gerade für die dynamischen Aktivitäten Aufstehen und Laufen lagen die Ergebnisse im Bereich relativ großer Streubreiten, während die Ergebnisse der statischen Aktivitäten sehr nah beieinander zu liegen kamen und im Falle von Liegen-intraoperativ mit äußerst geringen Ranges nahezu konstant erschienen. Zwischen den beiden Bandscheibenfächern in S3 konnten durchweg gleiche Tendenzen in der Ausprägung des IDP zwischen den unterschiedlichen Aktivitäten ermittelt werden.

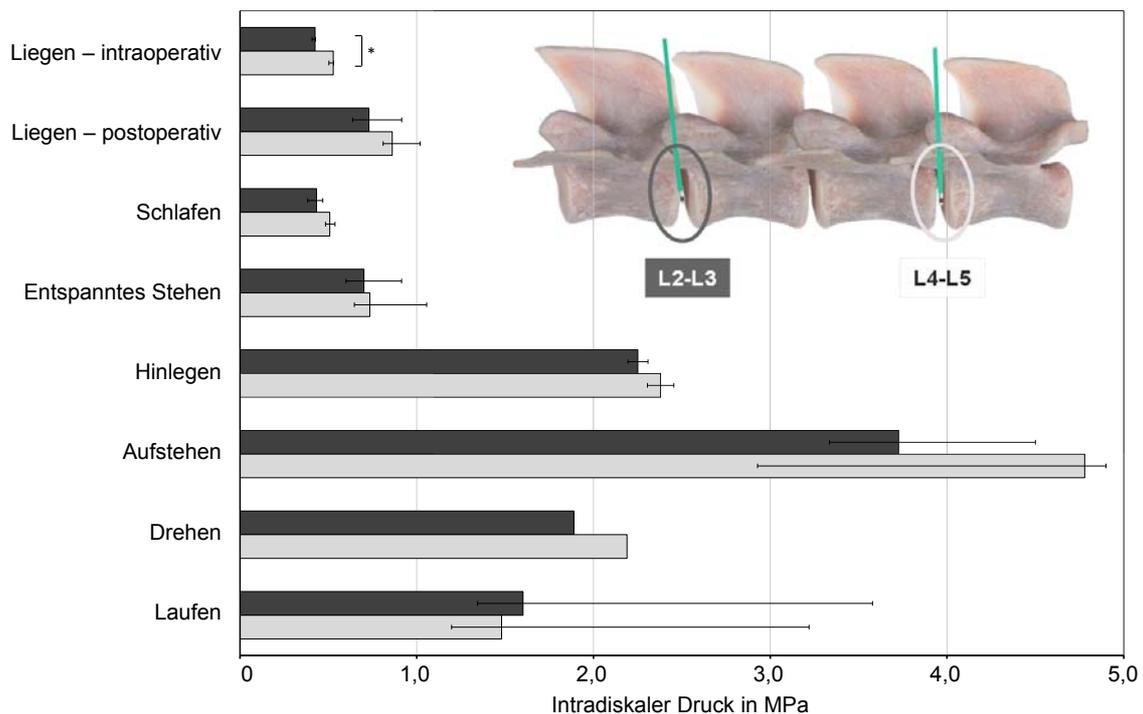


Abb. 3.11: Vergleich der intradiskalen Drücke zwischen L2-L3 und L4-L5 für Schaf Nr. 3. Für die unterschiedlichen statischen und dynamischen Aktivitäten des Tieres konnten bis auf Liegen-intraoperativ keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Bandscheibenfächern ermittelt werden. Dargestellt sind der Median und die Ranges des IDP zu sechs unterschiedlichen über die gesamte Messdauer verteilten Zeitpunkten. Den Ergebnissen für Drehen liegt nur das Ergebnis eines Zeitpunktes zugrunde.

3.5.2 Intradiskaler Druck während unterschiedlicher Aktivitäten

Für die folgenden Untersuchungen konnten die Ergebnisse aller drei Versuchstiere des Bandscheibenfaches L2-L3 herangezogen werden.

Abb. 3.12 zeigt repräsentativ den gemessenen Druck in Schaf 2 während unterschiedlicher Steh- und Liegephasen. Dabei war die Abhängigkeit des IDP vom Hydratationszustand und Belastungsausmaß der Bandscheiben im Tagesverlauf zu erkennen. Die gleiche Körperposition für intraoperatives wie für unmittelbar postoperatives Liegen bewirkte aufgrund der muskelrelaxierenden Wirkung der Narkosemittel einen geringeren IDP, wohingegen für Stehen zu Beginn des 24-stündigen Testzeitraumes bei gleicher Körperhaltung ein höherer IDP als nach einer ausgedehnten Aktivitätsphase des Schafes zu verzeichnen war. Intraoperativ war ein Druck im Zentrum des Nukleus im Mittel der drei Versuchstiere von 0,49 MPa zu verzeichnen, der sich jeweils im Verlauf der Operation als nahezu konstant erwies. Der IDP zeigte einen charakteristisch undulierenden Verlauf mit Druckanstieg während In- und Druckabfall während Expiration. Die atemdepressive Wirkung der Narkosemittel reflektierend, lag die intraoperative Druckdifferenz der beiden Werte (im Mittel der drei Tiere) bei ca. 0,08 MPa, während diese, bedingt durch die muskelrelaxierende Wirkung unter Narkose, im wachen Zustand der Tiere auf Werte von ca. 0,15 MPa anstieg.

In der Aufwachphase nahm mit Nachlassen der muskelrelaxierenden Wirkung der Medikamente der IDP während des Liegens in Seitenlage im Vergleich zum intraoperativ gemessenen Wert von 0,49 MPa im Mittel auf 0,80 MPa zu (Abb. 3.13). Die Werte für Liegen-postoperativ waren die maximal während der Messungen aufgezeichneten Drücke für Liegen. Ähnlich verhielt es sich mit Stehen. Die ersten Standphasen nach der OP erzielten mit ca. 1,41 MPa (S1), 1,25 MPa (S2) und 1,33 MPa (S3) die höchsten Druckwerte, während sich diese im Tagesverlauf im Mittel auf 0,85 MPa beliefen.

Die intradiskalen Drücke der Bewegungsmuster statischer Phasen der Tiere waren durchweg niedriger als die der dynamischen Phasen. Während des Schlafens nachts wurden die geringsten postoperativen Werte im Mittel von 0,50 MPa gemessen.

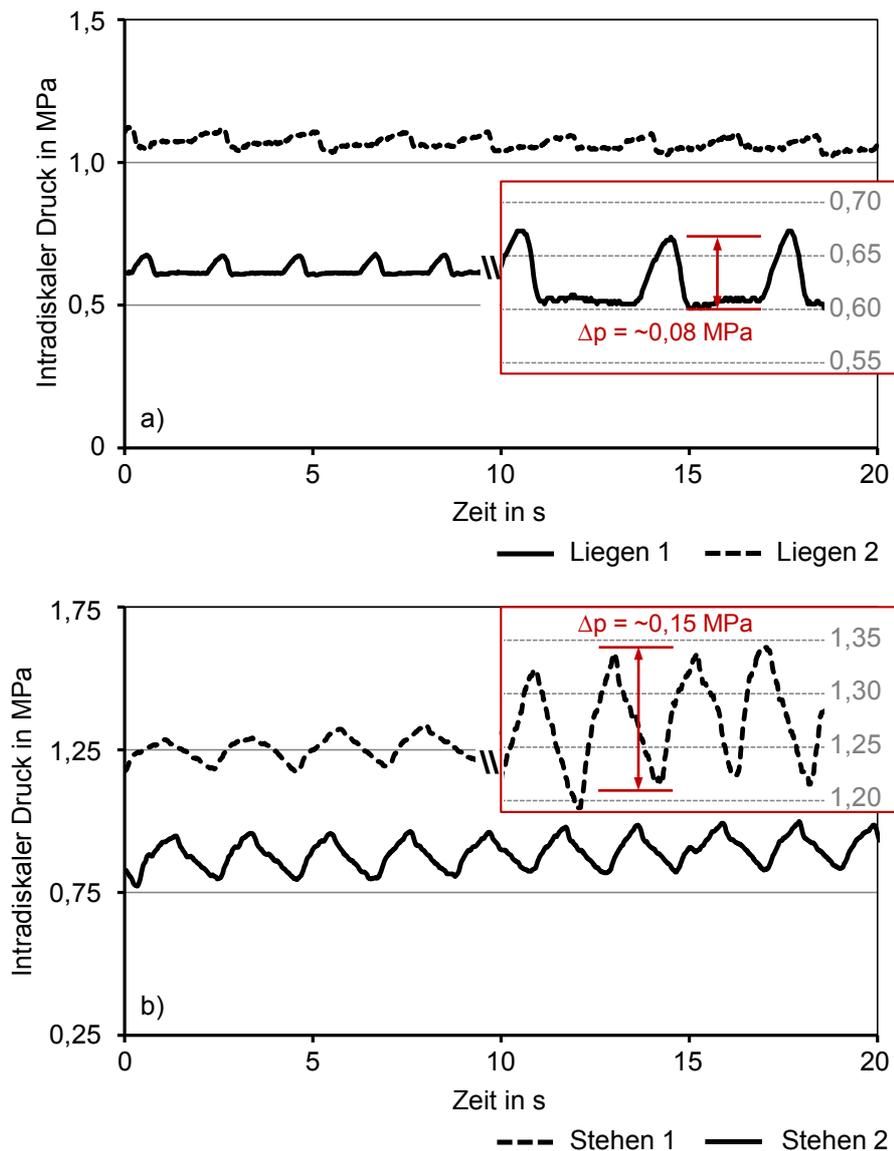


Abb. 3.12: Repräsentative Darstellung des intradiskalen Druckverlaufes während statischer Aktivitäten. Während unterschiedlicher Liege- (a) als auch Standphasen (b) war die Abhängigkeit des IDP vom Hydratationszustand und Belastungsausmaß der Bandscheiben im Tagesverlauf zu erkennen. Intraoperatives Liegen (Liegen 1) verursachte gegenüber unmittelbar postoperativem Liegen (Liegen 2) einen geringeren IDP, während Stehen zu Beginn des 24-stündigen Testzeitraumes (Stehen 1) einen höheren IDP als Stehen 2 nach einer ausgedehnten Aktivitätsphase des Schafes bewirkte. Die atmungsabhängige Druckdifferenz war mit 0,08 MPa intraoperativ deutlich geringer als postoperativ und zeigte deutlich die atemdepressive Wirkung der Medikamente.

Unter statischer Last führten Hinlegen mit 2,10 MPa, Drehen mit 2,63 MPa bzw. Laufen mit 1,86 MPa näherungsweise zu einer Verdoppelung der für entspanntes Stehen gemessenen IDPs. Aufstehen der Tiere verursachte mit 3,59 MPa die höchsten Bandscheibendrucke aller untersuchten Aktivitäten.

3.5.3 Intradiskaler Druck im Tagesverlauf

Aus In-vivo-Untersuchungen am Menschen ist bekannt, dass im Tagesverlauf der IDP sinkt und während Erholungsphasen wieder ansteigt. Dabei war die Zeit für die Regression des Druckes halb so lang wie die Zeit, die unter Belastung zum Druckverlust führte. Um zu analysieren, ob dieses Phänomen auch beim Schaf zu beobachten ist, wurden über möglichst lange kontinuierliche Zeiträume die Entwicklung des IDP während der Ruhephasen der Schafe denen möglichst langer Aktivitätsphasen gegenübergestellt (Abb. 3.14). Da den Schafen völlige Willensfreiheit gewährt und keine Zwangsmaßnahme zugeführt wurde, konnten bei allen drei Schafen vergleichbar auf maximale Zeiträume von einer Stunde kontinuierlicher Erholungs- und drei Stunden kontinuierlicher Aktivitätsphase zurückgegriffen werden. Wie Abb. 3.14 repräsentativ für Schaf 3 zeigt, kommt es während der Aktivitätsphasen der Tiere zu einem kontinuierlichen Abfall des IDP im Mittel von 0,1 MPa/h, wohingegen die Ruhephasen mit einer Rate von 0,2 MPa/h zum Anstieg des Druckes führten. Diese auch beim Menschen zu beobachtende Druckentwicklung im Tagesverlauf geschieht beim Schaf im Mittel in einem Verhältnis von 2:1; das Schaf stellt seinen IDP also doppelt so schnell wieder her wie es ihn unter Belastung im Zeitverlauf verliert.

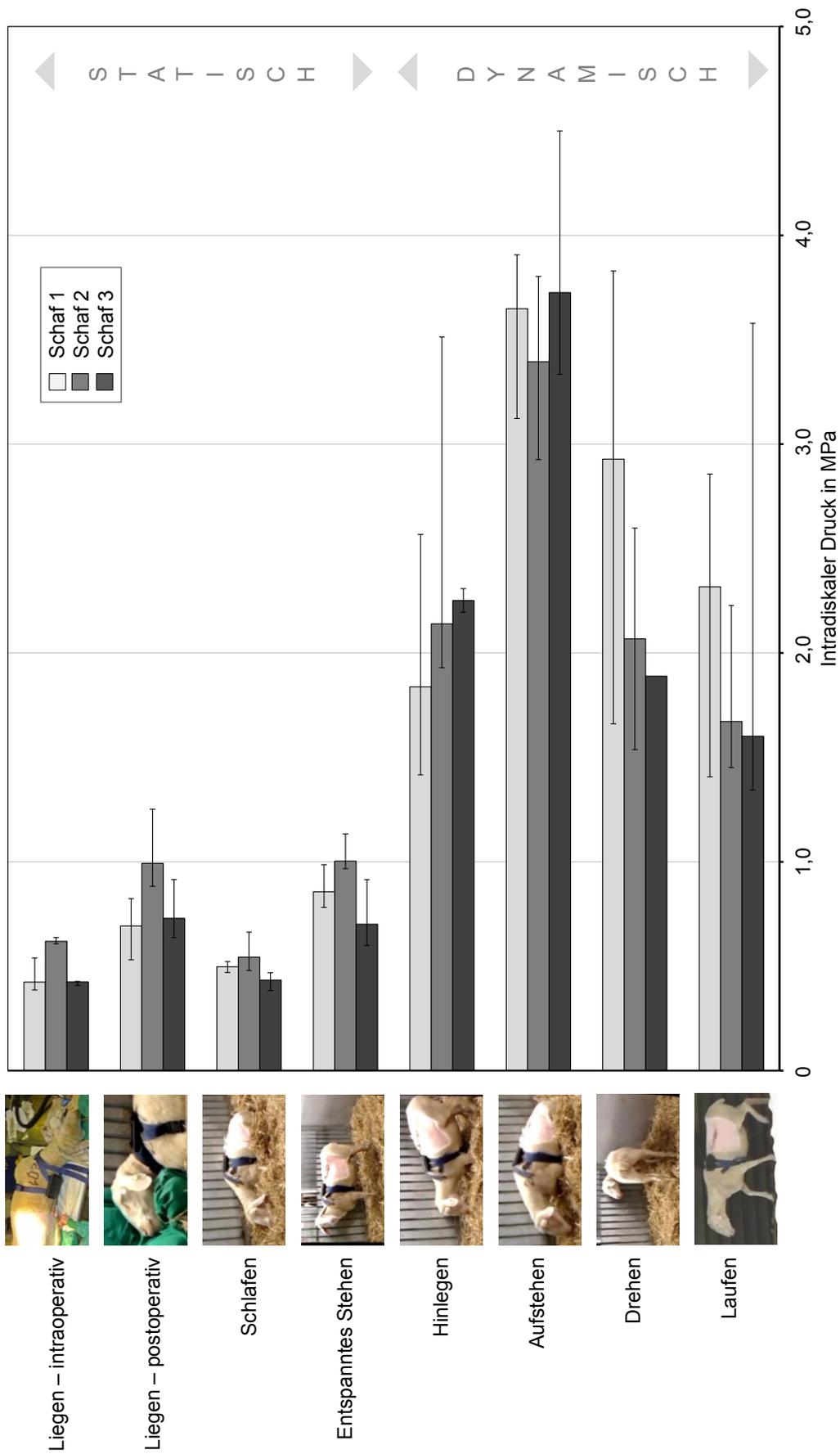


Abb. 3.13: Intradiskaler Druck im Bandscheibenfach L2-L3 der drei Versuchstiere während unterschiedlichen statischer und dynamischer Aktivitäten. Dargestellt sind der Median und die Ranges des IDP zu jeweils sechs unterschiedlichen über den Messzeitraum verteilten Zeitpunkten.

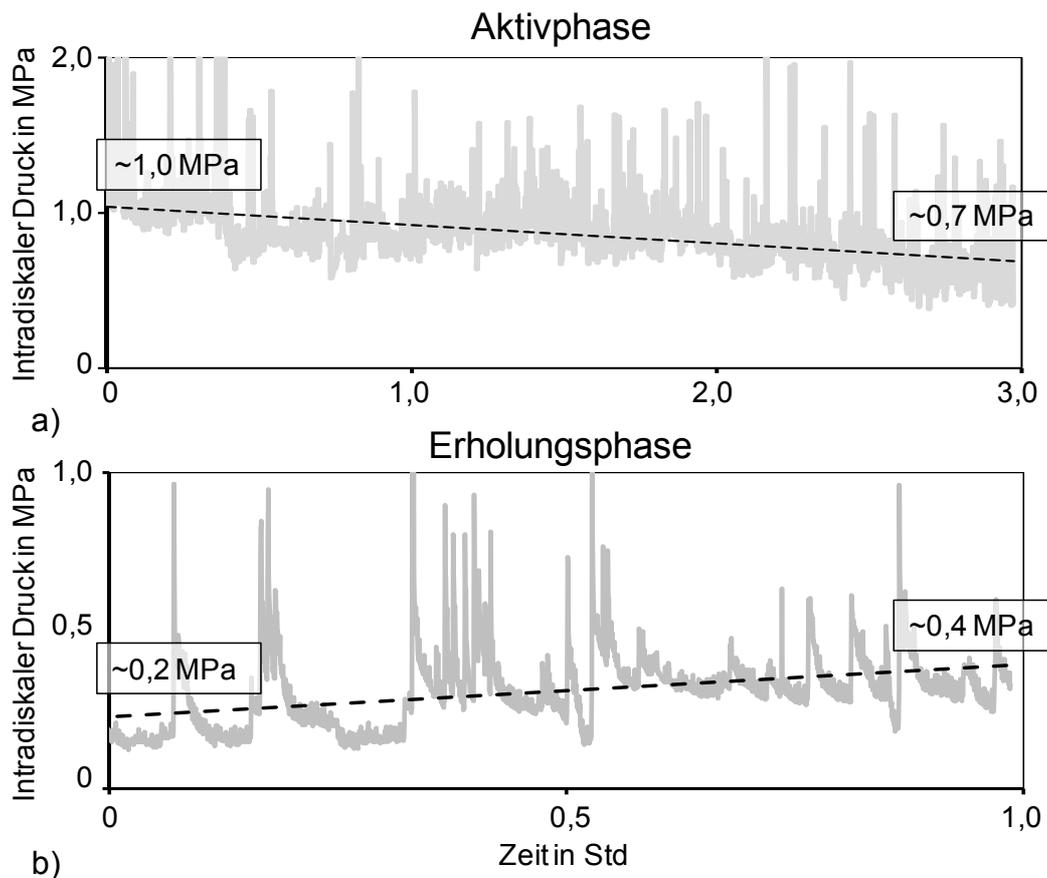


Abb. 3.14: Repräsentativer Verlauf des intradiskalen Druckes. Dargestellt sind eine 3-stündige Aktivitäts- und eine 1-stündige Erholungsphase im Bandscheibenfach L2-L3 des Schafes Nr.3.

3.5.4 Ermittlung axialer Kompressionslasten unterschiedlicher Aktivitäten

Um anhand der In-vivo-Ergebnisse eine Einschätzung der entlang der Wirbelsäule wirkenden Kräfte zu erhalten, wie für Schaf 1 bereits im ersten Teil der In-vivo-/ Ex-vivo-Untersuchungen zur Ermittlung der axialen Kompressionslasten für die In-vitro-Tests durchgeführt, wurden im Folgenden darüber hinaus die Druck-/ Kraft-Korrelationen für Schaf 2 und Schaf 3 erstellt.

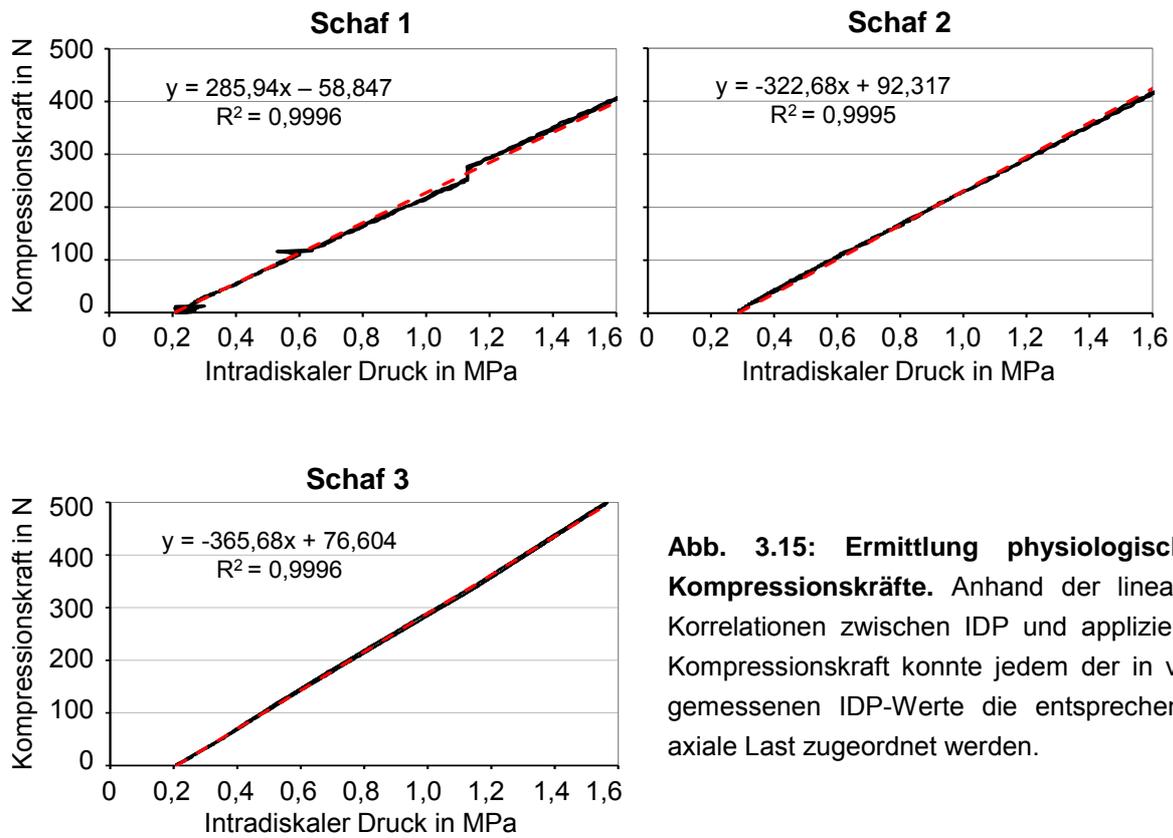


Abb. 3.15: Ermittlung physiologischer Kompressionskräfte. Anhand der linearen Korrelationen zwischen IDP und applizierter Kompressionskraft konnte jedem der in vivo gemessenen IDP-Werte die entsprechende axiale Last zugeordnet werden.

Anhand der ermittelten Regressionsgleichungen der drei Schafe (Abb. 3.15) wurden den IDP-Werten aus Abb. 3.13 die den unterschiedlichen Aktivitäten der Tiere entsprechenden axialen Kompressionswerte zugeordnet. Für die statischen Phasen ergaben sich hierbei für Liegen-intraoperativ 83 N, Liegen-postoperativ 184 N, Schlafen 82 N und entspanntes Stehen 196 N. Für die dynamischen Aktivitäten wurden für Hinlegen 604 N, für Aufstehen >999.99 N, für Drehen 656 N und für Laufen 520 N ermittelt (Abb. 3.16).

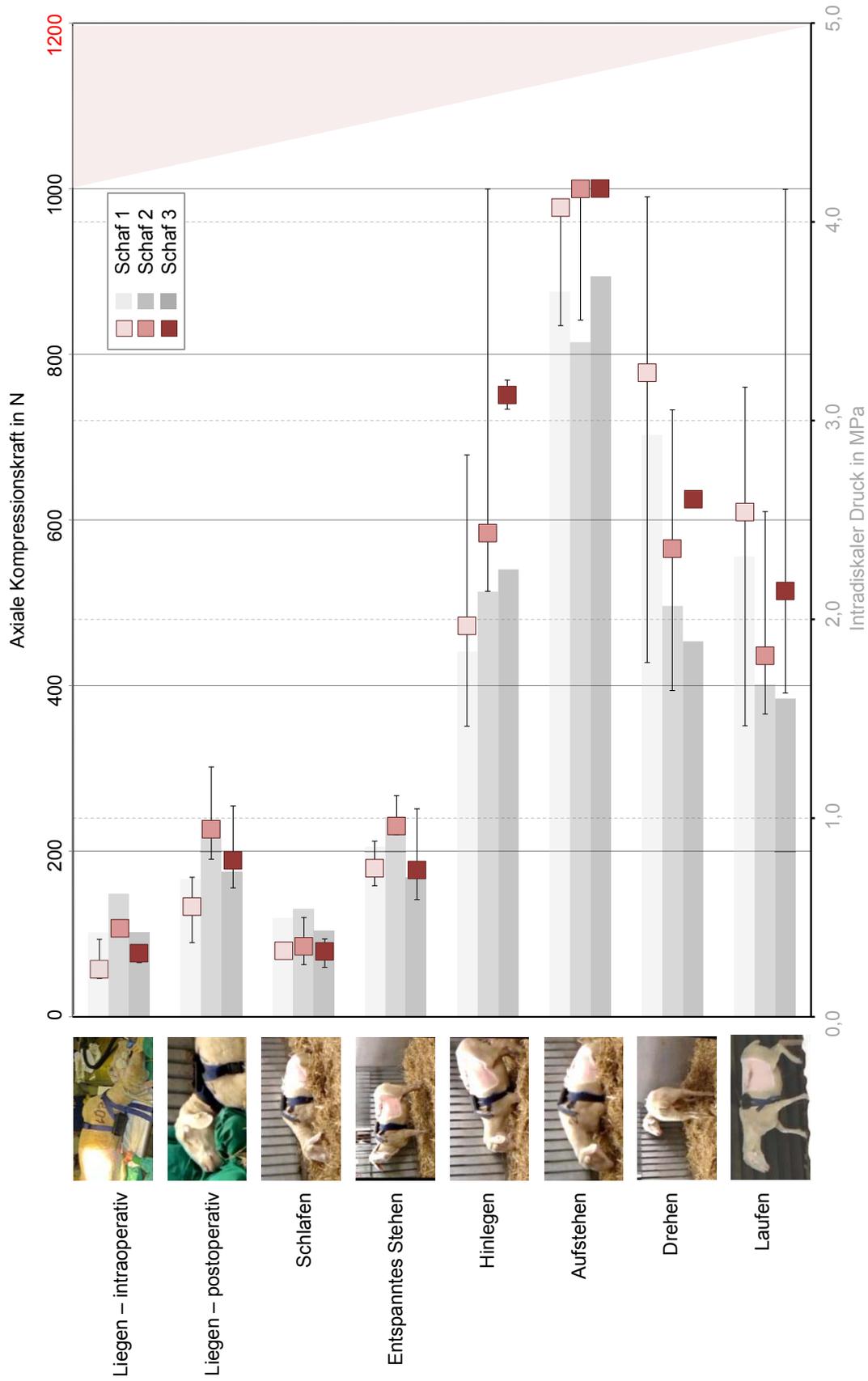


Abb. 3.16: Ex vivo abgeleitete Kompressionskräfte. Anhand der ex vivo ermittelten linearen Druck- / Kraft- Regressionsgeraden wurden den in vivo gemessenen IDP-Werten (Median transparent hinterlegt) die dafür notwendigen axialen Kräfte zugeordnet. Dargestellt sind der Median und die Ranges der axial applizierten Kompressionskräfte der drei Schafe während unterschiedlicher Aktivitäten.

4 Diskussion

Rückenschmerzen stellen ein großes gesundheitliches und volkswirtschaftliches Problem dar. Gerade degenerative Veränderungen der Bandscheibe treten in diesem Zusammenhang zunehmend in den Fokus wissenschaftlicher Bemühungen um neuartige Therapiestrategien, die eine schnelle Genesung des Patienten und einen langfristigen Behandlungserfolg gewährleisten sollen. Die vorliegende Doktorarbeit verfolgte daher das Ziel, neuartige Hydrogele für TE-Strategien an der Bandscheibe auf ihre Eignung zu untersuchen, die Biomechanik der Bandscheibe unmittelbar nach Nukleotomie wiederherzustellen. Da der klinische Einsatz neuer Therapiestrategien von einer erfolgreichen Applikation des Biomaterials im Tiermodell abhängt, wurde ein biomechanisches Lastprotokoll entwickelt, das zum einen unter Berücksichtigung der Physiologie des Tieres eine angemessene In-vitro-Testung der Hydrogele im Modell gewährleisten und zum zweiten Einblicke darin ermöglichen sollte, ob das Schaf als angemessener Repräsentant des Menschen im Rahmen der präklinischen Implantat-Testung für regenerative Konzepte an der Bandscheibe dienen kann. Allein eine vergleichbare Biomechanik zwischen Mensch und Tier ermöglicht es, die aus dem Modell erlangten Ergebnisse auf den Menschen übertragen zu können.

4.1 In-vivo-Untersuchungen

4.1.1 Tiermodelle in der präklinischen Forschung

Ohne Tierversuche wäre ein Fortschritt in der biologischen und medizinischen Grundlagenforschung undenkbar. Dennoch stellen Tierversuche in der Öffentlichkeit ein äußerst kontrovers diskutiertes Thema dar. Trotz des tierschutzrechtlichen 3R-Prinzips (Reduction, Replacement, Refinement) ist in den letzten Jahren ein enormer Anstieg der Zahl der Tierversuche zu verzeichnen (Quelle: BMELV, Versuchstierzahlen 2010). Obwohl mittlerweile Zellkulturexperimente eine Vielfalt an Möglichkeiten bieten, zelluläre Mechanismen detailliert zu untersuchen, ist es bislang ausschließlich durch Tierexperimente möglich, komplexe physiologische und biomechanische Zusammenhänge zu analysieren. Dabei fließen eine Vielzahl an

Faktoren in die Wahl des adäquaten Tiermodells für eine konkrete wissenschaftliche Fragestellung ein, wie z.B. ethische Fragestellungen beim Einsatz von nicht-humanen Primaten, das Alter, Geschlecht oder das Handling der Tiere, deren Stressanfälligkeit, Prädispositionen für gewisse Erkrankungen etc. (Roach et al., 1989; Schimandle and Boden, 1994). Ein wesentlicher Vorteil von Tierversuchen am Kleintier gegenüber klinischen Studien am Menschen kann darin gesehen werden, dass gerade durch die Verwendung von Inzuchtlinien interindividuelle Unterschiede, wie sie beim Menschen vielfach zu verzeichnen sind, beim Tier deutlich seltener sind und so innerhalb einer Rasse beim Tier auf eine deutlich größere Vergleichbarkeit und Homogenität zwischen den einzelnen Tieren zurückgegriffen werden kann (Festing, 2004). Hierdurch lässt sich in den Ergebnissen eine gleichförmigere Datenverteilung erwarten, die wissenschaftlich relevante Effekte vermeintlich eher zu Tage treten lassen als in klinischen Studien beim Menschen. Für viele wissenschaftliche Fragestellungen stehen allerdings genetisch modifizierte Tierstämme nicht zur Verfügung, sodass es auch hier den Einfluss interindividueller Unterschiede zu berücksichtigen gilt, der allerdings im Vergleich zum Menschen als geringer einzuschätzen ist.

Viele Kleintiere wie Maus, Ratte oder Kaninchen werden in unterschiedlichen Indikationen als Tiermodelle, auch im Bereich der Wirbelsäule, verwendet (Elliott and Sarver, 2004; Kroeber et al., 2002; Michalek et al., 2010). Allein die Größe der Tiere macht diese zu beliebten Versuchstieren, da sich die Unterbringung und das Handling deutlich einfacher gestalten als beim Großtier. Im Vergleich zum Menschen bleiben die notochordalen Zellen in den Bandscheiben dieser Tierarten zeitlebens erhalten (Hunter et al., 2004). Das damit einhergehende ausgeprägte Regenerationspotential der Bandscheiben dieser Tiere macht deren Einsatz im Bereich biologischer Therapiestrategien an der Bandscheibe daher allerdings äußerst kritisch (Alini et al., 2008). Gerade zur Erprobung regenerativer (zellbasierter) Therapiestrategien ist die biologische Vergleichbarkeit zwischen Mensch und orthotopem Modell jedoch essentiell, sodass sich allein auf zellulärer Ebene daher Großtiere wie das Rind oder das Schaf als deutlich bessere Repräsentanten des Menschen erwiesen (Hunter et al., 2004).

Darüber hinaus eignen sich Großtiermodelle aufgrund ihrer Körpergröße häufig besser zur Beurteilung der Machbarkeit und Praktikabilität chirurgischer

Interventionen als Kleintiere. Unterschiedliche Studien beschäftigen sich daher seit langem mit der Frage, welche Tierart allein in anatomischer Hinsicht die Wirbelsäule respektive die Bandscheibe des Menschen am besten reflektiert (Busscher et al., 2010; O'Connell et al., 2007; Sheng et al., 2010; Wilke et al., 1997b, Abb. 4.1). Dabei stellten sich bei allen Tierarten mehr oder weniger deutliche Übereinstimmungen in den untersuchten Parameter zum Menschen heraus (z.B. Wirbelkörpermaße, Facettengelenksstellung, Bandscheibenquerschnittsfläche usw.), die z.T. auch abhängig von der untersuchten Wirbelsäulenregion waren. Da durch kein Tiermodell eine absolute anatomische Vergleichbarkeit zum Menschen gewährleistet werden kann, hängt somit die Wahl der Tierart in erster Linie von der wissenschaftlichen Fragestellung ab, die mit dem Modell beantwortet werden soll.

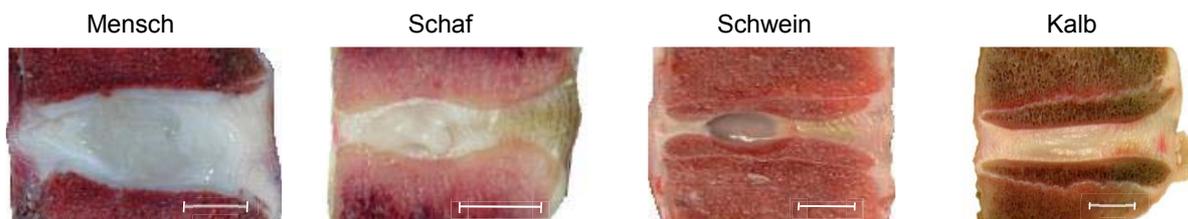


Abb. 4.1: Sagittalschnitte der Bandscheiben von Mensch, Schaf, Schwein und Kalb. Deutlich erkennbar sind Unterschiede in der Größe und dem morphologischen Erscheinungsbild der Bandscheiben des Menschen und verschiedener gängiger Großtiermodelle im Bereich der experimentellen Wirbelsäulenforschung (Maßstabskala 10 mm).

4.1.2 Das Schaf als Tiermodell für regenerative Strategien an der Bandscheibe

Speziell für die Analyse regenerativer Therapiestrategien wird aufgrund der Analogie der zellulären und biochemischen Zusammensetzung zwischen der ovinen und humanen Bandscheibe zunehmend auf das Schaf zurückgegriffen (Beckstein et al., 2008; Hunter et al., 2004; Wei et al., 2009; Woiciechowsky et al., 2012). Wie der Mensch so verliert auch das Schaf die notochordalen Zellen der Bandscheibe, deren Verlust als potentieller Beitrag für die Entstehung von degenerativen Veränderungen an der Bandscheibe gesehen wird, da ein effektiver Matrix-turnover und der nachweislich anabole Effekt der notochordalen Zellen auf die Zellen des Nucleus pulposus zunehmend entfällt (Cappello et al., 2006; Erwin et al., 2011; Korecki et al.,

2010). Aufgrund der vergleichbaren zellulären Zusammensetzung der Bandscheiben von Schaf und Mensch wird daher davon ausgegangen, dass das Schaf idealerweise die Bedingungen des Menschen reflektiert und auf ähnliche Regenerationskapazitäten im Rahmen regenerativer Therapiestrategien geschlossen werden kann.

Beim Schaf wird gegenwärtig davon ausgegangen, dass die notochordalen Zellen spätestens bis zu einem Alter von etwa vier Jahren verlorengehen (Hunter et al., 2004). Zur Ermittlung der intradiskalen Drücke im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen wurden Schafe im Alter von drei bis fünf Jahren verwendet. Neben dem reduzierten Narkoserisiko beim Einsatz jüngerer Tiere ist in diesem Alter darüber hinaus nicht mit degenerativen Veränderungen an der Bandscheibe zu rechnen. Diese konnten laut einer Studie von Melrose et al. erst ab einem Lebensalter von über 6 - 8 Jahren beobachtet werden (Melrose et al., 2009). Die Wahl der oben angeführten Tieraltersgruppe ermöglichte somit, messtechnisch relevante Einflüsse bedingt durch degenerative Veränderungen der Bandscheiben und somit unvorhersehbare Störfaktoren auf die Messergebnisse des Tierversuches in ihrem Ausmaß zu minimieren.

Da das Schaf in diversen muskuloskeletalen Organsystemen zu einem populären Tiermodell geworden ist (Martini et al., 2001) und die Zukunft therapeutischer Konzepte auch im Bereich der Bandscheibe in Richtung biologisch-regenerativer Strategien geht, ist es essentiell, die Eignung des Schafes als Tiermodell für regenerative Behandlungsstrategien an der Bandscheibe zu untersuchen und die Mechanik der Bandscheibe des Schafes genauer zu charakterisieren. Neben ausführlichen In-vitro-Untersuchungen, die eine gute Vergleichbarkeit des Schafes und des Menschen in biomechanischer, anatomischer, biochemischer und zellulärer Sicht bescheinigen (Beckstein et al., 2008; Hunter et al., 2004; Kettler et al., 2007; Reid et al., 2002; Wilke et al., 1997a; Wilke et al., 1997b), liegen bislang allerdings keine Daten vor, die die Tauglichkeit des Schafes als Modell für regenerative Therapiestrategien in vivo belegen.

4.1.3 Die Bedeutung der Mechanik für die Zelldifferenzierung

Wie diverse In-vitro-Untersuchungen zeigten, sind die Zelldichte, die Lebensfähigkeit und die Genexpression von Bandscheibenzellen von einer ausreichenden mechanischen Stimulation abhängig. Unterbelastungen führen zu einer teils signifikant reduzierten Zelldichte, kürzerer Lebensdauer und eingeschränkter Genexpression der Zellen (Paul et al., 2012), während Über- bzw. Fehlbelastungen zur Aktivierung eines katabolen Genexpressionsprofils führen (Matsumoto et al., 1999; Neidlinger-Wilke et al., 2006; Walter et al., 2011; Wuertz et al., 2007) und damit zu degenerativen Veränderungen, Gewebsabbau und Zelltod beitragen können. Ebenso verweisen Studien darauf, dass für eine effektive, organspezifische Differenzierung diverser für Regenerationsstrategien relevanter Vorläuferzellen, wie z.B. Knochenmarksstammzellen, eine mechanische Stimulation innerhalb physiologischer Grenzen notwendig ist (Chan et al., 2011; Potier et al., 2010). An der Bandscheibe könnten hierfür fluidbasierte Scherspannungen ausschlaggebend sein, die einen Beitrag zur Differenzierung der Zellen des Nucleus pulposus zu leisten scheinen und somit eine wesentliche Rolle in der Mikromechanik der Bandscheibe spielen könnten (Wang et al., 2011a). Um aus den Ergebnissen eines Tiermodells daher valide Rückschlüsse auf den Menschen ziehen zu können, ist es unabdingbar, die mechanischen Gegebenheiten näher zu charakterisieren, die einen wesentlichen Einfluss auf zellbasierte Behandlungsansätze nehmen. Die Stimulation implantierter Biomaterialien muss vergleichbaren mechanischen Regelmechanismen zwischen Mensch und Tier unterliegen, um Resultate aus dem Tiermodell schlüssig und folgerichtig auf den Menschen übertragen zu können. Grundlegende Unterschiede zwischen Tiermodell und Mensch müssten konsequent zum Ausschluss des Modells führen.

4.1.4 In-vivo-Ergebnisse

Durch die limitierte Tierzahl von nur drei Schafen erheben die Ergebnisse der In-vivo-Untersuchungen im Vergleich zur Literatur der Bandscheibendruckmessungen beim Menschen keine statistische Aussagekraft, sondern verstehen sich ausschließlich

deskriptiver Natur und als Vorversuch für die anschließenden In-vitro-Untersuchungen zum Nukleusersatz im Schafmodell.

Wie die vorliegenden Ergebnisse zeigen konnten, ist die Bandscheibe des Schafes während unterschiedlicher Aktivitäten nahezu durchwegs höher belastet als die Bandscheibe des Menschen (Abb. 4.2). Außer für Stehen erwiesen sich die statischen Aktivitäten des Schafes als bis zu viermal so hoch als beim Menschen. So liegt beispielsweise der IDP beim Menschen nachts bei etwa 0,1 MPa (Wilke et al., 1999). Der vergleichbare Wert des Schafes lag im Mittel der drei Versuchstiere bei ca. 0,4 MPa. Beim stehenden Schaf hingegen waren die Werte in einem vergleichbaren Bereich. Besonders deutlich waren die Unterschiede bei den dynamischen Aktivitäten des Schafes, wie Aufstehen, Hinlegen oder Laufen. Hier lagen die Werte in der Größenordnung des zwei – vierfachen der Werte, die beim Menschen in vivo gemessen wurden (Nachemson and Elfstrom, 1970; Wilke et al., 1999). Ein möglicher Grund für die hohen Druckspitzen in der ovinen Bandscheibe könnte der deutlich erhöhte Kollagenfasergehalt der ovinen Bandscheibe im Vergleich zum Menschen (Reid et al., 2002) und eine damit unter Umständen verbundene höhere Vorspannung des kollagenen Fasernetzwerkes innerhalb der Bandscheibe sein.

Die mit den dynamischen Aktivitäten verbundenen Unterschiede in der Bandscheibenbelastung zwischen Mensch und Schaf stellen zeitlich sehr eng begrenzte Momentaufnahmen im Tagesgeschehen dar und erwiesen sich als deutlich voneinander abweichend. Stellt man jedoch die durchschnittlich über den gesamten Tagesverlauf ermittelten Bandscheibendrucke von Mensch und Schaf einander gegenüber, so differierten die Belastungen zwischen beiden Spezies nur äußerst geringfügig (Schmidt and Reitmaier, in press, Abb. 4.3). Die alltägliche Bandscheibenbelastung über den Tag hinweg scheint demnach in guter Übereinstimmung zwischen Schaf und Mensch zu liegen, was die Eignung des Schafes als Tiermodell für regenerative Strategien an der Bandscheibe grundlegend stützt. Dennoch legen die gravierenden Unterschiede in der (kurzzeitigen) mechanischen Antwort der Bandscheibe den Schluss nahe, dass die Wirbelsäule des Quadrupeden in toto auf einen unterschiedlichen Belastungsmodus ausgelegt zu sein scheint als die des Bipeden. Dies legen auch diverse strukturell-anatomische

Charakteristika des Achsenskelettes des Vierbeiners nahe, die vermeintlich aus dem unterschiedlichen Gangbild resultieren.

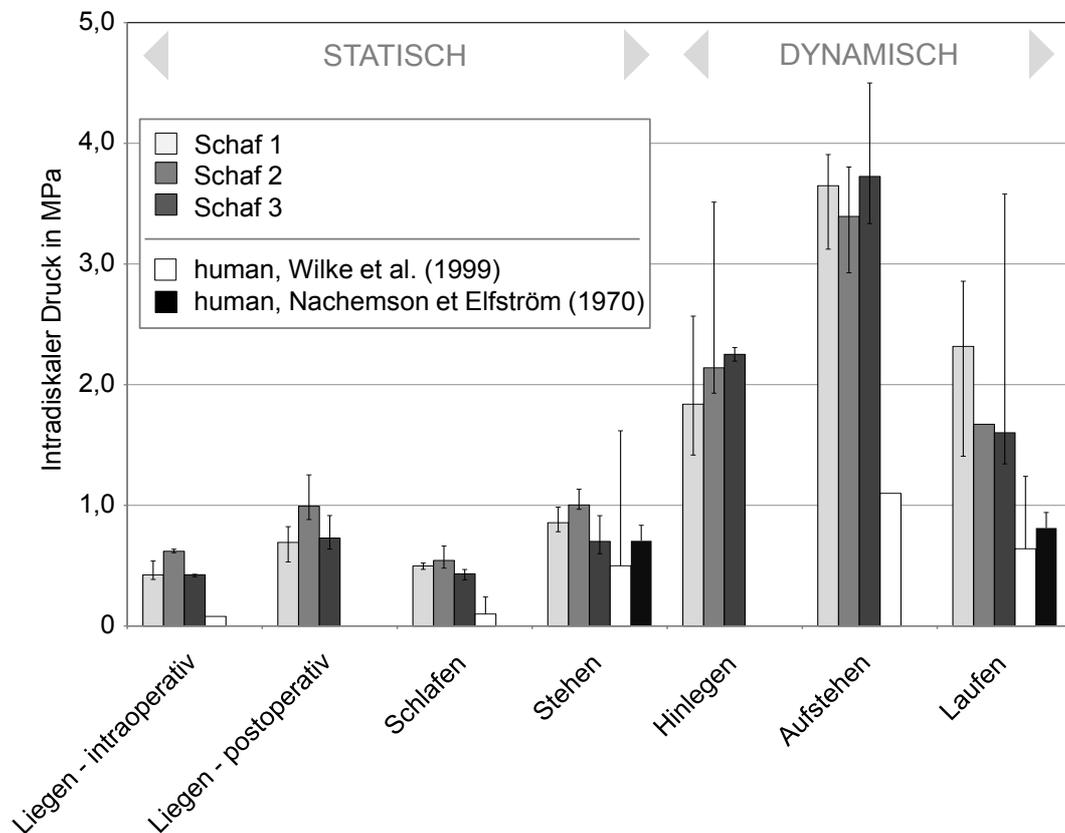


Abb. 4.2: Intradiskale Drücke in vivo beim Schaf (L2-L3) und beim Menschen (L4-L5). Im Vergleich zu humanen Messungen von Wilke et al. (1999) und Nachemson und Elfström (1970) liegen die intradiskalen Drücke des Schafes durchwegs höher.

Der Thorax und das Abdomen des Vierbeiners leiten aufgrund der Schwerkraft ein großes Biegemoment auf die thorakolumbale Wirbelsäule ein. In vollem Umfang würde dieses Moment zu einer lordotischen Durchbiegung der Wirbelsäule führen, die etwa um den Faktor vier größer wäre als es der maximal ermittelte Grad natürlicher Flexion und Extension zulassen würde (Smit, 2002; Wilke et al., 1997a). Die Wirbelsäule des Vierbeiners weist jedoch keine (wenn auch rein theoretisch herzuleitende) Lordose auf. Vielmehr spannt die thorakolumbale Wirbelsäule in der Umkehr des zu Erwartenden einen kyphotischen Bogen (Abb. 4.4 a). Folgerichtig muss es also durch die Kontraktionskraft der Muskulatur zu einer Umwandlung der aus der Biegebelastung resultierenden Zugspannung in eine axiale Kompressionsspannung kommen, welche damit in vergleichbaren Verhältnissen

resultiert wie sie durch die aufrechte Wirbelsäulenposition beim Menschen a priori gegeben ist. Vergleichbar einer Hängebrücke (Abb. 4.4 b) zwischen ihren Stützpfeilern scheint die thorakolumbale Wirbelsäule des Schafes demnach zwischen den Vorder- und Hintergliedmaßen durch passive Haltemechanismen in sich verspannt zu sein. Um biegungsbedingte Zugspannungen an Wirbelkörpern und Bandscheiben abzuwenden, wird durch diese muskuläre Verspannung der Wirbelsäule in der Folge physiologischerweise sogar eine höhere effektive Druckspannung an den Wirbelkörpern und der Bandscheibe in Kauf genommen. Hinweisend für diese Hypothese sind die im Vergleich zum Menschen überaus langen und kräftig ausgeprägten knöchernen Wirbelfortsätze, wie beispielsweise die Dorn- und Querfortsätze der Brustwirbelsäule des Schafes (Wilke et al., 1997b), an denen, wie die Trageile an einer Hängebrücke, die (autochtone) Rückenmuskulatur und eine Vielzahl von passiv die Wirbelsäule verspannenden Bändern ansetzen. Die teils hohen intradiskalen Druckbelastungen beim Schaf stehen demnach der weitverbreiteten Meinung gegenüber, dass die Belastungen an der Wirbelsäule des Vierbeiners, bedingt durch ihre horizontale Ausrichtung, deutlich geringer sein müssten als dies beim aufrecht stehenden Menschen der Fall ist und somit aufgrund einer Unterbeanspruchung spinaler Strukturen der Vierbeiner kein adäquates Modell für den Menschen darstellen könne. So gehen auch theoretische Berechnungen von einer höheren Belastung an der Wirbelsäule des Vierbeiners aus, die vermeintlich aus einer Umwandlung der Belastungsrichtung entlang der Wirbelsäule resultiert (Smit, 2002).

Gestützt wird die These eines gleichgerichteten, axialen Kraftflusses entlang der Wirbelsäule des Vierbeiners im Vergleich zum Menschen des Weiteren durch deren hohen Knochenmineralgehalt und die Ausrichtung der Knochen trabekel der Wirbelkörper. Von beiden Parametern ist bekannt (Wolffs law), dass sie nachweislich mit dem Betrag der Last als auch der Wirkrichtung des Kraftflusses korrelieren. Eine etwa vierfach höhere Knochendichte der Wirbelsäule des Vierbeiners legt eine vergleichsweise hohe mechanische Belastung des Wirbelkörpers nahe, die kраниокаудale Trabekelorientierung hingegen die axiale Richtung des Kraftflusses entlang der Wirbelsäule (Smit, 2002, Abb. 4.5). Trotz ähnlicher durchschnittlicher Tagesbelastungen scheint demnach die höhere Knochendichte des ovinen

Wirbelkörpers das Resultat der unterschiedlichen im Tagesverlauf auf die Wirbelkörper wirkenden Druckspitzen zu sein.

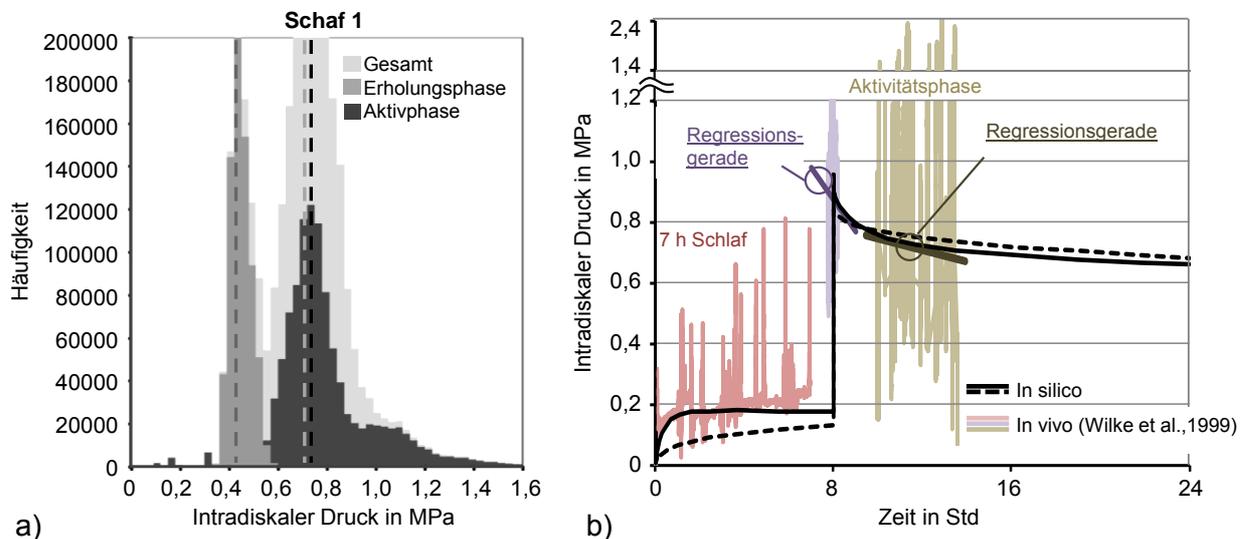


Abb. 4.3: Vergleich der In-vivo-Belastungen der Bandscheiben von Schaf und Mensch. a) Die durchschnittliche Belastung des Schafes (dargestellt repräsentativ für Schaf 1) während Aktivphasen liegt mit ca. 0,75 MPa in derselben Größenordnung wie die beim Menschen im Tagesverlauf gemessenen und berechneten Werte (b, Schmidt and Reitmaier, 2013).

Die einzige bislang durchgeführte Studie, die den IDP während unterschiedlicher Aktivitäten eines Vierbeiners ermittelte, wurde im Jahr 2009 von Buttermann et al. veröffentlicht. Diese Untersuchungen am ausgewachsenen Zwergring ergaben gerade für relativ wenig stör anfällige und fehlerbehaftete Messgrößen wie beispielsweise das entspannte Stehen im Vergleich zur vorliegenden Untersuchung am Schaf vergleichbare Werte von ca. 0,80 +/- 0,24 MPa (Buttermann et al., 2009). Die relativ hohen Standardabweichungen der vorliegenden IDP-Messungen v.a. im Bereich der dynamischen Aktivitäten der Tiere sind vermutlich auf die teilweise äußerst unterschiedlich ablaufenden Bewegungsmuster der Tiere zurückzuführen. Eine Wiederholung stetig gleichförmiger Bewegungsabläufe kann beim Tier nicht gewährleistet werden. Obwohl wie im Falle des Aufstehens oder Hinlegens der grundlegende Ablauf der Bewegung derselbe ist, kann eine Vielzahl unterschiedlichster Faktoren Einfluss auf das Messergebnis nehmen. Allein die Ausgangsposition des Tieres ist z.B. u.U. entscheidend dafür, welcher IDP in der Bandscheibe erreicht wird. Aufstehen aus rechtsseitiger Liegeposition mit deutlich lateral geneigter Wirbelsäule kann beispielsweise durch einen unterschiedlichen

Kraftaufwand beim Aufstehen deutlich höhere Druckspitzen im Zuge des Aufstehens bewirken als Aufstehen aus gerader Liegeposition.

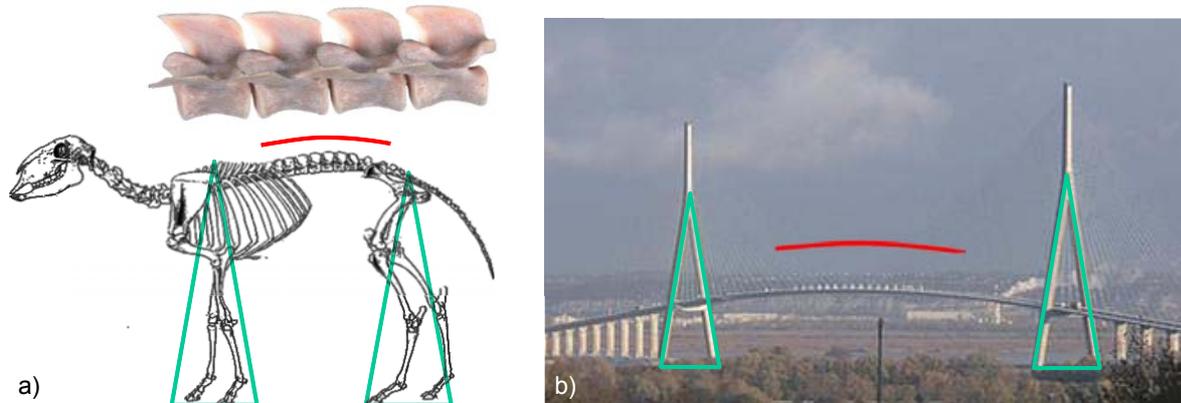


Abb. 4.4: Wirbelsäule des Vierbeiners. Die Aufhängung der horizontalen Wirbelsäule des Vierbeiners (a) in einem kyphotischen Bogen (rot) zwischen den Vorder- und Hintergliedmaßen (grün) weist Ähnlichkeiten zur statischen Konstruktion einer Brücke (b) auf, bei der der Brückenbogen (rot) zwischen den Tragpfeilern (grün) verspannt ist. Die langen Dornfortsätze der Wirbelkörper des Vierbeiners (Bild oben) bieten dabei vergleichbar den Tragseilen der Brücke einer Vielzahl an stabilisierenden Band- / Sehnen- und Muskelsträngen Ansatz (modifiziert nach a) Nickel et al., 1997 und b) <http://farm5.static.flickr.com>).

Beim Menschen folgt der intradiskale Druck einem tageszeitabhängigen Verlauf. Morgens nach dem Aufstehen ist der Druck während unterschiedlicher Aktivitäten demnach am höchsten, während er abends deutlich niedrigere Werte aufweist (Wilke et al., 1999). Der grundlegende Funktionsmechanismus der Bandscheibe aus intradiskalem Druckverlust während Aktivitätsphasen sowie intradiskalem Druckanstieg während Erholungsphasen erwies sich somit in Anbetracht der Ergebnisse der vorliegenden In-vivo-Untersuchungen als vergleichbar zwischen Mensch und Schaf.

Die Bestimmung der Erholungs- und Aktivitätslasten der ovinen Bandscheibe basieren auf der Einteilung der über 24 Stunden erlangten intradiskalen Druckwerte. Da das Schaf nicht strikt einem dem Menschen entsprechenden Tag-/ Nachtrhythmus folgt, konnte diese Einteilung nicht über die Tageszeit wie beim Menschen, d.h. Aktivitätswerte tagsüber vs. Erholungswerte nachts, erfolgen. Um dennoch eine größtmögliche Vergleichbarkeit der Daten sicherzustellen, wurden daher die Zeiträume als Erholungsphase zusammengefasst, in denen das Schaf ruhend auf dem Boden lag, selbst wenn diese tagsüber und verteilt und nicht nachts

und kontinuierlich auftraten wie beim Menschen. Als Aktivitätsphase dienten die Werte, die dem stehenden Schaf entsprachen. In Analogie zum Vorgehen bezüglich der Erholungsphase wurden für die Ermittlung der Aktivitätslast der ovinen Bandscheibe ebenfalls tageszeitunabhängig nicht ausschließlich die Werte tagsüber, sondern auch die nächtlichen Werte des stehenden Schafes zugrundegelegt. Durch diese Einteilung wurde ein Höchstmaß an Vergleichbarkeit angestrebt, das zwischen Mensch und Tier erreichbar ist. Dabei war es nicht in erster Linie wichtig, die Tageszeit des Geschehens in Übereinstimmung zu bringen, sondern vielmehr eine Vergleichbarkeit der Aktivität und des Belastungsstatus‘ zwischen Mensch und Tier zu gewährleisten, die einen wesentlichen Einfluss auf die Druckentstehung in der Bandscheibe nehmen.

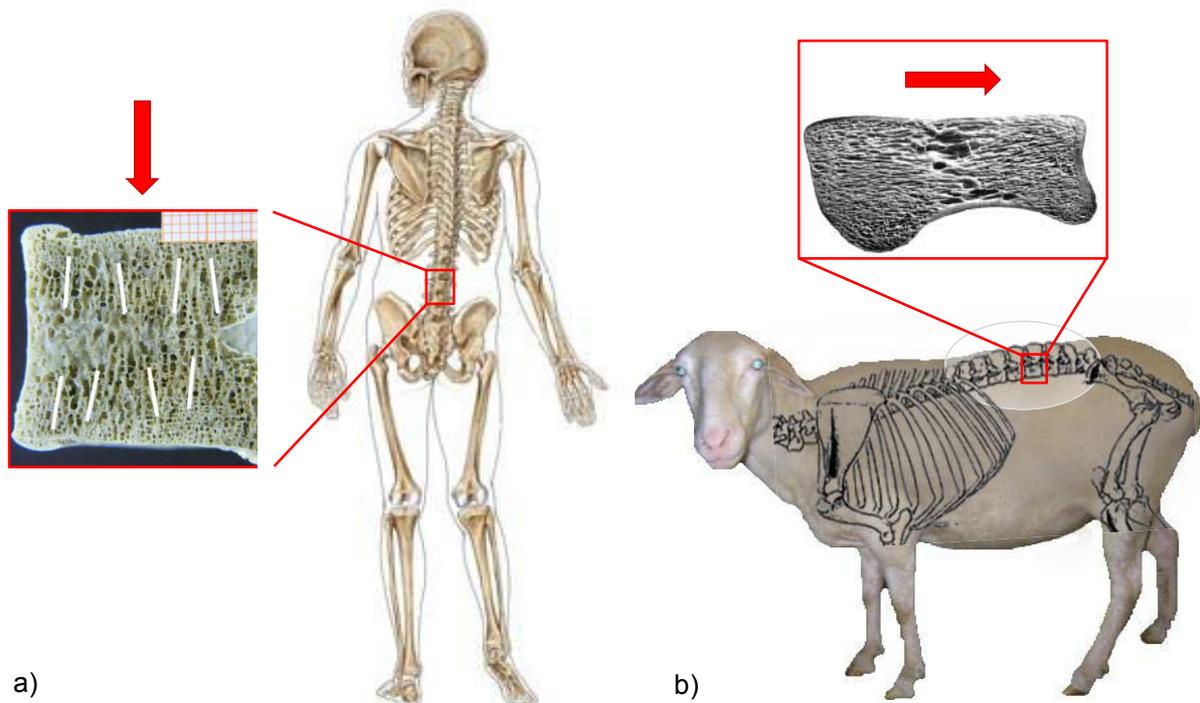


Abb. 4.5: Gangbild Mensch / Vierbeiner. Der aufrechte Gang des Menschen (a, aus www.fairmed.at) und der dadurch resultierende axiale Belastungsmodus (Pfeil) der humanen Wirbelsäule spiegelt sich in der Ausrichtung der Trabekel des Wirbelkörpers von kranial nach kaudal (weiße Linien im Wirbelkörper, Quelle: UFB) wieder. Vergleichbar der Situation an der humanen Wirbelsäule liefert die gleichgerichtete (kraniokaudale) Trabelorientierung der Wirbelkörper des Tieres Hinweise auf einen ebenfalls axialen Kraftfluss entlang der Wirbelsäule des Vierbeiners (b, Schafsskelett aus Nickel et al., 1997; Wirbelkörper des Vierbeiners aus Smit, 2002). Unterschiede in der Knochendichte der beiden Wirbelkörper lassen eine erhöhte mechanische Belastung der Vierbeinerwirbelsäule vermuten.

Als mögliche Limitation dieser Vorgehensweise ist die fehlende Kontinuität der Daten der beiden Phasen beim Schaf zu sehen. Die Entwicklung des IDP über den Tag

hinweg folgt in Anbetracht der vorliegenden Ergebnisse beim Schaf und aus der Kenntnis der Daten beim Menschen einem zeitabhängigen Verlauf (Wilke et al., 1999). Durch die Unterbrechungen der Erholungsphasen beim Schaf ist davon auszugehen, dass ein möglicherweise höherer IDP in der ovinen Bandscheibe nicht in dem Maße zum Ausdruck kam, wie er durch eine anhaltende und kontinuierliche Erholungsphase zu verzeichnen gewesen wäre. Unterbrechungen einer Erholungsphase des Tieres, selbst durch relativ kurz andauernde Aktivitätsphasen, könnten somit mit einer Erniedrigung des Ausgangs-IDP der anschließenden Erholungsphase einhergegangen sein, d.h. mit einer tendenziell niedrigeren Einschätzung des IDP-Erholungswertes und im Umkehrschluss einer höheren Beurteilung des IDP-Aktivitätswerts.

In Anlehnung an die Studien von Wilke et al. (1999) wurden in der vorliegenden Arbeit zur Messung des intradiskalen Druckes beim Schaf piezoresistive Sensoren mit 1,45 mm Durchmesser verwendet. Diese Größe ist im Verhältnis zur mittleren Bandscheibenhöhe des Schafes mit ca. 3,0 - 3,5 mm vergleichsweise hoch. In Volumenprozent ausgedrückt, bemisst der starre Sensorkopf damit rund 2% des ovinen Nukleus. Da die Bandscheibe jedoch ein verformbares Gebilde darstellt, ist nicht davon auszugehen, dass es durch eine Volumenverdrängung gleichen Betrages gegen eine starre äußere Begrenzung zu einem vergleichsweise hohen Anstieg des Bandscheibeninnendruckes durch den Sensor gekommen ist. Die Platzierung der Sonde im Bandscheibenzentrum des Schafes kann aber zu einem gegenwärtig nicht näher quantifizierbaren IDP-Anstieg in der ovinen Bandscheibe beigetragen haben, der für weitere Studien nur durch den Einsatz deutlich kleinerer Sensoren in seinem Betrag abzuschätzen ist. In die Ergebnisse der vorliegenden Studie zur IDP-Messung am Schaf kann daher ein messtechnisch bedingter Faktor eingeflossen sein, der einen potentiellen Volumeneffekt zwischen Sensor und Bandscheibe reflektiert, der für die Schlussfolgerungen der anschließenden Untersuchungen zum Nukleusersatz allerdings unter Beibehaltung der Messtechnik als nicht wesentlich erachtet wird. Um die Ergebnisse zukünftiger IDP-Messungen am Schaf jedoch in weiteren Studien an erhöhter Tierzahl statistisch verwertbar zu machen, z.B. im Vergleich zu Humanwerten, bedarf es der Überprüfung des Ausmaßes dieses Effektes.

4.2 Ex-vivo-Untersuchungen

Für präklinische Studien ist es essentiell, das möglichst genaue Ausmaß der zukünftigen Belastung zu kennen, dem sich ein Implantat gleich welcher Form in vivo ausgesetzt sieht. Unterbelastungen von Implantaten im Rahmen der präklinischen Erprobung beispielsweise könnten zu weitreichenden Konsequenzen bezüglich des risikofreien Einsatzes der Therapiestrategie am Patienten führen, während aufgrund von Überbelastungen gegebenenfalls neue Behandlungsstrategien verworfen werden, die grundlegend innovativ und als Therapieansatz erfolgversprechend sein könnten. Ein nicht adäquater Belastungsmodus eines jeden Implantates während der Forschung und Entwicklung kann daher ausschlaggebend sein für eine Fehleinschätzung der möglichen späteren Implantateffektivität in vivo beim Patienten und das v.a. dann, wenn die Beurteilung des Erfolges einer neuartigen Therapie die Untersuchung in einem repräsentativen Modell des Menschen, d.h. im Tiermodell, beinhaltet. Es ist daher essentiell, die Belastungen zu kennen, die sowohl in vivo im Tiermodell stellvertretend für den Menschen auf das Implantat wirken, als auch derer, die im Rahmen von In-vitro-Tests an tierischen Präparaten auf das Bandscheibenfach eingeleitet werden müssen, um eine angemessene, das heißt möglichst physiologische Testung zu gewährleisten.

4.2.1 Axialer Belastungsmodus der Wirbelsäule

Die Kompressionskräfte, die in vivo für die Entstehung des IDP sorgen, resultieren aus teils komplexen Bewegungsmustern. Trotz der Dateneinteilung in gleichartige Körperpositionen während der Aktivitäts- und Erholungsphasen ist davon auszugehen, dass die gemessenen intradiskalen Druckwerte das Resultat kombinierter Lasten an der Wirbelsäule darstellen. Obwohl Tiere entwicklungsgeschichtlich, was deren vierbeiniges Gangbild angeht, niedriger entwickelt sind als der Mensch, ist davon auszugehen, dass bei beiden die Wirbelsäule vornehmlich auf einen axialen Belastungsmodus ausgelegt ist. Im Alltag stellen Flexion, Extension, Seitneigung oder Rotation des Rumpfes untergeordnete Bewegungsmuster der Wirbelsäule im Vergleich zur axialen Kompression dar, die allein bereits durch die schwerkraftsbedingte Einwirkung des oberen Körpergewichts

beim Menschen gegeben ist. Einen Hinweis dafür, dass die Wirbelsäule in erster Linie auf axiale Belastung ausgerichtet ist, gibt das sogenannte Flexion-Relaxation-Phänomen. Mechanorezeptoren der Bänder an der Wirbelsäule regulieren in einem natürlichen Reflexbogen die Aktivität wirbelsäulenstabilisierender Muskelgruppen. Wie Studien belegen, resultieren bereits mehrminütig anhaltende Flexionsphasen großen Ausmaßes aufgrund viskoelastischer Bandverformungen in einer signifikanten Abnahme der Reflexaktivität der paraspinalen Muskulatur (Solomonow et al., 2003). Langanhaltende Dehnungen machen daher aufgrund der verminderten Kontraktionsantwort der Muskulatur die Wirbelsäule zeitweise instabil, anfälliger für Verletzungen und stellen somit vermeintlich eine nicht physiologische Lastsituation der Wirbelsäule dar.

Dass die Wirbelsäule mancher Vierbeiner, wie z.B. die des Schafes, unter Umständen mehr noch als die des Menschen auf eine axiale Belastungsrichtung ausgelegt ist, untermauern Untersuchungen der biochemischen Zusammensetzung der wirbelsäulenstabilisierenden Bänder (Ponseti, 1995). Vierbeiner wie das Schaf, die bekanntlich nur eine eingeschränkte Beweglichkeit der Wirbelsäule aufweisen, zeigen einen signifikant geringeren Elastinfasergehalt des Lig. flavum, während Tierarten wie die Katze und der Affe oder auch der Mensch, die alle über eine merklich flexiblere Wirbelsäule verfügen, einen deutlich höheren Anteil elastischer Fasern besitzen.

Obwohl weder beim Menschen noch beim Tier von einer rein axialen Belastung der Wirbelsäule in vivo während unterschiedlicher Bewegungsmuster ausgegangen werden kann, sind weder das Vorhandensein noch die Höhe von auftretenden Torsions- bzw. Scherspannungen innerhalb der Bandscheibe gegenwärtig genau zu quantifizieren. Im Rahmen der Ex-vivo-Versuche wurden zur Ermittlung der Kompressionskräfte für den In-vitro-Versuch ausschließlich axiale Lasten berücksichtigt. Die Ableitung der Kompressionskräfte, die den intradiskalen Druckwerten für Erholungs- und Aktivitätsphasen des Schafes entsprachen, erfolgte daher mittels eines rein axialen Kompressionstests. Selbst wenn die Kräfte, die in vivo zu den ermittelten Werten von ca. 0,75 MPa für Aktivität und 0,5 MPa für Erholung führten, durch kombinierte Bewegungen entstanden sind, erscheint es legitim, den Belastungsmodus für den anschließend geplanten In-vitro-Versuch

unberücksichtigt zu lassen, da es sich hierbei ebenfalls um einen rein axialen Kompressionstest handelte.

4.2.2 Ex-vivo-Ergebnisse

Wie die Analysen des vorliegenden Ex-vivo-Versuches vermuten lassen, resultieren die vergleichsweise hohen intradiskalen Druckwerte des Schafes in vivo aus relativ geringen axialen Kompressionskräften. So waren die während der Aktivitäts- und Erholungsphasen ermittelten Kräfte von 130 und 58 N beim Schaf deutlich geringer als die beim Menschen veranschlagten Werte von ca. 500 N für Stehen und 100 N für Liegen (Rohlmann et al., 2009; Wilke et al., 2003). Der Grund hierfür könnte in der deutlich geringeren Querschnittsfläche der Bandscheibe des Schafes gesehen werden. Beim Menschen liegt die durchschnittliche Bandscheibenquerschnittsfläche bei ca. 1380 mm², die des Schafes dahingegen bei etwa gut der Hälfte mit ca. 630 mm². Aus dem bekannten physikalischen Zusammenhang zwischen Druck, Kraft und Fläche von $\text{Druck (p)} = \text{Kraft (F)} / \text{Fläche (A)}$ ist somit bei einer signifikant reduzierten Fläche ein deutlich niedrigerer Kraftaufwand von Nöten, um einen Druckanstieg in der Bandscheibe zu bewirken. Für den Menschen konnten Nachemson et al. bereits 1960 ermitteln, dass Druck, Querschnittsfläche und Kraft an der Bandscheibe nicht einem direkt proportionalen Verhältnis folgt (Nachemson, 1960), sondern der Faktor 1,5 zur Ermittlung des Bandscheibendruckes in die Berechnung des humanen IDP einfließt ($p = 1,5 \times F / A$). Dies scheint der Tatsache geschuldet, dass die Bandscheibe kein homogenes Gebilde mit gleichförmiger Druckverteilung darstellt, welches spontanelastisch auf Kompressionslasten reagiert, sondern ein viskoelastisches Material, das eingeleitete Lasten auf eine organspezifische Art und Weise innerhalb ihrer Kompartimente verteilt und die Druckbelastung im Nukleus in eine Zugbelastung des Anulus transformiert. Auch beim Schaf fließt in die Berechnung des intradiskalen Druckes ein Korrekturfaktor ein, zu dessen genauer Quantifizierung weiterführende morphologische als auch biomechanische Untersuchungen notwendig sind. Mit einem repräsentativ für das stehende Schaf (S1) ermittelten Wert von 3,6 scheint der Korrekturfaktor beim Schaf im Vergleich zum Menschen deutlich höher zu liegen.

Die ermittelten relativ geringen axialen Kompressionskräfte des Schafes von 130 und 58 N basieren ausschließlich auf den Messungen des ersten Schafes der In-vivo-/Ex-vivo-Studie. Organisatorische Gründe bzgl. der weiterführenden Experimentplanung erforderten diese Vorgehensweise. Die abgeleitete Kompressionskraft von 130 N für das stehende Schaf steht in guter Übereinstimmung mit einer Studie, die den Krafftfluss entlang der Wirbelsäule des Schafes in vivo direkt bestimmten (Hauerstock et al., 2001). Hierbei wurde die Bandscheibe und Teile des Wirbelkörpers entfernt und passgenau ein Kraftaufnehmer in die Wirbelsäule implantiert, sodass auf dem Prinzip einer Dehnungsmessung basierend, die absolut wirkenden Lasten über das Implantat hinweg gemessen werden konnten. Für das stehende Schaf ergaben sich in der besagten Studie Werte von durchschnittlich etwa 161 N (n=2). Die Untersuchung weiterer Körperpositionen hingegen ergab allerdings fragliche Resultate. So ermittelten Hauerstock et al. für das liegende Schaf eine signifikant höhere mittlere Kraft von etwa 247 N (n=1). Eine höhere axiale Last beim liegenden im Vergleich zum stehenden Schaf erscheint in Abgrenzung zu den vorliegenden In-vivo-IDP-Messungen und unter Berücksichtigung diverser Messungen zur Bestimmung der myoelektrischen Aktivität paraspinaler Muskeln während Aktivitäts- und Ruhephasen beim Menschen jedoch nicht nachvollziehbar (Andersson, 1985; Schultz et al., 1982; Schultz and Andersson, 1981). Beim Menschen ist die Wirbelsäule in ihrer aufrechten Position durch Muskulatur und Bänder verspannt (Panjabi, 1992). Während Ruhephasen (z.B. im Liegen, nachts) entspannt sich die Muskulatur und ermöglicht so die Höhenrückgewinnung des Zwischenwirbelraumes. Höhere absolute Kompressionslasten entlang der ovinen Wirbelsäule beim ruhenden Schaf verglichen mit der stehenden Körperposition würden eine Höhenrückgewinnung der Bandscheibe und den durch die vorliegende Studie ermittelten Druckanstieg während Erholungsphasen des Tieres nicht zulassen. Grund für die abweichende Vergleichbarkeit in den Ergebnissen könnte sein, dass die Körperposition eines stehenden Schafes nicht mit deutlichen Rotations-/Seitneigungsmomenten entlang der Wirbelsäule einhergeht wie es z.B. in der Liegeposition des Schafes der Fall ist. Das Stehen ist gekennzeichnet durch eine gerade (symmetrisch) gestreckte Wirbelsäule. Hier ist nicht davon auszugehen, dass es zu Relativbewegungen zwischen den benachbarten Wirbelkörpern kommt, und so

Biegemomente größeren Ausmaßes Einfluss auf das in der Studie von Hauerstock et al. verwendete Messsystem nahmen, wie es während typischer Liegepositionen des Schafes möglicherweise passiert sein könnte. Vergleichbare Störeffekte können durch die Verwendung intradiskaler Messsonden weitestgehend ausgeschlossen werden.

Ein weiteres Indiz dafür, dass die axialen Kompressionskräfte entlang der Wirbelsäule trotz deutlich höheren intradiskalen Druckes beim Vierbeiner bedeutend geringer sind, liegt in der Anzahl der Krümmungen der Wirbelsäule (Abb. 4.6). Beim Menschen weist die Wirbelsäule mit ihrem doppelt-s-förmigen Verlauf drei physiologische Krümmungen auf. Das Schaf bzw. Vierbeiner allgemein weisen nur eine Wirbelsäulenkrümmung auf. Laut Kapandji et al. (1992) nimmt mechanischen Berechnungen zufolge die Belastbarkeit einer Struktur gegenüber mechanischer Belastung mit der Anzahl ihrer Krümmungen zu. Dementsprechend scheint die Widerstandsfähigkeit gegenüber axial wirkenden Kräften beim Menschen in einem deutlich höheren Maße notwendig zu sein als an der Wirbelsäule des Vierbeiners.

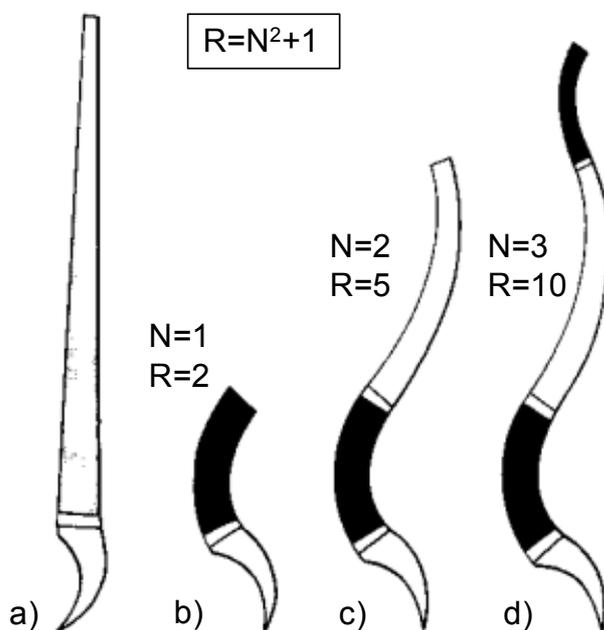


Abb. 4.6: Zusammenhang zwischen Anatomie und Mechanik an der Wirbelsäule.

Berechnungen zufolge nimmt die Widerstandsfähigkeit (R) eines geraden Achsenstabes (a) mit konsekutiver Steigerung der Anzahl seiner Krümmungen (N , b-d) zu. Die Anzahl der Krümmungen fließt dabei im Quadrat in die Berechnung der Widerstandsfähigkeit ein (nach Kapandji, 1992).

4.3 In-vitro-Untersuchungen

Neuartige Hydrogele zum Nukleusersatz werden gegenwärtig nach dem Vorbild des natürlichen Nukleusgewebes designed (Strange and Oyen, 2012). Häufig werden dabei lediglich die biomechanischen Eigenschaften des Ersatzes isoliert betrachtet, ohne die natürliche Umgebung, in der das Hydrogel anschließend seine Funktionalität unter Beweis stellen muss, zu berücksichtigen (Calderon et al., 2010; Cloyd et al., 2007; Gupta et al., 2011; Park et al., 2012; Sasson et al., 2012). Da jedoch die Durchführung einer Nukleotomie zur Implantation neuartiger Nukleusersatzmaterialien unumgänglich ist, ist es notwendig herauszufinden, ob es am Bewegungssegment zu strukturellen Schädigungen kommt, die u.U. durch das Ersatzmaterial behoben bzw. ausgeglichen werden müssen. Um eine Aussage darüber treffen zu können, ob es durch ein Hydrogel für TE-Strategien an der Bandscheibe möglich ist, die Biomechanik eines Bewegungssegmentes wiederherzustellen, ist daher die Betrachtung des gesamten Bewegungssegmentes von Nöten.

4.3.1 In-vitro-Ergebnisse

Die Ergebnisse der vorliegenden In-vitro-Untersuchungen zum Nukleusersatz an der Bandscheibe im Tiermodell Schaf ergaben, dass allein ein isolierter Anulusdefekt (DEF-AN) bei ansonsten intaktem Gewebsverbund innerhalb der Bandscheibe nicht zu signifikanten Beeinträchtigungen am Bewegungssegment führte. Weder der IDP noch der Höhenverlauf der Bewegungssegmente im Kriech-Relaxations-Test differierten signifikant im Vergleich zum Intaktzustand. Diese Tatsache kann zum einen in einem effektiven Defektverschluss mittels Naht und Kleber begründet sein, kann aber auch auf der relativ geringen axialen Kraft, die auf das ovine Bewegungssegment eingeleitet wurde, basieren. Unter Berücksichtigung physiologischer Lasten erscheint es daher nicht zielführend für Studien zur Untersuchung von Nukleusersatzmaterialien als Kontrollgruppe einen isolierten Anulusdefekt mitzuführen.

Die Zerstörung natürlicher Grenzflächen zwischen Nukleus und Umgebung innerhalb der Bandscheibe durch die Nukleotomie hingegen bewirkte signifikante

Veränderungen in der Funktionalität der Bandscheibe. So war die Entfernung und Reimplantation des natürlichen Bandscheibengewebes (DEF-NUK_{n+k}) nicht in der Lage, die Biomechanik des Bewegungssegmentes wiederherzustellen und führte zu einer Zunahme des Höhenverlustes unter Kompression sowie zu einem signifikanten Druckverlust in der Bandscheibe. Auch durch die Implantation der beiden unterschiedlichen Hydrogele (DDAHA und iGG-MA) konnte keine Wiederherstellung des Intaktzustandes erreicht werden, sodass neben einem vermehrten Höhenverlust auch ein signifikanter Abfall des Bandscheibendrucks resultierte. Ein modifizierter Anulusverschluss mittels Plug (DEF-NUK_p) führte zu Ergebnissen im Kriech-Relaxations-Test, die dem Intaktzustand am nächsten kamen. Dennoch konnte auch in dieser Testgruppe die axiale Steifigkeit sowie der IDP einer intakten Bandscheibe nicht erreicht werden. Die Funktionalität der Bandscheibe hängt demnach nach chirurgischer Intervention zum Bandscheibenersatz nicht ausschließlich von einem effektiven Defektverschluss ab, der das (re)implantierte Material an Ort und Stelle hält und so für einen ausreichenden Druckaufbau innerhalb des Bandscheibenzentrums sorgt. Vielmehr scheinen noch weitere Effekte eine Rolle in der veränderten Biomechanik des Bewegungssegmentes zu spielen.

Die Untersuchung der Segmentsteifigkeiten aus dem Steifigkeitstest ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den unterschiedlichen Testgruppen und INTAKT. Im Kriech-Relaxations-Test hingegen konnte bei der Analyse der Steifigkeiten für das Kraftintervall von 130 auf 58 N eine 20%ige Reduktion für DEF-NUK_{n+k} und eine ca. 10 %ige Reduktion für DDAHA festgestellt werden. Dieser Unterschied schlug sich in einem unmittelbaren Höhenverlust der Testgruppen DEF-NUK_{n+k} und DDAHA nieder, der jeweils zu Beginn der Kompressionsbelastung von 130 N im Kriech-Relaxations-Test zu verzeichnen war. iGG-MA hingegen wies keinen merklichen Unterschied in der Höhenveränderung während Lastreduktion verglichen mit INTAKT im Kriech-Relaxations-Test auf. Der persistierende Höhenverlust dieser Testgruppe am Ende des Kriech-Relaxations-Test stellte das Resultat einer niedrigeren Steifigkeit während der 15-minütigen Phasen unter 130 N Kompressionslast dar.

Die Unterschiede in den Testgruppen, die eine Nukleotomie beinhalteten, können auf verschiedenen Phänomenen beruhen. Zum einen kann die Zerstörung des natürlichen Gewebsverbundes zwischen Nukleus und umgebenden Strukturen dazu

führen, dass die unmittelbare Lastübertragung unter den Kompartimenten der Bandscheibe nicht mehr gegeben ist. Scher- und Zugkräfte können auf diese Weise an den Grenzflächen zwischen Deckplatte und Nukleus bzw. zwischen Nukleus und Anulus nicht mehr übertragen werden. Im Intaktzustand sind diese Kompartimente über ihre Fasern miteinander verwachsen (Rodrigues et al., 2012; Wade et al., 2011, 2012a, b, Abb. 4.7).

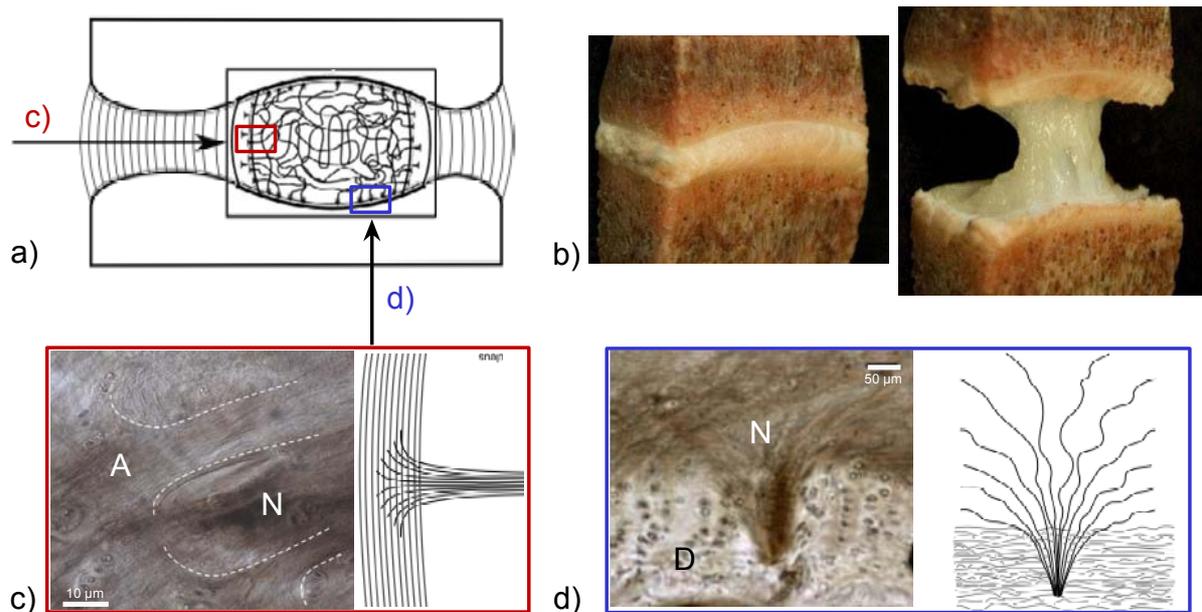


Abb. 4.7: Gewebsverbund innerhalb der ovinen Bandscheibe. a) Obwohl sich die einzelnen Kompartimente der Bandscheibe sowohl funktionell als auch morphologisch voneinander abgrenzen lassen, ist an den Übergangsbereichen zwischen den Kompartimenten Nukleus (N), Anulus (A) und Deckplatte (D) eine innige Integration zwischen benachbarten Strukturen gegeben. Dies ist am Bandscheibenpräparat nach Entfernung des Anulus bereits zu vermuten (b), als auch in der mikroskopischen Detailaufnahme (jeweils links) für die Übergangsbereiche zwischen Anulus und Nukleus (c) als auch Nukleus und Deckplatte (d) zu verzeichnen. Die schematischen Abbildungen (c,d, jeweils rechts) stellen eine mögliche Art der Faserinsertion zwischen benachbarten Kompartimenten dar (modifiziert nach Wade et al., 2012b).

Des Weiteren wird durch die Nukleotomie mittels Rongeuren mechanisch die Gewebekontinuität des Kollagen-Proteoglykan-Gerüstwerks des Nukleus zerstört, sodass selbst innerhalb des Nukleusraumes nach Reimplantation der natürliche Gewebsverbund aufgehoben und somit dessen Mechanik empfindlich gestört ist. Die mechanische Bedeutung des natürlichen Gewebsverbunds des Nukleus beschreiben Wade et al. als „intrinsic tensile strength“ des Nukleus.

Obwohl ein isolierter Anulusdefekt nachweislich zu keiner Beeinträchtigung der Biomechanik des Bewegungssegmentes führte, kam es in der Kombination mit einer zerstörten Aufhängung des Nukleus innerhalb der Bandscheibe nach Lastapplikation auf das Bewegungssegment zu Verschiebungen des zerkleinerten Gewebes in den inneren Teil des Anulusdefekts hinein (Abb. 4.8 a,b). Dies zeigt, dass Nukleus und Anulus im ursprünglichen Zustand fest miteinander verwachsen sind.

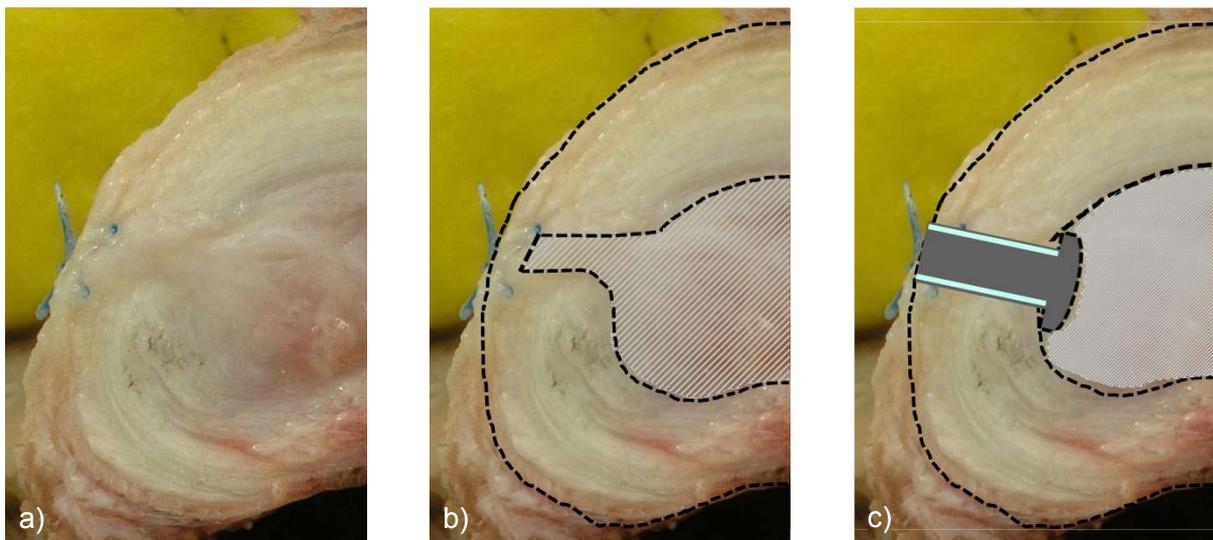


Abb. 4.8: Transversalschnitt durch die Bandscheibe mit reimplantiertem Nukleusgewebe (DEF-NUK). Im Anschluss an den Kompressionstest zeigte sich eine Verschiebung des reimplantierten Nukleusgewebes bis unter die äußeren Anuluslamellen in Testgruppe DEF-NUK_{n+k}, die mittels Naht und Kleber verschlossen wurde (a,b). Durch Einbringen des Plug (DEF-NUK_p) konnte diese Volumenverdrängung verhindert und so eine dichtere Reimplantation des fragmentierten Nukleusgewebes erreicht werden (c).

Durch den Anulusverschluss aus einer Kombination aus Kleber und Naht konnte nicht sichergestellt werden, dass die tiefen Anuluschichten ausreichend readaptiert wurden und die Nukleuskavität so kompetent nach außen hin abgeschlossen werden konnte. Die Naht erreichte ausschließlich die superfiziellen Anuluslamellen, die die Bandscheibe gegenüber der Umgebung zwar erfolgreich verschloss, ein Aufklaffen des inneren Defektbereiches allerdings nicht suffizient garantieren konnte. Es stand somit einschließlich des inneren Anulusdefektbereiches ein größerer Raum innerhalb der Bandscheibe zur Verfügung, in den das (lose) reimplantierte Nukleusgewebe sowie die beiden Hydrogele verdrängt werden konnten, sodass ein effektiver Druckaufbau innerhalb der wiederaufgefüllten Nukleuskavität nicht möglich war. Zu einer leichten Verbesserung dieser Umstände trug der Defektverschluss mittels Plug bei, der diesen Volumenverdrängungseffekt etwas in seinem Ausmaß

reduzieren konnte (Abb. 4.8 c). Die Applikation höherer axialer Lasten hätte den Volumenverdrängungseffekt in beiden Fällen noch verstärkt.

4.3.2 Mechanische Kompetenz von Hydrogelen als Nukleusersatzmaterial

Ein Höhen- und Steifigkeitsverlust der Bandscheibe post Nukleotomie kann nachweislich effektiv durch den Einsatz von Hydrogelen in vitro wiederhergestellt werden (Wilke et al., 2006a). Darüber hinaus legen Kurzzeit-Studien am Tiermodell in vivo den Schluss nahe, dass im orthotopen Modell an der Bandscheibe iatrogen induzierte degenerative Veränderungen durch die Anwendung von Hydrogelen als Nukleusersatz in ihrem Ausmaß minimiert werden können (Revell et al., 2007; Woiciechowsky et al., 2012). Dennoch können der zerstörte Kraftfluss entlang der natürlichen Grenzflächen und / oder der Effekt eines insuffizient verschlossenen Anulusdefekts ausschlaggebend dafür sein, dass selbst Hydrogele, die in biomechanischer Sicht auf das natürliche Vorbild des Nukleus ausgelegt sind, nicht in der Lage sind, die Mechanik der Bandscheibe auf lange Sicht wiederherzustellen. Eine innige Integration der Biomaterialien und des reimplantierten natürlichen Gewebes wie er in der intakten Bandscheibe gegeben ist, konnte durch die vorliegenden Untersuchungen nicht erreicht werden. Die Übergangsbereiche der intakten Bandscheibe zwischen Nukleus und Anulus bzw. Nukleus und benachbarten Deckplatten der Wirbelkörper sind fließend. Die einzelnen Kompartimente sind miteinander verwachsen (Rodrigues et al., 2012; Wade et al., 2011, 2012a, b). Vergleichbar den Sharpeyfasern im Knochen, strahlen die Fasern des Nukleus in die Nachbarkompartimente Anulus und hyalinknorpelige Deckplatte ein und verbinden beide Strukturen jeweils effektiv miteinander. Gerade im Rahmen von Regenerationstrategien an der Bandscheibe könnten diese Faserinsertionsstellen eine wichtige Leitschiene für Zellen darstellen, entlang derer die Zellen aus der Umgebung in die Bandscheibe migrieren können. Darüber hinaus ist diese Verankerung zur effektiven Übermittlung von Zug- und Scherspannungen an der Grenzfläche zwischen benachbarten Strukturen notwendig, die erstens wesentlich für die Aufrechterhaltung der mechanischen Kompetenz der Bandscheibe sind und zweitens als mechanischer Stimulus für die einsprossenden Zellen dienen können und somit zur Formation mechanisch belastbarer Übergangsbereiche beitragen.

Die im vorliegenden Versuch eingesetzten Hydrogele weisen adhäsive Eigenschaften auf. Trotzdem schienen beide den Einfluss zerstörter Grenzflächen und den Volumenverdrängungseffekt am inneren Anulus nicht effizient aufheben zu können. Es erscheint daher fraglich, ob die aus biomechanischer Sicht für Hydrogele so bemerkenswerten Eigenschaften wie der hohe Wassergehalt, die nachweislich gute Biokompatibilität sowie die leichte Zellbesiedlung und Gewebsformation *in vitro* (Ahmed et al., 2008; Lavik and Langer, 2004; Oliveira et al., 2010; Oliveira et al., 2009; Pereira et al., 2011; Silva-Correia et al., 2011) nach deren Einsatz *in vivo* in vollem Ausmaß zum Tragen kommen können.

Arthur et al. (2010) belegten, dass Hydrogele die Biomechanik der Bandscheibe effektiv wiederherstellen können. Unter Verwendung eines Ballonsystems wurde post Nukleotomie ein Hydrogel unter Druck in die Nukleuskavität injiziert und auf diese Weise eine Möglichkeit geschaffen, den Bandscheibenraum nach außen effektiv zu verschließen, sodass das Gel während der anschließenden Untersuchungen nicht aus dem Bandscheibeninneren austreten konnte (Arthur et al., 2010). In Anlehnung hieran wurde im vorliegenden Test ebenfalls versucht, die Hydrogele unter Aufbringung eines größeren Injektionsdruckes bis zum Wiedererreichen des Intaktdruckes zu injizieren. Ohne ein vergleichbares Verschlussystem wie oben beschrieben konnte eine Extrusion des Bandscheibenersatzes unter den beabsichtigten Kompressionslasten von bis zu 500 N jedoch nicht verhindert werden. Für Nukleusersatzstrategien konnten Heuer et al. (2008) zeigen, dass die Kombination aus Cyanoacrylatkleber und chirurgischer Naht die gegenwärtig effektivste Methode zum Bandscheibenverschluss darstellt (Heuer et al., 2008c). Mit dem Ziel, die Menge des entfernten Nukleusgewebes wiederaufzufüllen wurde daher durch die Kombination aus Kleber und Naht der bestmögliche Defektverschluss gewährleistet. Eine Injektion des Hydrogels war somit ohne Extrusion möglich. Der annähernd gleich hohe Wassergehalt von etwa 80% von natürlichem Nukleusgewebe und den beiden Hydrogelen ließ eine gewichtbasierte Wiederauffüllung des Nukleusraumes gerechtfertigt erscheinen.

Im Unterschied zu den Untersuchungen von Arthur et al. sollte keine mechanische Barriere zwischen Hydrogel und natürlichen Bandscheibenstrukturen geschaffen werden. TE-Strategien basieren darauf, nativen Zellen der unmittelbaren Umgebung die Möglichkeit zu verschaffen, das zur Verfügung gestellte und mechanisch

tragende Gerüstwerk zu besiedeln und so einen fließenden Übergang zwischen Biomaterial und biologischem Gewebe zu gewährleisten. Im Zuge der Besiedlung des Ersatzmaterials mit nativen Zellen soll es von Beginn der Implantation an zu einem gleichförmigen Abbau der Matrix des Hydrogels unter Regeneration einer zellbasierten extrazellulären Matrix und damit der Formation gesunden, natürlichen Gewebes kommen.

4.3.3 Versuchsdesign

Der natürliche Tagesrhythmus des Menschen aus einer 16-stündigen Tages- und einer nur halb so langen Nachtphase lässt schlussfolgern, dass die Bandscheibe in vivo in der Lage ist, Flüssigkeit doppelt so schnell zu akquirieren wie sie bereit ist, Wasser an die Umgebung abzugeben. Wie MRT-Untersuchungen zeigten, führt ein 8-stündiges Aktivitätsprogramm nur zu einer Volumenabnahme der Bandscheibe von ca. 5%, während eine 8-stündige Erholungsphase zu einer Volumenzunahme von ca. 11% führt (Malko et al., 2002). Ayotte et al. stellten daher die Hypothese auf, dass der Fluidstrom der Bandscheibe einen gerichteten Verlauf aufweisen muss. In einer FE- sowie in einer Ex-vivo-Studie gelang es den Autoren diese gerichtete Fluidbewegung zu demonstrieren (Ayotte et al., 2000; Ayotte et al., 2001). Unter Kompression kommt es demnach durch die Deformation des Deckplattenknorpels und des Nukleus zu einem (partiellen) Verschluss der Poren in den knöchernen Deckplatten; der Fluidausstrom wird hierdurch limitiert. Unter Entlastung werden die Poren durch die Relaxation der Knorpelstrukturen wieder freigegeben und ermöglichen so einen ungehinderten Fluideinstrom. Des Weiteren wird die Richtungsabhängigkeit des Fluidflusses durch das nichtlineare Permeabilitäts-Dehnungsverhalten geregelt (Holmes, 1986; Kwan et al., 1990; Lai et al., 1981). Mit zunehmender Dehnung wird die Permeabilität exponentiell kleiner, d.h. unter Belastung ist die Permeabilität des Knorpels und der Bandscheibe effektiv geringer als unter Entlastung.

Im Gegensatz zu der Situation in vivo und den Ergebnissen von Ayotte et al. (2000; 2001), führten im vorliegenden In-vitro-Test selbst doppelt so lange Relaxationsphasen von jeweils 30 Minuten nicht zum vollständigen Ausgleich des während der 15-minütigen Belastungsphase eingetretenen Höhenverlustes. Über die

drei Testzyklen kam es zu einem stufenweisen Anstieg des Höhenverlustes über die gesamte Testdauer hinweg. Am Ende des Kriech-Relaxations-Tests kam es in allen Testgruppen gleichermaßen zu einem bleibenden Höhenverlust der Bandscheiben. Dieses Phänomen steht mit diversen anderen, gleichartig durchgeführten Tests an der Bandscheibe in Einklang (Johannessen et al., 2004; van der Veen et al., 2007; van Deursen et al., 2001), und ist vermeintlich das Resultat verstopfter Kapillargefäße in den Deckplatten der Wirbelkörper post mortem. Einhergehend mit dem Sistieren des Kreislaufes tritt unmittelbar die Gerinnung des Blutes ein, sodass der natürliche Weg des Flüssigkeitseinstromes in die Bandscheibe in vitro merklich limitiert wird. Einen Hinweis darauf, dass noch andere Mechanismen poröser Strukturen (Porosität, Tortuosität) an der eingeschränkten Fluidrückgewinnung ex vivo beteiligt sein müssen, liefern Untersuchungen zur Messung der Deckplattenpermeabilität am Schaf (Accadbled et al., 2008). So waren selbst nach Heparinisierung der Tiere prae mortem die Permeabilitäten für Fluidausstrom ca. 35% größer als für Flüssigkeitseinstrom. Trotz der vermeintlichen Limitation eines eingeschränkten Flüssigkeitseinstromes in die Bandscheibe in vitro, kann kein anderes artifizielles Testsystem die natürlichen Umgebungsverhältnisse der Bandscheibe einschließlich deren viskoelastischer Eigenschaften so detailgetreu wiedergegeben werden wie die Bandscheibe selbst.

Darüber hinaus kann der mangelhafte Fluideinstrom in die Bandscheibe in vitro als ein repräsentatives Modell sklerosierter Deckplatten einer degenerierten Bandscheibe in vivo gesehen werden. Gerade für diese spezifische Indikation gering- bis mittelgradig degenerierter Deckplatten sind die eingesetzten Hydrogele konzipiert und so müssen diese selbst bei einem limitierten Fluidstrom in die Bandscheibe hinein noch eine ausreichende Flüssigkeits- und Solutbewegung gewährleisten, die essentiell zur Sicherstellung der Ernährung der Zellen im Bandscheibeninneren ist und damit die Grundlage für regenerative (zellbasierte) Therapien darstellt. Ein erhöhtes osmotisches Potential der Ersatzmaterialien im Vergleich zum natürlichen Nukleusgewebe wäre eine mögliche Eigenschaft von Hydrogelen, einen ausreichenden internen Bandscheibendruck trotz reduziertem Flüssigkeitseinstrom aufgrund kalzifizierter Deckplatten aufzubauen. Die verwendeten Hydrogele waren im vorliegenden Test nicht in der Lage, die Defizite aufgrund eines mangelhaften Flüssigkeitseinstromes in die Bandscheibe auszugleichen. Beide Hydrogele schienen

demnach in ihrer gegenwärtigen Form nicht darauf ausgelegt zu sein, degenerative Effekte an der Bandscheibe kompensieren zu können.

4.4 In-silico-Untersuchungen

Die Untersuchung des Ausmaßes des Grenzflächeneffektes zwischen Nukleus und Umgebung mit der Testgruppe DEF-NUK100_{FE} ergab lediglich einen geringen Abfall des IDP und nur einen vernachlässigbaren Effekt auf die Höhenabnahme der Bandscheibe. Erst eine Verminderung des reimplantierten Nukleusvolumens (DEF-NUK98_{FE}) führte zu einer merklichen Abnahme der axialen Steifigkeit und des IDP, was sich durch eine zusätzliche Reduktion des Wassergehaltes (WC80_{FE}) noch weiter verstärken ließ. Die Verringerung des Elastizitätsmoduls (EL75_{FE}) und des osmotischen Potentials (OP90_{FE}) nahmen nachweislich Einfluss auf die Biomechanik des Bewegungssegments, allerdings in einem deutlich geringeren Ausmaß.

Die in den Simulationen einzeln berücksichtigten Veränderungen wie das Reimplantatvolumen, der Wassergehalt und weitere Materialparameter treten in vitro vermeintlich in einem nicht genauer quantifizierbaren Verhältnis in Kombination auf. Es war jedoch nicht das Ziel der durchgeführten Parameterstudien, die Ergebnisse der In-vitro-Tests an ovinen Bandscheiben genau nachzustellen, sondern eine generelle Aussage darüber treffen zu können, ob und in welchem Ausmaß, die einzelnen Materialeigenschaften Einfluss auf die Biomechanik des Bewegungssegmentes nehmen, sodass das Design zukünftiger Nukleusersatzmaterialien noch präziser auf die Anforderungen der Bandscheibe angepasst werden können. Aus diesem Grund wurde auch ein FE-Modell einer humanen Bandscheibe verwendet. Um trotz der Unterschiede in der Anatomie (v.a. unterschiedliche Bandscheibenhöhe und -querschnittsfläche) zwischen der ovinen Bandscheibe und der humanen Bandscheibe eine Vergleichbarkeit der erlangten Daten (in vitro und in silico) zu gewährleisten, wurden für beide Modelle jeweils die ermittelten physiologischen Kräfte appliziert, die im Falle des Menschen der Literatur entnommen wurden. Hieraus leiteten sich beim Menschen die Lasten von ca. 500 (Stehen) bzw. 100 N (Liegen) ab (Rohlmann et al., 2009; Wilke et al., 2003). Die Verwendung höherer axialer Kompressionskräfte wie sie nachweislich beim

Menschen z.B. während des Tragens von Lasten oder während unterschiedlicher kombinierter Bewegungen (Flexion, Extension, Seitneigung oder Rotation) im Tagesverlauf entstehen, hätte unter Umständen eine Verstärkung der ermittelten Phänomene in silico ergeben. Vergleichbar der Lastherleitung beim Schaf wurde jedoch mit den axialen Kompressionskräften für Stehen bzw. Liegen jeweils der dominierende Belastungsbetrag während des Tages bzw. der Nacht gewählt.

Wie bereits bei der Diskussion der In-vitro-Ergebnisse angeführt, tritt bei experimentellen Untersuchungen an der Bandscheibe das Phänomen auf, dass der Fluidstrom in die Bandscheiben nicht effektiv erfolgen kann und sich in der Folge ein persistierender Höhenverlust am Bandscheibensegment einstellt (van der Veen et al., 2007; van Deursen et al., 2001). Um diesen nicht vermeidbaren postmortalen Effekt, in den Simulationen adäquat zu berücksichtigen, fanden in den Parameterstudien impermeable Deckplatten Anwendung, die zwar ein ungehindertes Austreten von Flüssigkeit aus der Bandscheibe über die Deckplatten erlaubten, allerdings nicht den Wiedereintritt von Flüssigkeit in die Bandscheibe aus der Umgebung. Im Zuge der Bandscheibendegeneration treten häufig Kalzifizierungen der Deck- und Grundplatten der Wirbelkörper auf und setzen somit potentielle Nukleusersatzmaterialien einem eingeschränkten Flüssigkeitstransport in die Bandscheibe hinein aus. Die Blockierung der Wirbelkörperdeckplatten kann somit als ein Charakteristikum eines degenerierten Bandscheibenfaches angesehen werden.

In den numerischen Untersuchungen fand in Abweichung von den In-vitro-Versuchen ein intakter Anulus Anwendung. Den in vitro durchgeführten Anulusdefekt im FE-Modell zu berücksichtigen ist äußerst komplex und bedarf für die Validierung zusätzlicher, extrem aufwendiger Experimente. Der Versuch, den Defekt zu simulieren ging mit erheblichen Konvergenzproblemen im Modell einher, sodass zur Berücksichtigung des Anulusdefektes auf die in vitro beobachtete Volumenverdrängung des (Nukleus-/ Ersatz-) Materials in den Anulusdefekt der Bandscheibe zurückgegriffen wurde und damit ein reduziertes Reimplantationsvolumen im Modell stellvertretend zur Anwendung kam.

Das humane Modell der lumbalen Bandscheibe L4-L5 beinhaltete ausschließlich die anterioren Strukturen des Bewegungssegmentes. Die posterioren Strukturen, einschließlich der Facettengelenke, fanden keine Berücksichtigung. Etwa 10% des Kraftflusses über das Bewegungssegment hinweg werden im Intaktzustand von den

Facetten getragen (Adams and Hutton, 1980; Shirazi-Adl and Drouin, 1987). Im Vergleich zu einem kompletten Bewegungssegment ist den numerischen Analysen an der isolierten Bandscheibe daher von einer verminderten Belastung gleichen Betrages auszugehen.

Neben dem Einfluss der einzelnen Parameterveränderungen auf die axiale Steifigkeit und den intradiskalen Druck des Bewegungssegmentes in den numerischen Analysen ist die Umverteilung der Lastverhältnisse zwischen Nukleus und Anulus in den einzelnen Testgruppen als wesentlich zu erachten. Jede Manipulation am Bandscheibenfach, die zu einer Abnahme der lasttragenden Kapazität des Nukleus führt, geht zwangsläufig mit einer vermehrten Belastung des Anulus einher. Eine gesteigerte axiale Druckbelastung auf den vornehmlich auf Zugbelastung ausgelegten Anulus verursacht Schädigungen der Kollagenfasern und kann über die Ausbildung von Rissen zu weitergehenden Degenerationserscheinungen am Bandscheibenfach führen (O'Connell et al., 2011). Jedes Hydrogel, das im Rahmen eines Nukleusersatzes an der Bandscheibe Verwendung finden soll, muss diesen Effekt berücksichtigen und eine physiologische Lastverteilung zwischen den Kompartimenten Nukleus und Anulus wiederherstellen.

4.5 Zukünftige Forschungsansätze

Im Fokus der vorliegenden Dissertation stand es, die Bedeutung iatrogen induzierter struktureller Schädigungen der Bandscheibe für regenerative Behandlungskonzepte spezifischer, degenerationsbedingter Rückenschmerzen herauszustellen. Vor der erfolgreichen klinischen Applikation derartiger Therapiestrategien müssen allerdings noch weitere offene Fragestellungen geklärt werden.

Im Zuge der Bandscheibendegeneration erfahren die Deckplatten der Wirbelkörper strukturelle als auch funktionelle Veränderungen (Benneker et al., 2005). Die Sklerosierung der Deckplatten führt dazu, dass sich zellbesiedelte Biomaterialien bereits initial nach Implantation einer eingeschränkten Ernährungssituation ausgesetzt sehen. Ein schnelles und wirkungsvolles Einwachsen des Biomaterials im Sinne einer aktiven Vernetzung des Hydrogels mit seiner Umgebung durch die Zellen ist dadurch deutlich limitiert. V.a. reduzierte Glukosekonzentrationen bedingen eine

empfindliche Störung des zellulären Stoffwechselmetabolismus (Rinkler et al., 2010) und führen damit zu einer eingeschränkten zellulären Aktivität. Eine Steigerung der Integrationskompetenz zwischen Biomaterial und degenerierter Umgebung könnte z.B. darüber erreicht werden, dass die Deckplatten chemisch vorbehandelt werden. Dabei könnten mithilfe Kalzium-bindender Agenzien die sklerosierten Deckplatten entkalkifiziert werden oder mittels enzymatischen Verdauens die Proteoglykane an der Grenzfläche zwischen natürlicher Struktur und Implantat ausgewaschen werden, um so zu einer besseren Vernetzung zwischen Biomaterial und Bandscheibe beizutragen (Boyd and Carter, 2006). Ob sich derartige Laboransätze auf die Klinik und damit den Einsatz am Patienten übertragen lassen, gilt es herauszustellen.

Die bloße Injektion relevanter Volumina eines Nukleusersatzes in die Bandscheibe ist im Frühstadium der Bandscheibendegeneration aufgrund des noch weitestgehend erhaltenen Schwellendrucks des Bandscheibeninnenraumes nicht möglich. Hierzu ist die Durchführung einer Nukleotomie erforderlich. In fortgeschrittenen Stadien der Bandscheibendegeneration nimmt der Druck im Inneren der Bandscheibe zunehmend ab. Für eine erfolgreiche Applikation eines Hydrogels als Nukleusersatz ist nichtsdestotrotz auch hier zumindest die Punktion der Bandscheibe notwendig. In Tierversuchen konnte allerdings gezeigt werden, dass bereits die Punktion der Bandscheibe Degenerationsprozesse unterschiedlichen Ausmaßes initiiert (Masuda et al., 2005; Melrose et al., 2002; Melrose et al., 2012). Darüber hinaus belegten retrospektive Studien, dass die beim Menschen diagnostisch vielfach sorglos durchgeführte Diskographie langfristig zu Degenerationserscheinungen im schmerzverursachenden Bandscheibenfach führte (Carragee et al., 2009). Auslösend hierfür scheinen entzündungsmedierte Degenerationskaskaden zu sein, die sich an die strukturelle Schädigung der Bandscheibenintegrität anschließen (Lotz and Ulrich, 2006; Ulrich et al., 2007). Für die erfolgreiche Umsetzung von regenerativen Nukleusersatzstrategien ist es daher essentiell, dass entzündliche Veränderungen im Anschluss an die Punktion der Bandscheibe effektiv verhindert werden. Eine mögliche Lösung hierfür könnten sogenannte „drug delivery systems“ bieten (Amin et al., 2009). Hydrogele als Nukleusersatz könnten demnach mit antiinflammatorischen Wirkstoffen vernetzt werden und so über die topische Freisetzung des Antiphlogistikums direkt in der Bandscheibe entzündliche Veränderungen unterbunden werden.

In der vorliegenden Dissertation konnte gezeigt werden, dass durch den Einsatz eines Plugs als Anulusverschluss, ein wirkungsvollerer Druckaufbau und ein geringerer Höhenverlust des Bandscheibensegmentes nach Nukleusreimplantation resultierten als beispielsweise durch die Kombination aus Cyanoacrylatkleber und chirurgischer Naht. Im Flexibilitätstest sowie unter Simulation kombinierter Lasten versagten jedoch beide Verschlussysteme. Die Extrusion von Implantaten unterschiedlichster Beschaffenheit stellt an der Bandscheibe ein großes Problem dar (Allen et al., 2004; van Ooij et al., 2003; Wilke et al., 2006a). Um Komplikationen und unerwünschte Nebenwirkungen sicher zu verhindern, müssen jedoch die Extrusion von Bandscheibenimplantaten im Allgemeinen sowie die Extrusion von Biomaterialien für regenerative Therapiestrategien an der Bandscheibe im Speziellen erfolgreich vermieden werden. Neben mechanischen Risiken wie Nervenwurzelkompressionen können gerade durch die Extrusion von biologisch aktiven Materialien, d.h. Biomaterialien in Kombination mit wachstumsmodulierenden Peptiden z.B., Gefährdungen nicht abschätzbaren Ausmaßes ausgehen, wenn diese aus der Bandscheibe heraus, peripheren Organsystemen oder dem Blutkreislauf zugeführt werden.

In Kombination mit den Resultaten der vorliegenden Dissertation spiegeln all diese gegenwärtig weiterhin ungelösten Problemstellungen den weiteren uneingeschränkten Forschungsbedarf hinsichtlich regenerativer Therapiekonzepte an der Bandscheibe wider, deren Lösung eine unabdingbare Voraussetzung auf dem Weg zu einer erfolgreichen Therapie degenerationsbedingten Rückenschmerzes darstellen. Für die Entwicklung einer effektiven Behandlungsmethode sind daher auch in Zukunft ein hohes Maß an interdisziplinärer Forschung und eine Vielzahl präklinischer Untersuchungen von Nöten.

5 Zusammenfassung

Bandscheibenbedingte Rückenschmerzen stellen eine Gesundheitsstörung von herausragender Bedeutung dar. Innovative Therapiekonzepte sind darauf ausgerichtet, schmerzhaft degenerierte Bandscheiben in ihren natürlichen Strukturen zu regenerieren. Allein durch den chirurgischen Eingriff zur Anwendung dieser Therapiekonzepte wird jedoch die mechanische Kompetenz der Bandscheibe empfindlich gestört. Derzeit ist nicht bekannt, ob neue Nukleusersatzmaterialien für Tissue engineering Strategien an der Bandscheibe diesen Verlust kompensieren können. Daher war es das Ziel der Dissertation in einem kombinierten experimentellen Versuchsansatz aus In-vivo-, Ex-vivo-, In-vitro- und In-silico-Untersuchungen, neu entwickelte Hydrogele als Nukleusersatz im Tiermodell Schaf zu untersuchen und das Schaf als Tiermodell im Bereich der Bandscheibenforschung näher zu charakterisieren.

Um ein physiologisches Lastprotokoll für die In-vitro-Untersuchungen zu etablieren, wurde an drei Schafen der intradiskale Druck (IDP) über je 24 Stunden gemessen. Der gesamte Datenpool des ersten Schafes wurde in eine Aktivitäts- und Erholungsphase unterteilt und ex vivo aus den IDP-Durchschnittswerten beider Phasen die entsprechenden axialen Kompressionskräfte abgeleitet. In vitro wurde ein Kriech-Relaxations-Test an 36 ovinen lumbalen Bewegungssegmenten durchgeführt. Die Segmente wurden drei Belastungszyklen ausgesetzt, die jeweils aus einer 15-minütigen Belastungsphase (130 N) und einer 30-minütigen Erholungsphase (58 N) bestanden. IDP-Verlauf und Höhenverlust der Segmente wurden in sechs verschiedenen Versuchsgruppen untersucht: (i) INTAKT; (ii) DEF-AN: Eine schräge Anulusinzision. Der Defekt wurde durch Naht und Cyanoacrylatkleber verschlossen. (iii) DEF-NUK_{n+k}: Nukleusgewebe wurde entfernt und anschließend reimplantiert. Der Anulusverschluss erfolgte wie in DEF-AN. (iv) DEF-NUK_p: Entsprechend dem Vorgehen in Testgruppe DEF-NUK_{n+k} wurde der Nukleus entfernt und reimplantiert. Um eine Volumenverdrängung reimplantierten Gewebes in den inneren Anulusdefekt zu vermeiden, erfolgte der Verschluss mittels eines Plugs. Abschließend wurden zwei Hydrogele als Nukleusersatz untersucht: (v) DDAHA und (vi) iGG-MA. Zur besseren Interpretation der In-vitro-Ergebnisse wurden Finite-Elemente-Analysen an einem Bandscheibenmodell durchgeführt.

In vivo lag der Bandscheibendruck beim Schaf nahezu konstant höher als beim Menschen. Niedrigste Druckwerte wurden intraoperativ mit $\sim 0,5$ MPa ermittelt. Höchste Druckwerte wurden für Aufstehen oder Drehen mit 3,6 bzw. 2,6 MPa gemessen und waren damit ungefähr zwei- bis viermal höher in der ovinen Bandscheibe. Die IDP-Mittelwerte der Aktivitäts- und Erholungsphasen des ersten Schafes lagen bei $\sim 0,75$ bzw. $\sim 0,5$ MPa, welche axialen Kompressionskräften von 130 bzw. 58 N entsprachen. Im Kriech-Relaxations-Test hatte ein isolierter Anulusdefekt (DEF-AN) keinen Einfluss auf Höhenverlust und IDP der Segmente. DEF-NUK_{n+k}, DEF-NUK_p, DDAHA und iGG-MA hingegen steigerten den Höhenverlust und verringerten signifikant den IDP im Vergleich zu INTAKT. Die Modellvorhersagen belegten erhebliche Auswirkungen eines reduzierten Wassergehalts, Kompressionsmoduls und osmotischen Potentials des reimplantierten Gewebes auf den Höhenverlust und IDP des Segmentes. Die Lastübertragung innerhalb der Bandscheibe veränderte sich hierdurch deutlich und ging mit einer erhöhten Belastung des Anulus einher.

Die vergleichsweise hohen Bandscheibendrucke des Schafes stehen der weit verbreiteten Meinung gegenüber, dass aufgrund der horizontal ausgerichteten Wirbelsäule des Vierbeiners, intradiskale Lasten geringer sein müssten als beim Menschen. In Kenntnis der vorliegenden Untersuchungen sollte die Rechtfertigung bzw. der Ausschluss des Schafes als Modell im Bereich der Wirbelsäule nicht auf Unterschieden im Gang begründet werden, sondern auf mechanischen Überlegungen bzgl. künftiger Einsatzgebiete. Die In-vitro-Ergebnisse zeigen, dass der Erfolg von Hydrogelen als Nukleusersatz nicht nur vom Ersatzmaterial selbst abhängt, sondern auch von der Wiederherstellung zerstörter Bandscheibenstrukturen, wie der Grenzflächen zwischen Nukleus und Umgebung sowie dem gesetzten Anulusdefekt.

Die vorliegende Dissertation konnte die Bedeutung iatrogen induzierter struktureller Schädigungen der Bandscheibe für Nukleusersatzstrategien herausarbeiten und stellt somit wesentliche Anforderungskriterien an das zukünftige Designkonzept von Hydrogelen als Nukleusersatz für Tissue engineering Strategien an der Bandscheibe. Hydrogele, die allein das mechanische Verhalten des Nukleus imitieren, können ansonsten bei der Wiederherstellung der Mechanik des Gesamtsegmentes versagen.

6 Summary

Discogenic low back pain represents a major health disorder in the musculoskeletal field. Innovative therapeutic approaches aim to regenerate the painfully degenerated disc by restoring its original structure. Surgical procedures like nucleotomy, however, which are necessary for the application of such therapeutic concepts, however, perturb the mechanical competence of the disc. It has not been fully clarified whether biomaterials for nucleus replacement are able to compensate for this. Therefore, a combined experimental approach of *in vivo*, *ex vivo*, *in vitro* and *in silico* studies was carried out to evaluate the efficiency of newly developed hydrogels for nucleus replacement in an ovine disc model and to characterize the sheep as an animal model in intervertebral disc research.

To establish a physiological loading protocol for the *in vitro* studies, intradiscal pressure (IDP) was measured in three sheep over 24 hours. The total data set of the first sheep was divided into an activity phase and a recovery phase, and the resulting average pressures of both phases were calculated. Subsequently, the corresponding axial forces were derived *ex vivo*. *In vitro*, a creep and recovery test was performed on 36 ovine lumbar motion segments. Specimens were subjected to three loading cycles, each consisting of a loading period of 15 minutes at 130 N and a recovery period of 30 minutes at 58 N. IDP and segment height loss were investigated in six different test groups: (i) INTACT; (ii) DEF-ANN: A small oblique incision in the annulus. The defect was closed by suturing and with cyanoacrylate glue. (iii) DEF-NUC_{s+g}: Nucleus tissue was removed and subsequently re-implanted. The annulus defect was closed as in DEF-ANN. (iv) DEF-NUC_p: As in DEF-NUC_{s+g}, the nucleus tissue was removed and re-implanted. To avoid squeezing of nucleus tissue into the inner annulus defect, sealant was applied using a plug. Finally, two hydrogels were investigated as nucleus replacements: (v) DDAHA and (vi) iGG-MA. To better interpret ambiguous results obtained *in vitro*, finite element analyses were conducted on a disc model.

In vivo, ovine IDPs were almost consistently higher than the human. The lowest IDPs were measured intra-operatively with ~0.5 MPa. The highest IDPs were found for standing up or turning around, where IDPs were with 3.6 MPa and 2.6 MPa, respectively, approximately two to four times higher within the ovine disc in

comparison to humans. In the creep and recovery test, an isolated annulus incision (DEF-ANN) did not affect segmental height-loss or fluid pressurization. DEF-NUC_{s+g}, DEF-NUC_p, DDAHA and iGG-MA increased the height loss and decreased the fluid pressurization compared with INTACT. Model predictions demonstrated substantial effects of reductions in replaced nucleus water content, bulk modulus and osmotic potential on disc height loss and pressure similar to the experimental measurements. For these events in the model, the compression load transfer in the disc was markedly altered by substantially increasing the load on the annulus when compared with the nucleus.

The finding of comparably high ovine IDPs *in vivo* conflicts with the widespread belief that, due to the horizontally aligned spine of quadrupeds, intradiscal loads should be less than in the upright positioned spine of humans. Given the sometimes multiple higher load amplitudes within the ovine disc combined with comparably low axial external forces, current results suggest that the justification of using sheep for spinal research questions should not be primarily based on differences in gait, but rather on mechanical considerations regarding the scientific field of application. *In vitro* results reveal that the success of hydrogels for nucleus replacement is not only dependent on the implant material itself but also on the restoration of the environment perturbed during surgery. The importance of the interface between the nucleus and its surrounding structures and the relevance of an appropriate annulus closure to avoid a displacement of implant material into the inner annulus defect are clearly indicated. By emphasizing the importance of surgically induced structural damages to the intervertebral disc, the present PhD thesis prescribes essential requirements for future design concepts for hydrogels as nucleus replacements for tissue engineering strategies of the intervertebral disc. Hydrogels that mimic the mechanical behavior of the native nucleus alone may otherwise fail in restoring the mechanical competence of the disc.

7 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1: Die Bandscheibe und ihre Kompartimente in Detailansicht: 1-Nukleus: a) Kollagenfasernetzwerk im rasterelektronenmikroskopischen Bild (Aladin et al., 2010) und b) Nukleus pulposus Zelle im histologischen Bild (Roberts et al., 2006). 2-Übergangsbereich zwischen Nukleus und knorpeliger Deckplatte: c) Detailvergrößerung der Faserinsertionen des Nukleus im Deckplattenknorpel (Wade et al., 2012 b). 3-Anulus: d) intralamelläre Kollagenfaseranordnung, e) interlamelläre Elastinfasern („cross bridges“) (Smith and Fazzalari, 2009) und f) fibroblastenartig langgestreckte Zellen im Anulus (Roberts et al., 2006). 4-Übergangsbereich zwischen Nukleus und Anulus: g) Faserinterdigitationen zur festen Verankerung zwischen Nukleus und Anulus (Wade et al., 2012 b).

Abb. 1.2: Diffusionswege und Solutkonzentrationen in der Bandscheibe. Die Nährstoffversorgung und Entfernung der Stoffwechselmetabolite der Bandscheibe erfolgen überwiegend über die Grund- und Deckplatten des Wirbelkörpers. Zu einem geringeren Anteil wird die Nährstoffversorgung über die Anulusperipherie sichergestellt. Die langen Diffusionswege resultieren in einer kritischen Versorgungslage der Bandscheibenzellen mit einem hohen Laktat- bei gleichzeitig niedrigem Sauerstoff- und Glukosegehalt im Zentrum der Bandscheibe (aus Urban et al, 2004)

Abb. 1.3: Der intrinsische Bandscheibendruck. a) Selbst im Ruhezustand steht die Bandscheibe unter einem hydrostatischen Druck (bildlich dargestellt durch die Figur), der die angrenzenden Wirbelkörper auseinanderdrängt und die zirkulären Anulusfasern unter eine diskrete, radiär gerichtete Zugspannung stellt (modifiziert nach Cailliet, 2004). Die molekulare Grundlage hierfür bildet der in der Nukleusgrundsubstanz befindliche hohe Gehalt an Proteoglykanen und die daran gebundene hohe Dichte negativer Ladungen, die die Attraktivität des Nukleus für Wassermoleküle bedingen und so einen hohen osmotischen Druckgradienten aufbauen (b, modifiziert nach Jackson et al., 2009).

Abb. 1.4: Mechanische Konvektion der Bandscheibe. a) Unter Belastung (dicke rote Pfeile) verliert die Bandscheibe Wasser (grüne Pfeile) über die Grund- und Deckplatten sowie den Anulus fibrosus. Dieser Flüssigkeitsverlust geht mit einer Höhenabnahme des Zwischenwirbelraumes einher. b) Unter Entlastung (dünne rote Pfeile) gewinnt die Bandscheibe verlorene Flüssigkeit zurück und die Bandscheibe richtet sich wieder auf (modifiziert nach Schünke et al., 2005).

Abb. 1.5: Kriechverhalten der Bandscheibe. Unter statischer sowie dynamischer Belastung verliert die Bandscheibe über den Tag hinweg über den eintretenden Wasserverlust an Höhe. Dieser Höhenverlust folgt einem nichtlinearen Verlauf. Die Deformation der Bandscheibe ist somit zu Beginn der Lastapplikation am größten, wird mit der Zeit zunehmend geringer und nähert sich einem Gleichgewichtszustand (modifiziert nach Koeller et al., 1986).

Abb. 1.6: Die 4 Grade der Bandscheibendegeneration (BSD) im laterolateralen Röntgenbild (links) und Gefrierschnitt post mortem (rechts) nach Wilke et al.,

2006. a, b) gesunde Bandscheibe eines 37 jährigen. c, d) Milde BSD einer 49 jährigen mit beginnender Dehydratation und Höhenabnahme des Zwischenwirbelraumes. e, f) mittelgradige BSD eines 88 jährigen mit Deckplattenschädigung, Gefäßeinsprossung und Fissurenbildung sowie beginnender Kalzifizierung des Zwischenwirbelraumes. g, h) hochgradige BSD einer 89 jährigen mit kollabierter Bandscheibenhöhe und deutlich fortgeschrittener knöcherner Überbrückung des Zwischenwirbelraumes.

Abb. 1.7 Multikausalität der Bandscheibendegeneration (aus Hadjipavlou et al., 2008).

Abb. 1.8: Knöcherne Deckplatte eines humanen Wirbelkörpers. Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der Kontaktöffnungen zwischen Knochenmarksräum und Bandscheibe einer a) gesunden und b) kalzifizierten Deckplatte (aus Benneker et al., 2005).

Abb. 1.9: Fusion. Auswahl verschiedener Cage-Implantate (oben) und zeitlicher Verlauf der Fusion im Bandscheibensegment L4-L5 (unten) in einem Patienten mit Ausbildung von Degenerationserscheinungen im Nachbarsegment (Kreis) des fusionierten Bandscheibenfaches (aus Cheh et al., 2007; Williams et al., 2005).

Abb. 1.10: Bewegungserhaltende Bandscheibenimplantate. a) Auswahl verschiedener Implantatdesigns (Serhan et al., 2011). b) Röntgenkontrolle des korrekten Sitzes einer Bandscheibenprothese (Harrop et al., 2008) und c) eines Implantatversagens mit Dislokation des Prothesenkernes aus dem implantierten Bandscheibenfach. d) Frontalansicht auf ein bewegungserhaltendes Bandscheibenimplantat mit frakturiertem Polyethylenkern in toto (c,d aus Taksali et al., 2004) und e) Aufsicht auf eine isolierte Polyethylenkomponente mit Randläsion nach einer Implantationszeit von 6,5 Jahren (Kurtz et al., 2007).

Abb. 1.11: Konzept des Tissue Engineering. Die Grundlagen des TE basieren darauf, dem Körper eine biologische Ersatzmatrix zur Verfügung zu stellen, anhand derer sich neues Gewebe ausbilden kann. Hierzu werden Zellen aus dem Körper isoliert (a), in vitro zunächst in 2D kultiviert (b) und anschließend eine biologische Matrix mit den Zellen besiedelt (c). Mit oder ohne die Kombination von wachstumsmodifizierenden Komponenten (Wachstumsfaktoren, Nanopartikel usw.) bildet sich ein Gewebersatz aus (d), der in den Patienten implantiert werden kann (e, modifiziert nach Dvir et al., 2011).

Tabelle 2.1: Angaben zu den Versuchstieren.

Abb. 2.1: Messelektronik. a) Verwendeter Messsensor zur intradiskalen Druckmessung. Die makroskopische (b) als auch die schematische Nahaufnahme (c) zeigen den stahlummantelten Sensorkopf inklusive der Aussparung für die druckempfindliche Membran.

Abb. 2.2: Topografische Anatomie und Operationssitus des Schafes nach retroperitonealem Zugang zur Lendenwirbelsäule (Schnittführung in rot). Ansicht

von a) lateral links und b) kaudal auf den abdominalen Querschnitt auf Höhe L2 (modifiziert nach Nickel et al., 1997).

Abb. 2.3: Vorbereitungen im Operationssaal. a) Ein Team aus drei Operateuren nahm die Implantation der Druckmesssonden vor. Um eine möglichst exakte Ausrichtung des chirurgischen Zugangs zu gewährleisten, erfolgte unmittelbar präoperativ die Lokalisierung der Zielbandscheiben der Lendenwirbelsäule mittels C-Bogen. b) Röntgenologische Darstellung des kranialen Lendenwirbelsäulenabschnittes. c) Instrumententische.

Abb. 2.4: Schrittweiser Ablauf des retroperitonealen Zuganges zur Lendenwirbelsäule des Schafes. a), c), e) Schematische Darstellung nach Baramki et al. (2000). b), d), f) Intraoperativ angefertigte Aufnahmen zur Darstellung des eröffneten Operationsgebietes.

Abb. 2.5: Implantation der Druckmesssensoren. Operationssitus (links) bzw. röntgenologische Darstellung (rechts) der Sensorpositionierung im Verlauf. a), b) Punktion des Bandscheibenfaches L2-L3 mittels Kirschnerdraht. c), d) Platzierung der Hohlhülse und anschließende e), f) Positionierung des Sensors im Zentrum des Nucleus pulposus.

Abb. 2.6: Durchführung der In-vivo-Messungen. a) Mit Messelektronik instrumentiertes Versuchstier und b) experimenteller Versuchsaufbau im Stall zur Überwachung und Aufzeichnung der Messergebnisse.

Abb. 2.7: Vorbereitungen zur Durchführung der Ex-vivo-Messungen. a) Makroskopisches Erscheinungsbild des Bewegungssegmentes L2-L3 im Anschluss an den Präparationsprozess und b) röntgenologische Verifikation der korrekten Sensorposition im Zentrum der Bandscheibe nach Tötung eines Tieres des In-vivo-Versuches.

Abb. 2.8: Lastprotokoll. Darstellung des experimentellen Test-Setups mit eingespanntem ovinen Bewegungssegment in einer servohydraulischen Materialprüfmaschine (Foto) und des applizierten Lastprotokolls bestehend aus einer Präkonditionierungsphase (hellgrau hinterlegt) und dem zur Auswertung herangezogenen dritten Zyklus.

Tabelle 2.2: Gruppeneinteilung der Schafspräparate für die biomechanischen Untersuchungen und Mengenangabe des entnommenen und reimplantierten Nucleus pulposus (NP) bzw. des injizierten Hydrogels.

Abb. 2.9: Verschlussstechniken des Anulusdefekts. a) Instrumentiertes Bewegungssegment der Testgruppe DEF-NUK_{n+k}. Eintrittspforte des Sensors aus der Bandscheibe (rechts) und mittels Naht und Kleber verschlossener Anulusdefekt (links) an einem in PMMA eingebetteten Präparat. Abweichend die Verschlussstechnik durch Einbringen eines Polyurethan-Plugs der Testgruppe DEF-NUK_p im schematischen (b) und makroskopischen (c) Bandscheibenquerschnitt.

Abb. 2.10: Hydrogel. Makroskopisches Erscheinungsbild des Hydrogels DDAHA a) während und b) nach Injektion.

Abb. 2.11: Lastprotokolle der durchgeführten mechanischen Untersuchungen. a) Steifigkeitstest. Aus dem dritten Zyklus des Lastprotokolls (oben) resultierte der dargestellte Kraft-/ Deformationsgraph (unten). Steifigkeiten der Kraftintervalle k_u , k_m und k_l wurden aus der Steigung des abfallenden Hystereseastes (schwarz) berechnet. b) Lastprotokoll des Kriech-Relaxations-Tests. Drei Zyklen im Wechsel aus 15-minütiger Tages- und 30-minütiger Nachlast wurden appliziert. Die In-vitro-Lasten von 130 bzw. 58 N leiteten sich aus den In-vivo-/ Ex-vivo-Messungen ab.

Abb. 2.12: In-silico-Untersuchungen. a) Das verwendete biphasische, in der Sagittal- sowohl Transversalebene symmetrische Modell L4-L5 einer humanen Bandscheibe besteht aus den Kompartimenten Nukleus pulposus, innerer und äußerer Anulus fibrosus, knorpeliger und knöcherner Deckplatten, sowie Teilen der angrenzenden Spongiosa. b) Das applizierte Lastprotokoll der In-silico-Untersuchungen entsprach, angesehen von den Beträgen der applizierten Kompressionslasten, dem der In-vitro-Untersuchungen und bestand aus drei wiederkehrenden Zyklen wechselnder Be- und Entlastungsphasen. 500 und 100 N wurden gewählt, um das humane FE-Modell mit physiologischen Lasten des Menschen zu speisen.

Abb. 3.1: Häufigkeitsverteilung der Messergebnisse. Die Häufigkeiten der IDP-Werte der 24-stündigen Druckmessungen wurden insgesamt und unterteilt in Erholungs- und Aktivitätsphasen für jedes Schaf in einem Histogramm aufgetragen. Die hieraus abgeleiteten Mittelwerte der beiden Phasen von Schaf 1 dienten der Ermittlung der axialen Kompressionslasten des anschließenden In-vitro-Tests.

Abb. 3.2: Ermittlung physiologischer Kompressionskräfte während Aktivitäts- und Ruhephasen. Den für Schaf 1 in vivo errechneten Mittelwerten für die Erholungs- bzw. Aktivitätsphasen in Höhe von 0,5 bzw. 0,75 MPa (oben) konnten ex vivo (unten) anhand der linearen Korrelation zwischen IDP und applizierter Kompressionskraft, axiale Lasten von 58 bzw. 130 N zugeordnet werden.

Abb. 3.3: Segmentsteifigkeiten. Darstellung von Median und Ranges der innerhalb der Kraftintervalle k_u , k_m und k_l ermittelten Steifigkeiten der Präparate. Die Zahlenwerte repräsentieren signifikante Unterschiede zwischen den Testgruppen (Signifikanzniveau: $p < 0,05$).

Abb. 3.4: Höhenverlust während des Kriech-Relaxations-Tests. Höhenverlust der unterschiedlichen Testgruppen im Zeitverlauf. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen des 2. und 3. Zyklus jeweils bezogen auf den Wert am Ende des 1. Zyklus.

Abb. 3.5: Kriech- und Relaxationsphasen. Isoliertes Verformungsverhalten der unterschiedlichen Testgruppen während des Kriechens und der Relaxation. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen des 2. und 3. Zyklus jeweils bezogen auf den Wert am Beginn der Kriech- bzw. Relaxationsphase. Die

Zahlenwerte repräsentieren signifikante Unterschiede zwischen den Testgruppen (Signifikanzniveau: $p < 0,05$).

Abb. 3.6: Intradiskaler Druck im Zeitverlauf. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen des 2. und 3. Zyklus. Die Zahlenwerte repräsentieren signifikante Unterschiede zwischen den Testgruppen (Signifikanzniveau: $p < 0,05$).

Abb. 3.7: Einfluss des Reimplantationsvolumens im FE-Modell. Zeitabhängiger Verlauf des Höhenverlusts (links) und des intradiskalen Drucks (rechts) bei vollständigem (DEF-NUK100_{FE-block}) bzw. 98%igem Reimplantationsvolumen (DEF-NUK98_{FE-block}).

Abb. 3.8: Einfluss diverser Materialparameter im FE-Modell. Zeitabhängiger Verlauf des Höhenverlusts (links) und des intradiskalen Drucks (rechts) nach Reduktion des osmotischen Potentials (OP90_{FE-block}), des Wassergehalts (WG80_{FE-block}) und des Kompressionsmoduls (K75_{FE-block}).

Abb. 3.9: Kraftfluss im FE-Modell. Zeitabhängiger Verlauf der Lastüberleitung über den Nukleus (links) bzw. den Anulus (rechts) bei vollständigem (DEF-NUK100_{FE-block}) bzw. 98%igem Reimplantationsvolumen (DEF-NUK98_{FE-block}) nach Einleitung der Kompressionslasten von 500 N (Belastungsphase) bzw. 100 N (Entlastungsphase). Kompressionsbelastungen des Nukleus pulposus und der Anulusgrundsubstanz sind in den Diagrammen positiv, Zugbelastungen in den Anulusfasern negativ dargestellt.

Abb. 3.10: Kraftfluss im FE-Modell. Zeitabhängiger Verlauf der Lastüberleitung über den Nukleus (links) bzw. den Anulus (rechts) nach Reduktion des osmotischen Potentials (OP90_{FE-block}), des Wassergehalts (WG80_{FE-block}) und des Elastizitätsmoduls (K75_{FE-block}) nach Einleitung der Kompressionslasten von 500 N (Belastungsphase) bzw. 100 N (Entlastungsphase). Kompressionsbelastungen des Nukleus pulposus und der Anulusgrundsubstanz sind in den Diagrammen positiv, Zugbelastungen in den Anulusfasern negativ dargestellt.

Abb. 3.11: Vergleich der intradiskalen Drücke zwischen L2-L3 und L4-L5 für Schaf Nr. 3. Für die unterschiedlichen statischen und dynamischen Aktivitäten des Tieres konnten bis auf Liegen-intraoperativ keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Bandscheibenfächern ermittelt werden. Dargestellt sind der Median und die Ranges des IDP zu sechs unterschiedlichen über die gesamte Messdauer verteilten Zeitpunkten. Den Ergebnissen für Drehen liegt nur das Ergebnis eines Zeitpunktes zugrunde.

Abb. 3.12: Repräsentative Darstellung des intradiskalen Druckverlaufes während statischer Aktivitäten. Während unterschiedlicher Liege- (a) als auch Standphasen (b) war die Abhängigkeit des IDP vom Hydratationszustand und Belastungsausmaß der Bandscheiben im Tagesverlauf zu erkennen. Intraoperatives Liegen (Liegen 1) verursachte gegenüber unmittelbar postoperativem Liegen (Liegen 2) einen geringeren IDP, während Stehen zu Beginn des 24-stündigen Testzeitraumes (Stehen 1) einen höheren IDP als Stehen 2 nach einer ausgedehnten Aktivitätsphase des Schafes bewirkte. Die atmungsabhängige

Druckdifferenz war mit 0,08 MPa intraoperativ deutlich geringer als postoperativ und zeigte deutlich die atemdepressive Wirkung der Medikamente.

Abb. 3.13: Intradiskaler Druck im Bandscheibenfach L2-L3 der drei Versuchstiere während unterschiedlichen statischer und dynamischer Aktivitäten. Dargestellt sind der Median und die Ranges des IDP zu jeweils sechs unterschiedlichen über den Messzeitraum verteilten Zeitpunkten.

Abb. 3.14: Repräsentativer Verlauf des intradiskalen Druckes. Dargestellt sind eine 3-stündige Aktivitäts- und eine 1-stündige Erholungsphase im Bandscheibenfach L2-L3 des Schafes Nr.3.

Abb. 3.15: Ermittlung physiologischer Kompressionskräfte. Anhand der linearen Korrelationen zwischen IDP und applizierter Kompressionskraft konnte jedem der in vivo gemessenen IDP-Werte die entsprechende axiale Last zugeordnet werden.

Abb. 3.16: Ex vivo abgeleitete Kompressionskräfte. Anhand der ex vivo ermittelten linearen Druck- / Kraft- Regressionsgeraden wurden den in vivo gemessenen IDP-Werten (Median transparent hinterlegt) die dafür notwendigen axialen Kräfte zugeordnet. Dargestellt sind der Median und die Ranges der axial applizierten Kompressionskräfte der drei Schafe während unterschiedlicher Aktivitäten.

Abb. 4.1: Sagittalschnitte der Bandscheiben von Mensch, Schaf, Schwein und Kalb. Deutlich erkennbar sind Unterschiede in der Größe und dem morphologischen Erscheinungsbild der Bandscheiben des Menschen und verschiedener gängiger Großtiermodelle im Bereich der experimentellen Wirbelsäulenforschung (Maßstabskala 10 mm).

Abb. 4.2: Intradiskale Drücke in vivo beim Schaf (L2-L3) und beim Menschen (L4-L5). Im Vergleich zu humanen Messungen von Wilke et al. (1999) und Nachemson und Elfström (1970) liegen die intradiskalen Drücke des Schafes durchwegs höher.

Abb. 4.3: Vergleich der In-vivo-Belastungen der Bandscheiben von Schaf und Mensch. a) Die durchschnittliche Belastung des Schafes (dargestellt repräsentativ für Schaf 1) während Aktivphasen liegt mit ca. 0,75 MPa in derselben Größenordnung wie die beim Menschen im Tagesverlauf gemessenen und berechneten Werte (b, Schmidt and Reitmaier, in press).

Abb. 4.4: Wirbelsäule des Vierbeiners. Die Aufhängung der horizontalen Wirbelsäule des Vierbeiners (a) in einem kyphotischen Bogen (rot) zwischen den Vorder- und Hintergliedmaßen (grün) weist Ähnlichkeiten zur statischen Konstruktion einer Brücke (b) auf, bei der der Brückenbogen (rot) zwischen den Tragpfeilern (grün) verspannt ist. Die langen Dornfortsätze der Wirbelkörper des Vierbeiners (Bild oben) bieten dabei vergleichbar den Tragseilen der Brücke einer Vielzahl an stabilisierenden Band- / Sehnen- und Muskelsträngen Ansatz (modifiziert nach a) Nickel et al., 1997 und b) <http://farm5.static.flickr.com>).

Abb. 4.5: Gangbild Mensch / Vierbeiner. Der aufrechte Gang des Menschen (a, aus www.fairmed.at) und der dadurch resultierende axiale Belastungsmodus (Pfeil) der humanen Wirbelsäule spiegelt sich in der Ausrichtung der Trabekel des Wirbelkörpers von kranial nach kaudal (weiße Linien im Wirbelkörper, Quelle: UFB) wieder. Vergleichbar der Situation an der humanen Wirbelsäule liefert die gleichgerichtete (kraniokaudale) Trabelorientierung der Wirbelkörper des Tieres Hinweise auf einen ebenfalls axialen Kraftfluss entlang der Wirbelsäule des Vierbeiners (b, Schafsskelett aus Nickel et al., 1997; Wirbelkörper des Vierbeiners aus Smit, 2002). Unterschiede in der Knochendichte der beiden Wirbelkörper lassen eine erhöhte mechanische Belastung der Vierbeinerwirbelsäule vermuten.

Abb. 4.6: Zusammenhang zwischen Anatomie und Mechanik an der Wirbelsäule. Berechnungen zufolge nimmt die Widerstandsfähigkeit (R) eines geraden Achsenstabes (a) mit konsekutiver Steigerung der Anzahl seiner Krümmungen (N, b-d) zu. Die Anzahl der Krümmungen fließt dabei im Quadrat in die Berechnung der Widerstandsfähigkeit ein (nach Kapandji, 1992).

Abb. 4.7: Gewebsverbund innerhalb der ovinen Bandscheibe. a) Obwohl sich die einzelnen Kompartimente der Bandscheibe sowohl funktionell als auch morphologisch voneinander abgrenzen lassen, ist an den Übergangsbereichen zwischen den Kompartimenten Nukleus (N), Anulus (A) und Deckplatte (D) eine innige Integration zwischen benachbarten Strukturen gegeben. Dies ist am Bandscheibenpräparat nach Entfernung des Anulus bereits zu vermuten (b), als auch in der mikroskopischen Detailaufnahme (jeweils links) für die Übergangsbereiche zwischen Anulus und Nukleus (c) als auch Nukleus und Deckplatte (d) zu verzeichnen. Die schematischen Abbildungen (c,d, jeweils rechts) stellen eine mögliche Art der Faserinsertion zwischen benachbarten Kompartimenten dar (modifiziert nach Wade et al., 2012 b).

Abb. 4.8: Transversalschnitt durch die Bandscheibe mit reimplantiertem Nukleusgewebe (DEF-NUK). Im Anschluss an den Kompressionstest zeigte sich eine Verschiebung des reimplantierten Nukleusgewebes bis unter die äußeren Anuluslamellen in Testgruppe DEF-NUK_{n+k}, die mittels Naht und Kleber verschlossen wurde (a,b). Durch Einbringen des Plug (DEF-NUK_p) konnte diese Volumenverdrängung verhindert und so eine dichtere Reimplantation des fragmentierten Nukleusgewebes erreicht werden (c).

8 Literaturverzeichnis

- Accadbled, F., Laffosse, J.M., Ambard, D., Gomez-Bouchet, A., de Gauzy, J.S., Swider, P., 2008. Influence of location, fluid flow direction, and tissue maturity on the macroscopic permeability of vertebral end plates. *Spine* 33, 612-619.
- Adams, M.A., Dolan, P., Hutton, W.C., 1986. The stages of disc degeneration as revealed by discograms. *The Journal of bone and joint surgery. British volume* 68, 36-41.
- Adams, M.A., Freeman, B.J., Morrison, H.P., Nelson, I.W., Dolan, P., 2000. Mechanical initiation of intervertebral disc degeneration. *Spine* 25, 1625-1636.
- Adams, M.A., Hutton, W.C., 1980. The effect of posture on the role of the apophysial joints in resisting intervertebral compressive forces. *J Bone Joint Surg Br* 62, 358-362.
- Adams, M.A., Roughley, P.J., 2006. What is intervertebral disc degeneration, and what causes it? *Spine* 31, 2151-2161.
- Ahlgren, B.D., Vasavada, A., Brower, R.S., Lydon, C., Herkowitz, H.N., Panjabi, M.M., 1994. Anular incision technique on the strength and multidirectional flexibility of the healing intervertebral disc. *Spine* 19, 948-954.
- Ahmed, T.A., Dare, E.V., Hincke, M., 2008. Fibrin: a versatile scaffold for tissue engineering applications. *Tissue Eng Part B Rev* 14, 199-215.
- Ahrens, M., Tsantrizos, A., Donkersloot, P., Martens, F., Lauweryns, P., Le Huec, J.C., Moszko, S., Fekete, Z., Sherman, J., Yuan, H.A., Halm, H., 2009. Nucleus replacement with the DASCOR disc arthroplasty device: interim two-year efficacy and safety results from two prospective, non-randomized multicenter European studies. *Spine (Phila Pa 1976)* 34, 1376-1384.
- Aladin, D.M., Cheung, K.M., Ngan, A.H., Chan, D., Leung, V.Y., Lim, C.T., Luk, K.D., Lu, W.W., 2010. Nanostructure of collagen fibrils in human nucleus pulposus and its correlation with macroscale tissue mechanics. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* 28, 497-502.
- Alini, M., Eisenstein, S.M., Ito, K., Little, C., Kettler, A.A., Masuda, K., Melrose, J., Ralphs, J., Stokes, I., Wilke, H.J., 2008. Are animal models useful for studying human disc disorders/degeneration? *Eur Spine J* 17, 2-19.
- Allen, M.J., Schoonmaker, J.E., Bauer, T.W., Williams, P.F., Higham, P.A., Yuan, H.A., 2004. Preclinical evaluation of a poly (vinyl alcohol) hydrogel implant as a replacement for the nucleus pulposus. *Spine* 29, 515-523.
- Amin, S., Rajabnezhad, S., Kohli, K., 2009. Hydrogels as potential drug delivery systems. *Sci Res Essays* 4, 1175-1183.

- Andersson, G.B., 1985. Posture and compressive spine loading: intradiscal pressures, trunk myoelectric activities, intra-abdominal pressures, and biochemical analyses. *Ergonomics* 28, 91-93.
- Andersson, G.B., 1999. Epidemiological features of chronic low-back pain. *Lancet* 354, 581-585.
- Antoniou, J., Steffen, T., Nelson, F., Winterbottom, N., Hollander, A.P., Poole, R.A., Aebi, M., Alini, M., 1996. The human lumbar intervertebral disc: evidence for changes in the biosynthesis and denaturation of the extracellular matrix with growth, maturation, ageing, and degeneration. *J Clin Invest* 98, 996-1003.
- Argyris, J., 1954. Energy Theorems and Structural Analysis. *Aircraft Engineering* 26, 308-310.
- Arthur, A., Cannella, M., Keane, M., Singhatat, W., Vresilovic, E., Marcolongo, M., 2010. Fill of the nucleus cavity affects mechanical stability in compression, bending, and torsion of a spine segment, which has undergone nucleus replacement. *Spine* 35, 1128-1135.
- Ashburn, M.A., Staats, P.S., 1999. Management of chronic pain. *Lancet* 353, 1865-1869.
- Ayotte, D.C., Ito, K., Perren, S.M., Tepic, S., 2000. Direction-dependent constriction flow in a poroelastic solid: the intervertebral disc valve. *Journal of biomechanical engineering* 122, 587-593.
- Ayotte, D.C., Ito, K., Tepic, S., 2001. Direction-dependent resistance to flow in the endplate of the intervertebral disc: an ex vivo study. *J Orthop Res* 19, 1073-1077.
- Baer, A.E., Laursen, T.A., Guilak, F., Setton, L.A., 2003. The micromechanical environment of intervertebral disc cells determined by a finite deformation, anisotropic, and biphasic finite element model. *Journal of biomechanical engineering* 125, 1-11.
- Baramki, H.G., Papin, P., Steffen, T., 2000. A surgical approach to the ventral aspect of the lumbar vertebrae in the sheep model. *Surgical and radiologic anatomy : SRA* 22, 25-27.
- Battie, M.C., Videman, T., Gibbons, L.E., Fisher, L.D., Manninen, H., Gill, K., 1995. 1995 Volvo Award in clinical sciences. Determinants of lumbar disc degeneration. A study relating lifetime exposures and magnetic resonance imaging findings in identical twins. *Spine* 20, 2601-2612.
- Battie, M.C., Videman, T., Parent, E., 2004. Lumbar disc degeneration: epidemiology and genetic influences. *Spine (Phila Pa 1976)* 29, 2679-2690.
- Bayliss, M.T., Johnstone, B., O'Brien, J.P., 1988. 1988 Volvo award in basic science. Proteoglycan synthesis in the human intervertebral disc. Variation with age, region and pathology. *Spine* 13, 972-981.

Becker, A., Chenot, J.F., Niebling, W., Kochen, M.M., 2004. [Guidelines for back pain]. *Zeitschrift für Orthopädie und ihre Grenzgebiete* 142, 716-719.

Beckstein, J.C., Sen, S., Schaer, T.P., Vresilovic, E.J., Elliott, D.M., 2008. Comparison of animal discs used in disc research to human lumbar disc: axial compression mechanics and glycosaminoglycan content. *Spine* 33, E166-173.

Benneker, L.M., Gisev, A., Krebs, J., Boger, A., Heini, P.F., Boner, V., 2012. Development of an in vivo experimental model for percutaneous vertebroplasty in sheep. *Veterinary and comparative orthopaedics and traumatology : V.C.O.T* 25, 173-177.

Benneker, L.M., Heini, P.F., Alini, M., Anderson, S.E., Ito, K., 2005. 2004 Young Investigator Award Winner: vertebral endplate marrow contact channel occlusions and intervertebral disc degeneration. *Spine* 30, 167-173.

Berlemann, U., Schwarzenbach, O., 2009. An injectable nucleus replacement as an adjunct to microdiscectomy: 2 year follow-up in a pilot clinical study. *European spine journal : official publication of the European Spine Society, the European Spinal Deformity Society, and the European Section of the Cervical Spine Research Society* 18, 1706-1712.

Bernick, S., Cailliet, R., 1982. Vertebral end-plate changes with aging of human vertebrae. *Spine* 7, 97-102.

Boelen, E.J., van Hooy-Corstjens, C.S., Bulstra, S.K., van Ooij, A., van Rhijn, L.W., Koole, L.H., 2005. Intrinsically radiopaque hydrogels for nucleus pulposus replacement. *Biomaterials* 26, 6674-6683.

Bolten, W., Kempel-Waibel, A., Pforringer, W., 1998. [Analysis of the cost of illness in backache]. *Med Klin (Munich)* 93, 388-393.

Boos, N., Wallin, A., Gbedegbegnon, T., Aebi, M., Boesch, C., 1993. Quantitative MR imaging of lumbar intervertebral disks and vertebral bodies: influence of diurnal water content variations. *Radiology* 188, 351-354.

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

Borenstein, N., Chetboul, V., Rajnoch, C., Bruneval, P., Carpentier, A., 2002. Successful cellular cardiomyoplasty in canine idiopathic dilated cardiomyopathy. *Ann Thorac Surg* 74, 298-299; author reply 299.

Boyd, L.M., Carter, A.J., 2006. Injectable biomaterials and vertebral endplate treatment for repair and regeneration of the intervertebral disc. *European spine journal : official publication of the European Spine Society, the European Spinal Deformity Society, and the European Section of the Cervical Spine Research Society* 15 Suppl 3, S414-421.

Breivik, H., Collett, B., Ventafridda, V., Cohen, R., Gallacher, D., 2006. Survey of chronic pain in Europe: prevalence, impact on daily life, and treatment. *Eur J Pain* 10, 287-333.

Buckwalter, J.A., 1995. Aging and degeneration of the human intervertebral disc. *Spine* 20, 1307-1314.

Bundesministerium;für;Arbeit;und;Soziales, 2012. Sicherheit;und;Gesundheit;bei;der;Arbeit;2010;-;Unfallverhütungsbericht;2010.

Bushell, G.R., Ghosh, P., Taylor, T.F., Akeson, W.H., 1977. Proteoglycan chemistry of the intervertebral disks. *Clinical orthopaedics and related research*, 115-123.

Busscher, I., Ploegmakers, J.J., Verkerke, G.J., Veldhuizen, A.G., 2010. Comparative anatomical dimensions of the complete human and porcine spine. *European spine journal : official publication of the European Spine Society, the European Spinal Deformity Society, and the European Section of the Cervical Spine Research Society* 19, 1104-1114.

Buttermann, G.R., Beaubien, B.P., Saeger, L.C., 2009. Mature runt cow lumbar intradiscal pressures and motion segment biomechanics. *The spine journal : official journal of the North American Spine Society* 9, 105-114.

Cailliet, R., 2004. *The Illustrated Guide to Functional Anatomy of the Musculoskeletal System*. American Medical Association Press.

Calderon, L., Collin, E., Velasco-Bayon, D., Murphy, M., O'Halloran, D., Pandit, A., 2010. Type II collagen-hyaluronan hydrogel--a step towards a scaffold for intervertebral disc tissue engineering. *Eur Cell Mater* 20, 134-148.

Cappello, R., Bird, J.L., Pfeiffer, D., Bayliss, M.T., Dudhia, J., 2006. Notochordal cell produce and assemble extracellular matrix in a distinct manner, which may be responsible for the maintenance of healthy nucleus pulposus. *Spine* 31, 873-882; discussion 883.

Carragee, E.J., Don, A.S., Hurwitz, E.L., Cuellar, J.M., Carrino, J.A., Herzog, R., 2009. 2009 ISSLS Prize Winner: Does discography cause accelerated progression of degeneration changes in the lumbar disc: a ten-year matched cohort study. *Spine* 34, 2338-2345.

Chan, D., Song, Y., Sham, P., Cheung, K.M., 2006. Genetics of disc degeneration. *European spine journal : official publication of the European Spine Society, the European Spinal Deformity Society, and the European Section of the Cervical Spine Research Society* 15 Suppl 3, S317-325.

Chan, S.C., Ferguson, S.J., Gantenbein-Ritter, B., 2011. The effects of dynamic loading on the intervertebral disc. *Eur Spine J* 20, 1796-1812.

- Chan, S.C., Gantenbein-Ritter, B., 2012. Intervertebral disc regeneration or repair with biomaterials and stem cell therapy--feasible or fiction? *Swiss Med Wkly* 142, w13598.
- Cheh, G., Bridwell, K.H., Lenke, L.G., Buchowski, J.M., Daubs, M.D., Kim, Y., Baldus, C., 2007. Adjacent segment disease following lumbar/thoracolumbar fusion with pedicle screw instrumentation: a minimum 5-year follow-up. *Spine* 32, 2253-2257.
- Chenot, J.F., Becker, A., Niebling, W., Kochen, M.M., Hildebrandt, J., Pflingsten, M., Keller, S., Leonhardt, C., Basler, H.D., Donner-Banzhoff, N., Baum, E., 2003. Leitlinie Kreuzschmerzen: Wieviel Diagnostik und welche Therapien sind sinnvoll? *Z Allg Med* 79.
- Chou, R., Baisden, J., Carragee, E.J., Resnick, D.K., Shaffer, W.O., Loeser, J.D., 2009. Surgery for low back pain: a review of the evidence for an American Pain Society Clinical Practice Guideline. *Spine* 34, 1094-1109.
- Chow, D.H., Luk, K.D., Evans, J.H., Leong, J.C., 1996. Effects of short anterior lumbar interbody fusion on biomechanics of neighboring unfused segments. *Spine* 21, 549-555.
- Christensen, K., Vaupel, J.W., 1996. Determinants of longevity: genetic, environmental and medical factors. *J Intern Med* 240, 333-341.
- Claes, L., Reusch, M., Gockelmann, M., Ohnmacht, M., Wehner, T., Amling, M., Beil, F.T., Ignatius, A., 2011. Metaphyseal fracture healing follows similar biomechanical rules as diaphyseal healing. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* 29, 425-432.
- Cloyd, J.M., Elliott, D.M., 2007. Elastin content correlates with human disc degeneration in the annulus fibrosus and nucleus pulposus. *Spine* 32, 1826-1831.
- Cloyd, J.M., Malhotra, N.R., Weng, L., Chen, W., Mauck, R.L., Elliott, D.M., 2007. Material properties in unconfined compression of human nucleus pulposus, injectable hyaluronic acid-based hydrogels and tissue engineering scaffolds. *European spine journal : official publication of the European Spine Society, the European Spinal Deformity Society, and the European Section of the Cervical Spine Research Society* 16, 1892-1898.
- Coppes, M.H., Marani, E., Thomeer, R.T., Groen, G.J., 1997. Innervation of "painful" lumbar discs. *Spine* 22, 2342-2349; discussion 2349-2350.
- Courant, R., 1943. Variational methods for the solution of problems of equilibrium and vibrations. *Bull. Amer. Math. Soc.* 49.
- Coventry, M.B., Ghormley, R.K., Kernohan, J.W., 1945. The Intervertebral Disc: Its Microscopic Anatomy and Pathology Part I. Anatomy, Development, and Physiology. *The Journal of Bone & Joint Surgery* 27, 105-112.

Dahl, M.C., Ahrens, M., Sherman, J.E., Martz, E.O., 2010. The restoration of lumbar intervertebral disc load distribution: a comparison of three nucleus replacement technologies. *Spine* 35, 1445-1453.

De Puky, P., 1935. The Physiological Oscillation of the Length of the Body. *Acta Orthopaedica* 6, 338-347.

Deyo, R.A., Gray, D.T., Kreuter, W., Mirza, S., Martin, B.I., 2005. United States trends in lumbar fusion surgery for degenerative conditions. *Spine* 30, 1441-1445; discussion 1446-1447.

Duance, V.C., Crean, J.K., Sims, T.J., Avery, N., Smith, S., Menage, J., Eisenstein, S.M., Roberts, S., 1998. Changes in collagen cross-linking in degenerative disc disease and scoliosis. *Spine* 23, 2545-2551.

Dvir, T., Timko, B.P., Kohane, D.S., Langer, R., 2011. Nanotechnological strategies for engineering complex tissues. *Nat Nanotechnol* 6, 13-22.

Eisenstein, S., Roberts, S., 2003. The physiology of the disc and its clinical relevance. *The Journal of bone and joint surgery. British volume* 85, 633-636.

Elliott, D.M., Sarver, J.J., 2004. Young investigator award winner: validation of the mouse and rat disc as mechanical models of the human lumbar disc. *Spine* 29, 713-722.

Erwin, W.M., Islam, D., Inman, R.D., Fehlings, M.G., Tsui, F.W., 2011. Notochordal cells protect nucleus pulposus cells from degradation and apoptosis: implications for the mechanisms of intervertebral disc degeneration. *Arthritis Res Ther* 13, R215.

Feng, H., Danfelter, M., Stromqvist, B., Heinegard, D., 2006. Extracellular matrix in disc degeneration. *The Journal of bone and joint surgery. American volume* 88 Suppl 2, 25-29.

Ferguson, S.J., Ito, K., Nolte, L.P., 2004. Fluid flow and convective transport of solutes within the intervertebral disc. *Journal of biomechanics* 37, 213-221.

Festing, M.F., 2004. The choice of animal model and reduction. *Altern Lab Anim* 32 Suppl 2, 59-64.

Fodor, W.L., 2003. Tissue engineering and cell based therapies, from the bench to the clinic: the potential to replace, repair and regenerate. *Reprod Biol Endocrinol* 1, 102.

Frank, E.H., 1995. Percutaneous discectomy--update. *West J Med* 162, 257-258.

Freburger, J.K., Holmes, G.M., Agans, R.P., Jackman, A.M., Darter, J.D., Wallace, A.S., Castel, L.D., Kalsbeek, W.D., Carey, T.S., 2009. The rising prevalence of chronic low back pain. *Arch Intern Med* 169, 251-258.

Freeman, B.J., Davenport, J., 2006. Total disc replacement in the lumbar spine: a systematic review of the literature. *Eur Spine J* 15 Suppl 3, S439-447.

- Freemont, A.J., 2009. The cellular pathobiology of the degenerate intervertebral disc and discogenic back pain. *Rheumatology (Oxford)* 48, 5-10.
- Freemont, A.J., Peacock, T.E., Goupille, P., Hoyland, J.A., O'Brien, J., Jayson, M.I., 1997. Nerve ingrowth into diseased intervertebral disc in chronic back pain. *Lancet* 350, 178-181.
- Frei, H., Oxland, T.R., Rathonyi, G.C., Nolte, L.P., 2001. The effect of nucleotomy on lumbar spine mechanics in compression and shear loading. *Spine* 26, 2080-2089.
- Fritz, U., Niethard, J., Biberthaler, P., 1989. *Orthopädie und Unfallchirurgie*. Thieme 6. Auflage.
- Frymoyer, J.W., 1988. Back pain and sciatica. *N Engl J Med* 318, 291-300.
- Fujiwara, A., Tamai, K., An, H.S., Kurihashi, T., Lim, T.H., Yoshida, H., Saotome, K., 2000. The relationship between disc degeneration, facet joint osteoarthritis, and stability of the degenerative lumbar spine. *Journal of spinal disorders* 13, 444-450.
- Galbusera, F., Schmidt, H., Noailly, J., Malandrino, A., Lacroix, D., Wilke, H.J., Shirazi-Adl, A., in press. Comparison of four methods to simulate swelling in poroelastic finite element models of intervertebral discs, *J Mech Behav Biomed Mater*, 2011/07/26 ed, pp. 1234-1241.
- Ghosh, P., Bushell, G.R., Taylor, T.F., Akeson, W.H., 1977. Collagens, elastin and noncollagenous protein of the intervertebral disk. *Clinical orthopaedics and related research*, 124-132.
- Ghosh, P., Moore, R., Vernon-Roberts, B., Goldschlager, T., Pascoe, D., Zannettino, A., Gronthos, S., Itescu, S., 2012. Immunoselected STRO-3+ mesenchymal precursor cells and restoration of the extracellular matrix of degenerate intervertebral discs. *Journal of neurosurgery. Spine* 16, 479-488.
- Giannini, S., Buda, R., Vannini, F., Cavallo, M., Grigolo, B., 2009. One-step bone marrow-derived cell transplantation in talar osteochondral lesions. *Clinical orthopaedics and related research* 467, 3307-3320.
- Goel, V.K., Nishiyama, K., Weinstein, J.N., Liu, Y.K., 1986. Mechanical properties of lumbar spinal motion segments as affected by partial disc removal. *Spine* 11, 1008-1012.
- Griffith, L.G., 2002. Emerging design principles in biomaterials and scaffolds for tissue engineering. *Ann N Y Acad Sci* 961, 83-95.
- Grignon, B., Roland, J., 2000. Can the human intervertebral disc be compared to a diarthrodial joint? *Surgical and radiologic anatomy : SRA* 22, 101-105.
- Grob, D., 2009. [Lumbar total disc replacement]. *Der Orthopäde* 38, 93-99; quiz 100-101.

- Grunhagen, T., Shirazi-Adl, A., Fairbank, J.C., Urban, J.P., 2011. Intervertebral disk nutrition: a review of factors influencing concentrations of nutrients and metabolites. *The Orthopedic clinics of North America* 42, 465-477, vii.
- Guder, E., Hill, S., Kandziora, F., Schnake, K.J., 2009. [Partial nucleotomy of the ovine disc as an in vivo model for disc degeneration]. *Z Orthop Unfall* 147, 52-58.
- Guilak, F., Ting-Beall, H.P., Baer, A.E., Trickey, W.R., Erickson, G.R., Setton, L.A., 1999. Viscoelastic properties of intervertebral disc cells. Identification of two biomechanically distinct cell populations. *Spine* 24, 2475-2483.
- Gunzburg, R., Fraser, R.D., Moore, R., Vernon-Roberts, B., 1993. An experimental study comparing percutaneous discectomy with chemonucleolysis. *Spine* 18, 218-226.
- Gunzelmann, T., Schumacher, J., Braehler, E., 2002. [The prevalence of pain in the elderly German population: results of population-based studies with the Giessen Subjective Complaints List (Giessener Beschwerdebogen GBB)]. *Schmerz* 16, 249-254.
- Gupta, M.S., Cooper, E.S., Nicoll, S.B., 2011. Transforming growth factor-beta 3 stimulates cartilage matrix elaboration by human marrow-derived stromal cells encapsulated in photocrosslinked carboxymethylcellulose hydrogels: potential for nucleus pulposus replacement. *Tissue engineering. Part A* 17, 2903-2910.
- Hadjipavlou, A.G., Tzermiadianos, M.N., Bogduk, N., Zindrick, M.R., 2008. The pathophysiology of disc degeneration: a critical review. *The Journal of bone and joint surgery. British volume* 90, 1261-1270.
- Haefeli, M., Kalberer, F., Saegesser, D., Nerlich, A.G., Boos, N., Paesold, G., 2006. The course of macroscopic degeneration in the human lumbar intervertebral disc. *Spine* 31, 1522-1531.
- Happey, F., Johnson, A.G., Naylor, A., Turner, R.L., 1964. Preliminary Observations Concerning the Fine Structure of the Intervertebral Disc. *The Journal of bone and joint surgery. British volume* 46, 563-567.
- Harris, R.I., Macnab, I., 1954. Structural changes in the lumbar intervertebral discs; their relationship to low back pain and sciatica. *The Journal of bone and joint surgery. British volume* 36-B, 304-322.
- Harrop, J.S., Youssef, J.A., Maltenfort, M., Vorwald, P., Jabbour, P., Bono, C.M., Goldfarb, N., Vaccaro, A.R., Hilibrand, A.S., 2008. Lumbar adjacent segment degeneration and disease after arthrodesis and total disc arthroplasty. *Spine* 33, 1701-1707.
- Hauerstock, D., Reindl, R., Steffen, T., 2001. Telemetric measurement of compressive loads in the sheep lumbar spine. *Transactions of the 47th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society*.

Hemrich, K., Van de Sijpe, K., Rhodes, N.P., Hunt, J.A., Di Bartolo, C., Pallua, N., Blondeel, P., von Heimburg, D., 2008. Autologous in vivo adipose tissue engineering in hyaluronan-based gels--a pilot study. *J Surg Res* 144, 82-88.

Heuer, F., Schmidt, H., Claes, L., Wilke, H.J., 2007a. Stepwise reduction of functional spinal structures increase vertebral translation and intradiscal pressure. *Journal of biomechanics* 40, 795-803.

Heuer, F., Schmidt, H., Claes, L., Wilke, H.J., 2008a. A new laser scanning technique for imaging intervertebral disc displacement and its application to modeling nucleotomy. *Clin Biomech (Bristol, Avon)* 23, 260-269.

Heuer, F., Schmidt, H., Wilke, H.J., 2008b. The relation between intervertebral disc bulging and annular fiber associated strains for simple and complex loading. *Journal of biomechanics* 41, 1086-1094.

Heuer, F., Schmitt, H., Schmidt, H., Claes, L., Wilke, H.J., 2007b. Creep associated changes in intervertebral disc bulging obtained with a laser scanning device. *Clin Biomech (Bristol, Avon)* 22, 737-744.

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

Holm, S., 1993. Pathophysiology of disc degeneration. *Acta Orthop Scand Suppl* 251, 13-15.

Holm, S., Maroudas, A., Urban, J.P., Selstam, G., Nachemson, A., 1981. Nutrition of the intervertebral disc: solute transport and metabolism. *Connective tissue research* 8, 101-119.

Holmes, M.H., 1986. Finite deformation of soft tissue: analysis of a mixture model in uni-axial compression. *Journal of biomechanical engineering* 108, 372-381.

Horch, R.E., Kneser, U., Polykandriotis, E., Schmidt, V.J., Sun, J., Arkudas, A., 2012. Tissue engineering and regenerative medicine -where do we stand? *J Cell Mol Med* 16, 1157-1165.

Horst, M., Brinckmann, P., 1981. 1980 Volvo award in biomechanics. Measurement of the distribution of axial stress on the end-plate of the vertebral body. *Spine* 6, 217-232.

Hristova, G.I., Jarzem, P., Ouellet, J.A., Roughley, P.J., Epure, L.M., Antoniou, J., Mwale, F., 2011. Calcification in human intervertebral disc degeneration and scoliosis. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* 29, 1888-1895.

Humzah, M.D., Soames, R.W., 1988. Human intervertebral disc: structure and function. *The Anatomical record* 220, 337-356.

- Hunter, C.J., Matyas, J.R., Duncan, N.A., 2004. Cytomorphology of notochordal and chondrocytic cells from the nucleus pulposus: a species comparison. *Journal of anatomy* 205, 357-362.
- Hutton, W.C., Toribatake, Y., Elmer, W.A., Ganey, T.M., Tomita, K., Whitesides, T.E., 1998. The effect of compressive force applied to the intervertebral disc in vivo. A study of proteoglycans and collagen. *Spine* 23, 2524-2537.
- Iatridis, J.C., ap Gwynn, I., 2004. Mechanisms for mechanical damage in the intervertebral disc annulus fibrosus. *Journal of biomechanics* 37, 1165-1175.
- Iatridis, J.C., Weidenbaum, M., Setton, L.A., Mow, V.C., 1996. Is the nucleus pulposus a solid or a fluid? Mechanical behaviors of the nucleus pulposus of the human intervertebral disc. *Spine* 21, 1174-1184.
- Ikada, Y., 2006. Challenges in tissue engineering. *Journal of the Royal Society, Interface / the Royal Society* 3, 589-601.
- Inoue, N., Espinoza Orias, A.A., 2011. Biomechanics of intervertebral disk degeneration. *The Orthopedic clinics of North America* 42, 487-499, vii.
- Jackson, A., Gu, W., 2009. Transport Properties of Cartilaginous Tissues. *Curr Rheumatol Rev* 5, 40.
- Jackson, A.R., Yuan, T.Y., Huang, C.Y., Gu, W.Y., 2009. A conductivity approach to measuring fixed charge density in intervertebral disc tissue. *Annals of biomedical engineering* 37, 2566-2573.
- Johannessen, W., Vresilovic, E.J., Wright, A.C., Elliott, D.M., 2004. Intervertebral disc mechanics are restored following cyclic loading and unloaded recovery. *Annals of biomedical engineering* 32, 70-76.
- Johnson, E.F., Chetty, K., Moore, I.M., Stewart, A., Jones, W., 1982. The distribution and arrangement of elastic fibres in the intervertebral disc of the adult human. *Journal of anatomy* 135, 301-309.
- Johnson, W.E., Roberts, S., 2003. Human intervertebral disc cell morphology and cytoskeletal composition: a preliminary study of regional variations in health and disease. *Journal of anatomy* 203, 605-612.
- Kalb, S., Martirosyan, N.L., Kalani, M.Y., Broc, G.G., Theodore, N., 2012. Genetics of the degenerated intervertebral disc. *World Neurosurg* 77, 491-501.
- Kapandji, I.A., 1992. Funktionelle Anatomie der Gelenke, Band 3: Rumpf und Wirbelsäule. Enke.
- Kast, E., Antoniadis, G., Richter, H.P., 2000. [Epidemiology of disk surgery in Germany]. *Zentralbl Neurochir* 61, 22-25.

- Kepler, C.K., Anderson, D.G., Tannoury, C., Ponnappan, R.K., 2011. Intervertebral disk degeneration and emerging biologic treatments. *J Am Acad Orthop Surg* 19, 543-553.
- Kettler, A., Liakos, L., Haegele, B., Wilke, H.J., 2007. Are the spines of calf, pig and sheep suitable models for pre-clinical implant tests? *European spine journal : official publication of the European Spine Society, the European Spinal Deformity Society, and the European Section of the Cervical Spine Research Society* 16, 2186-2192.
- Kim, Y.E., Goel, V.K., Weinstein, J.N., Lim, T.H., 1991. Effect of disc degeneration at one level on the adjacent level in axial mode. *Spine* 16, 331-335.
- Kirkaldy-Willis, W.H., 1988. *Managing Low Back Pain*. New York, NY; Churchill Livingstone Inc.
- Koeller, W., Muehlhaus, S., Meier, W., Hartmann, F., 1986. Biomechanical properties of human intervertebral discs subjected to axial dynamic compression--influence of age and degeneration. *Journal of biomechanics* 19, 807-816.
- Korecki, C.L., Taboas, J.M., Tuan, R.S., Iatridis, J.C., 2010. Notochordal cell conditioned medium stimulates mesenchymal stem cell differentiation toward a young nucleus pulposus phenotype. *Stem Cell Res Ther* 1, 18.
- Krismer, M., Haid, C., Ogon, M., Behensky, H., Wimmer, C., 1997. Biomechanics of lumbar instability. *Der Orthopäde* 26, 516-520.
- Kroeber, M., Unglaub, F., Guehring, T., Nerlich, 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* 30, 181-187.
- Kroeber, M.W., Unglaub, F., Wang, H., Schmid, C., Thomsen, M., Nerlich, A., Richter, W., 2002. New in vivo animal model to create intervertebral disc degeneration and to investigate the effects of therapeutic strategies to stimulate disc regeneration. *Spine* 27, 2684-2690.
- Kumaresan, S., Yoganandan, N., Pintar, F.A., Maiman, D.J., Goel, V.K., 2001. Contribution of disc degeneration to osteophyte formation in the cervical spine: a biomechanical investigation. *J Orthop Res* 19, 977-984.
- Kurtz, S.M., van Ooij, A., Ross, R., de Waal Malefijt, J., Pelozo, J., Ciccarelli, L., Villarraga, M.L., 2007. Polyethylene wear and rim fracture in total disc arthroplasty. *Spine J* 7, 12-21.
- Kuslich, S.D., Danielson, G., Dowdle, J.D., Sherman, J., Fredrickson, B., Yuan, H., Griffith, S.L., 2000. Four-year follow-up results of lumbar spine arthrodesis using the Bagby and Kuslich lumbar fusion cage. *Spine* 25, 2656-2662.
- Kwan, M.K., Lai, W.M., Mow, V.C., 1990. A finite deformation theory for cartilage and other soft hydrated connective tissues--I. Equilibrium results. *Journal of biomechanics* 23, 145-155.

- Lafage, V., Gangnet, N., Senegas, J., Lavaste, F., Skalli, W., 2007. New interspinous implant evaluation using an in vitro biomechanical study combined with a finite-element analysis. *Spine* 32, 1706-1713.
- Laffosse, J.M., Accadbled, F., Molinier, F., Bonneville, N., de Gauzy, J.S., Swider, P., 2010. Correlations between effective permeability and marrow contact channels surface of vertebral endplates. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* 28, 1229-1234.
- Lai, W.M., Mow, V.C., Roth, V., 1981. Effects of nonlinear strain-dependent permeability and rate of compression on the stress behavior of articular cartilage. *Journal of biomechanical engineering* 103, 61-66.
- Langelier, E., Suetterlin, R., Hoemann, C.D., Aebi, U., Buschmann, M.D., 2000. The chondrocyte cytoskeleton in mature articular cartilage: structure and distribution of actin, tubulin, and vimentin filaments. *J Histochem Cytochem* 48, 1307-1320.
- Langer, R., Vacanti, J.P., 1993. Tissue engineering. *Science* 260, 920-926.
- Lavik, E., Langer, R., 2004. Tissue engineering: current state and perspectives. *Appl Microbiol Biotechnol* 65, 1-8.
- Leboeuf-Yde, C., Kyvik, K.O., 1998. At what age does low back pain become a common problem? A study of 29,424 individuals aged 12-41 years. *Spine* 23, 228-234.
- Leckie, S.K., Bechara, B.P., Hartman, R.A., Sowa, G.A., Woods, B.I., Coelho, J.P., Witt, W.T., Dong, Q.D., Bowman, B.W., Bell, K.M., Vo, N.V., Wang, B., Kang, J.D., 2012. Injection of AAV2-BMP2 and AAV2-TIMP1 into the nucleus pulposus slows the course of intervertebral disc degeneration in an in vivo rabbit model. *The spine journal : official journal of the North American Spine Society* 12, 7-20.
- Ledet, E.H., Jeshuran, W., Glennon, J.C., Shaffrey, C., De Deyne, P., Belden, C., Kallakury, B., Carl, A.L., 2009. Small intestinal submucosa for anular defect closure: long-term response in an in vivo sheep model. *Spine (Phila Pa 1976)* 34, 1457-1463.
- Lee, J.Y., Ernestus, R.I., Schroder, R., Klug, N., 2000. Histological study of lumbar intervertebral disc herniation in adolescents. *Acta Neurochir (Wien)* 142, 1107-1110.
- Levenberg, S., 2005. Engineering blood vessels from stem cells: recent advances and applications. *Curr Opin Biotechnol* 16, 516-523.
- Levenberg, S., Rouwkema, J., Macdonald, M., Garfein, E.S., Kohane, D.S., Darland, D.C., Marini, R., van Blitterswijk, C.A., Mulligan, R.C., D'Amore, P.A., Langer, R., 2005. Engineering vascularized skeletal muscle tissue. *Nat Biotechnol* 23, 879-884.
- Li, S., Duance, V.C., Blain, E.J., 2008. Zonal variations in cytoskeletal element organization, mRNA and protein expression in the intervertebral disc. *Journal of anatomy* 213, 725-732.

- Lill, C.A., Hessel, J., Schlegel, U., Eckhardt, C., Goldhahn, J., Schneider, E., 2003. Biomechanical evaluation of healing in a non-critical defect in a large animal model of osteoporosis. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* 21, 836-842.
- Liu, G.Z., Ishihara, H., Osada, R., Kimura, T., Tsuji, H., 2001. Nitric oxide mediates the change of proteoglycan synthesis in the human lumbar intervertebral disc in response to hydrostatic pressure. *Spine* 26, 134-141.
- Loguidice, V.A., Johnson, R.G., Guyer, R.D., Stith, W.J., Ohnmeiss, D.D., Hochschuler, S.H., Rashbaum, R.F., 1988. Anterior lumbar interbody fusion. *Spine* 13, 366-369.
- Lotz, J.C., Colliou, O.K., Chin, J.R., Duncan, N.A., Liebenberg, E., 1998. Compression-induced degeneration of the intervertebral disc: an in vivo mouse model and finite-element study. *Spine* 23, 2493-2506.
- Lotz, J.C., Ulrich, J.A., 2006. Innervation, inflammation, and hypermobility may characterize pathologic disc degeneration: review of animal model data. *The Journal of bone and joint surgery. American volume* 88 Suppl 2, 76-82.
- Luoma, K., Riihimäki, H., Luukkonen, R., Raininko, R., Viikari-Juntura, E., Lamminen, A., 2000. Low back pain in relation to lumbar disc degeneration. *Spine (Phila Pa 1976)* 25, 487-492.
- Lyons, G., Eisenstein, S.M., Sweet, M.B., 1981. Biochemical changes in intervertebral disc degeneration. *Biochim Biophys Acta* 673, 443-453.
- Malko, J.A., Hutton, W.C., Fajman, W.A., 2002. An in vivo MRI study of the changes in volume (and fluid content) of the lumbar intervertebral disc after overnight bed rest and during an 8-hour walking protocol. *Journal of spinal disorders & techniques* 15, 157-163.
- Marchand, F., Ahmed, A.M., 1990. Investigation of the laminate structure of lumbar disc annulus fibrosus. *Spine* 15, 402-410.
- Maroudas, A., Stockwell, R.A., Nachemson, A., Urban, J., 1975. Factors involved in the nutrition of the human lumbar intervertebral disc: cellularity and diffusion of glucose in vitro. *Journal of anatomy* 120, 113-130.
- Martini, L., Fini, M., Giavaresi, G., Giardino, R., 2001. Sheep model in orthopedic research: a literature review. *Comp Med* 51, 292-299.
- Masuda, K., Aota, Y., Muehleman, C., Imai, Y., Okuma, M., Thonar, E.J., Andersson, G.B., An, H.S., 2005. A novel rabbit model of mild, reproducible disc degeneration by an annulus needle puncture: correlation between the degree of disc injury and radiological and histological appearances of disc degeneration. *Spine* 30, 5-14.

Matsui, H., Kanamori, M., Ishihara, H., Yudoh, K., Naruse, Y., Tsuji, H., 1998. Familial predisposition for lumbar degenerative disc disease. A case-control study. *Spine* 23, 1029-1034.

Matsumoto, T., Kawakami, M., Kuribayashi, K., Takenaka, T., Tamaki, T., 1999. Cyclic mechanical stretch stress increases the growth rate and collagen synthesis of nucleus pulposus cells in vitro. *Spine* 24, 315-319.

Mayer, H.M., 1994. Spine update. Percutaneous lumbar disc surgery. *Spine* 19, 2719-2723.

McMillan, D.W., Garbutt, G., Adams, M.A., 1996. Effect of sustained loading on the water content of intervertebral discs: implications for disc metabolism. *Ann Rheum Dis* 55, 880-887.

Melrose, J., Burkhardt, D., Taylor, T.K., Dillon, C.T., Read, R., Cake, M., Little, C.B., 2009. Calcification in the ovine intervertebral disc: a model of hydroxyapatite deposition disease. *European spine journal : official publication of the European Spine Society, the European Spinal Deformity Society, and the European Section of the Cervical Spine Research Society* 18, 479-489.

Melrose, J., Roberts, S., Smith, S., Menage, J., Ghosh, P., 2002. Increased nerve and blood vessel ingrowth associated with proteoglycan depletion in an ovine annular lesion model of experimental disc degeneration. *Spine* 27, 1278-1285.

Melrose, J., Shu, C., Young, C., Ho, R., Smith, M.M., Young, A.A., Smith, S.S., Gooden, B., Dart, A., Podadera, J., Appleyard, R.C., Little, C.B., 2012. Mechanical destabilization induced by controlled annular incision of the intervertebral disc dysregulates metalloproteinase expression and induces disc degeneration. *Spine* 37, 18-25.

Michalek, A.J., Funabashi, K.L., Iatridis, J.C., 2010. Needle puncture injury of the rat intervertebral disc affects torsional and compressive biomechanics differently. *European spine journal : official publication of the European Spine Society, the European Spinal Deformity Society, and the European Section of the Cervical Spine Research Society* 19, 2110-2116.

Michalski, D., Hinz, A., 2006. [Severity of chronic back pain. Assessment with the Mainz Pain Staging System]. *Schmerz* 20, 198-209.

Mikawa, Y., Hamagami, H., Shikata, J., Yamamuro, T., 1986. Elastin in the human intervertebral disk. A histological and biochemical study comparing it with elastin in the human yellow ligament. *Archives of orthopaedic and traumatic surgery. Archiv für orthopädische und Unfall-Chirurgie* 105, 343-349.

Moore, R.J., Osti, O.L., Vernon-Roberts, B., Fraser, R.D., 1992. Changes in endplate vascularity after an outer annulus tear in the sheep. *Spine* 17, 874-878.

- Murtagh, R.D., Quencer, R.M., Cohen, D.S., Yue, J.J., Sklar, E.L., 2009. Normal and abnormal imaging findings in lumbar total disk replacement: devices and complications. *Radiographics* 29, 105-118.
- Mwale, F., Roughley, P., Antoniou, J., 2004. Distinction between the extracellular matrix of the nucleus pulposus and hyaline cartilage: a requisite for tissue engineering of intervertebral disc. *Eur Cell Mater* 8, 58-63; discussion 63-54.
- Nachemson, A., 1960. Lumbar intradiscal pressure. Experimental studies on post-mortem material. *Acta Orthop Scand Suppl* 43, 1-104.
- Nachemson, A., Elfstrom, G., 1970. Intravital dynamic pressure measurements in lumbar discs. A study of common movements, maneuvers and exercises. *Scand J Rehabil Med Suppl* 1, 1-40.
- Nachemson, A., Lewin, T., Maroudas, A., Freeman, M.A., 1970. In vitro diffusion of dye through the end-plates and the annulus fibrosus of human lumbar inter-vertebral discs. *Acta Orthop Scand* 41, 589-607.
- Natarajan, R.N., Ke, J.H., Andersson, G.B., 1994. A model to study the disc degeneration process. *Spine* 19, 259-265.
- Natarajan, R.N., Williams, J.R., Andersson, G.B., 2006. Modeling changes in intervertebral disc mechanics with degeneration. *The Journal of bone and joint surgery* 88 Suppl 2, 36-40.
- Neidlinger-Wilke, C., Wurtz, K., Urban, J.P., Borm, W., Arand, M., Ignatius, A., Wilke, H.J., Claes, L.E., 2006. Regulation of gene expression in intervertebral disc cells by low and high hydrostatic pressure. *European spine journal : official publication of the European Spine Society, the European Spinal Deformity Society, and the European Section of the Cervical Spine Research Society* 15 Suppl 3, S372-378.
- Nerlich, A.G., Schaaf, R., Walchli, B., Boos, N., 2007. Temporo-spatial distribution of blood vessels in human lumbar intervertebral discs. *European spine journal : official publication of the European Spine Society, the European Spinal Deformity Society, and the European Section of the Cervical Spine Research Society* 16, 547-555.
- Nerlich, A.G., Schleicher, E.D., Boos, N., 1997. 1997 Volvo Award winner in basic science studies. Immunohistologic markers for age-related changes of human lumbar intervertebral discs. *Spine* 22, 2781-2795.
- Nickel, R., Schummer, A., Seiferle, E., 1997. *Lehrbuch der Anatomie der Haustiere. Band 1 Bewegungsapparat.*
- Niosi, C.A., Oxland, T.R., 2004. Degenerative mechanics of the lumbar spine. *Spine J* 4, 202S-208S.
- Noailly, J., Lacroix, D., Planell, J.A., 2005. Finite element study of a novel intervertebral disc substitute. *Spine* 30, 2257-2264.

- O'Connell, G.D., Malhotra, N.R., Vresilovic, E.J., Elliott, D.M., 2011. The effect of nucleotomy and the dependence of degeneration of human intervertebral disc strain in axial compression. *Spine* 36, 1765-1771.
- O'Connell, G.D., Vresilovic, E.J., Elliott, D.M., 2007. Comparison of animals used in disc research to human lumbar disc geometry. *Spine (Phila Pa 1976)* 32, 328-333.
- O'Sullivan, P.B., Beales, D.J., Smith, A.J., Straker, L.M., 2012. Low back pain in 17 year olds has substantial impact and represents an important public health disorder: a cross-sectional study. *BMC Public Health* 12, 100.
- Ogata, K., Whiteside, L.A., 1981. 1980 Volvo award winner in basic science. Nutritional pathways of the intervertebral disc. An experimental study using hydrogen washout technique. *Spine* 6, 211-216.
- Olczyk, K., 1994a. Age-related changes in proteoglycans of human intervertebral discs. *Z Rheumatol* 53, 19-25.
- Olczyk, K., 1994b. Age-related changes of elastin content in human intervertebral discs. *Folia Histochem Cytobiol* 32, 41-44.
- Olczyk, K., 1994c. Changes in macromolecular components of prolapsed intervertebral discs. *Ann Biol Clin (Paris)* 52, 711-716.
- Oliveira, J.T., Santos, T.C., Martins, L., Picciochi, R., Marques, A.P., Castro, A.G., Neves, N.M., Mano, J.F., Reis, R.L., 2010. Gellan gum injectable hydrogels for cartilage tissue engineering applications: in vitro studies and preliminary in vivo evaluation. *Tissue Eng Part A* 16, 343-353.
- Oliveira, J.T., Santos, T.C., Martins, L., Silva, M.A., Marques, A.P., Castro, A.G., Neves, N.M., Reis, R.L., 2009. Performance of new gellan gum hydrogels combined with human articular chondrocytes for cartilage regeneration when subcutaneously implanted in nude mice. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine* 3, 493-500.
- Osti, O.L., Vernon-Roberts, B., Fraser, R.D., 1990. Annular tears and intervertebral disc degeneration: An experimental study using an animal model. *Spine* 15, 762-767.
- Paesold, G., Nerlich, A.G., Boos, N., 2007. Biological treatment strategies for disc degeneration: potentials and shortcomings. *European spine journal : official publication of the European Spine Society, the European Spinal Deformity Society, and the European Section of the Cervical Spine Research Society* 16, 447-468.
- Panjabi, M.M., 1992. The stabilizing system of the spine. Part I. Function, dysfunction, adaptation, and enhancement. *Journal of spinal disorders* 5, 383-389; discussion 397.
- Park, P., Garton, H.J., Gala, V.C., Hoff, J.T., McGillicuddy, J.E., 2004. Adjacent segment disease after lumbar or lumbosacral fusion: review of the literature. *Spine (Phila Pa 1976)* 29, 1938-1944.

- Park, S.H., Gil, E.S., Cho, H., Mandal, B.B., Tien, L.W., Min, B.H., Kaplan, D.L., 2012. Intervertebral disk tissue engineering using biphasic silk composite scaffolds. *Tissue engineering. Part A* 18, 447-458.
- Paul, C.P., Zuiderbaan, H.A., Zandieh Doulabi, B., van der Veen, A.J., van de Ven, P.M., Smit, T.H., Helder, M.N., van Royen, B.J., Mullender, M.G., 2012. Simulated-physiological loading conditions preserve biological and mechanical properties of caprine lumbar intervertebral discs in ex vivo culture. *PLoS One* 7, e33147.
- Pearce, R.H., Grimmer, B.J., Adams, M.E., 1987. Degeneration and the chemical composition of the human lumbar intervertebral disc. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* 5, 198-205.
- Pearson, R.G., Bhandari, R., Quirk, R.A., Shakesheff, K.M., 2002. Recent advances in tissue engineering: an invited review. *J Long Term Eff Med Implants* 12, 1-33.
- Peng, B., Hao, J., Hou, S., Wu, W., Jiang, D., Fu, X., Yang, Y., 2006. Possible pathogenesis of painful intervertebral disc degeneration. *Spine* 31, 560-566.
- Pereira, D.R., Silva-Correia, J., Caridade, S.G., Oliveira, J.T., Sousa, R.A., Salgado, A.J., Oliveira, J.M., Mano, J.F., Sousa, N., Reis, R.L., 2011. Development of gellan gum-based microparticles/hydrogel matrices for application in the intervertebral disc regeneration. *Tissue Eng Part C Methods* 17, 961-972.
- Pezowicz, C.A., Robertson, P.A., Broom, N.D., 2006. The structural basis of interlamellar cohesion in the intervertebral disc wall. *Journal of anatomy* 208, 317-330.
- Pitzen, T., Matthis, D., Steudel, W.I., 2002. The effect of posterior instrumentation following PLIF with BAK cages is most pronounced in weak bone. *Acta Neurochir (Wien)* 144, 121-128; discussion 128.
- Podichetty, V.K., 2007. The aging spine: the role of inflammatory mediators in intervertebral disc degeneration. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 53, 4-18.
- Ponseti, I.V., 1995. Differences in ligamenta flava among some mammals. *Iowa Orthop J* 15, 141-146.
- Potier, E., Noailly, J., Ito, K., 2010. Directing bone marrow-derived stromal cell function with mechanics. *Journal of biomechanics* 43, 807-817.
- Pritzker, K.P., 1977. Aging and degeneration in the lumbar intervertebral disc. *The Orthopedic clinics of North America* 8, 66-77.
- Putzier, M., Funk, J.F., Schneider, S.V., Gross, C., Tohtz, S.W., Khodadadyan-Klostermann, C., Perka, C., Kandziora, F., 2006. Charite total disc replacement--clinical and radiographical results after an average follow-up of 17 years. *European spine journal : official publication of the European Spine Society, the European Spinal Deformity Society, and the European Section of the Cervical Spine Research Society* 15, 183-195.

Raj, P.P., 2008. Intervertebral disc: anatomy-physiology-pathophysiology-treatment. *Pain Pract* 8, 18-44.

Rannou, F., Lee, T.S., Zhou, R.H., Chin, J., Lotz, J.C., Mayoux-Benhamou, M.A., Barbet, J.P., Chevrot, A., Shyy, J.Y., 2004. Intervertebral disc degeneration: the role of the mitochondrial pathway in annulus fibrosus cell apoptosis induced by overload. *Am J Pathol* 164, 915-924.

Ray, C.D., 1997. Threaded titanium cages for lumbar interbody fusions. *Spine* 22, 667-679; discussion 679-680.

Reid, J.E., Meakin, J.R., Robins, S.P., Skakle, J.M., Hukins, D.W., 2002. Sheep lumbar intervertebral discs as models for human discs. *Clin Biomech (Bristol, Avon)* 17, 312-314.

Reitmaier, S., Schmidt, H., Ihler, R., Kocak, T., Graf, N., Ignatius, A., Wilke, H.-J., submitted. Investigations on Intradiscal Pressures During Daily Activities: An In Vivo Study Using The Merino Sheep. *PLoS One*.

Reitmaier, S., Shirazi-Adl, A., Bashkuev, M., Wilke, H.J., Gloria, A., Schmidt, H., 2012a. In vitro and in silico investigations of disc nucleus replacement. *Journal of the Royal Society, Interface / the Royal Society* 9, 1869-1879.

Reitmaier, S., Wolfram, U., Ignatius, A., Wilke, H.J., Gloria, A., Martin-Martinez, J.M., Silva-Correia, J., Miguel Oliveira, J., Luis Reis, R., Schmidt, H., 2012b. Hydrogels for nucleus replacement-Facing the biomechanical challenge. *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials* 14C, 67-77.

Revell, P.A., Damien, E., Di Silvio, L., Gurav, N., Longinotti, C., Ambrosio, L., 2007. Tissue engineered intervertebral disc repair in the pig using injectable polymers. *Journal of materials science. Materials in medicine* 18, 303-308.

Rinkler, C., Heuer, F., Pedro, M.T., Mauer, U.M., Ignatius, A., Neidlinger-Wilke, C., 2010. Influence of low glucose supply on the regulation of gene expression by nucleus pulposus cells and their responsiveness to mechanical loading. *Journal of neurosurgery. Spine* 13, 535-542.

Risbud, M.V., Schaer, T.P., Shapiro, I.M., 2010. Toward an understanding of the role of notochordal cells in the adult intervertebral disc: from discord to accord. *Dev Dyn* 239, 2141-2148.

Risbud, M.V., Shapiro, I.M., 2011. Notochordal cells in the adult intervertebral disc: new perspective on an old question. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 21, 29-41.

Roach, H.I., Shearer, J.R., Archer, C., 1989. The choice of an experimental model. A guide for research workers. *The Journal of bone and joint surgery. British volume* 71, 549-553.

Roberts, S., Evans, H., Trivedi, J., Menage, J., 2006. Histology and pathology of the human intervertebral disc. *The Journal of bone and joint surgery. American volume* 88 Suppl 2, 10-14.

Roberts, S., Menage, J., Urban, J.P., 1989. Biochemical and structural properties of the cartilage end-plate and its relation to the intervertebral disc. *Spine* 14, 166-174.

Roberts, S., Urban, J.P., Evans, H., Eisenstein, S.M., 1996. Transport properties of the human cartilage endplate in relation to its composition and calcification. *Spine* 21, 415-420.

Roberts, S., Weightman, B., Urban, J., Chappell, D., 1986. Mechanical and biochemical properties of human articular cartilage from the femoral head after subcapital fracture. *The Journal of bone and joint surgery. British volume* 68, 418-422.

Rodrigues, S.A., Wade, K.R., Thambyah, A., Broom, N.D., 2012. Micromechanics of annulus-end plate integration in the intervertebral disc. *The spine journal : official journal of the North American Spine Society* 12, 143-150.

Rohlmann, A., Burra, N.K., Zander, T., Bergmann, G., 2007. Comparison of the effects of bilateral posterior dynamic and rigid fixation devices on the loads in the lumbar spine: a finite element analysis. *Eur Spine J* 16, 1223-1231.

Rohlmann, A., Neller, S., Claes, L., Bergmann, G., Wilke, H.J., 2001. Influence of a follower load on intradiscal pressure and intersegmental rotation of the lumbar spine. *Spine* 26, E557-561.

Rohlmann, A., Zander, T., Bergmann, G., 2005. Effect of total disc replacement with ProDisc on intersegmental rotation of the lumbar spine. *Spine* 30, 738-743.

Rohlmann, A., Zander, T., Rao, M., Bergmann, G., 2009. Applying a follower load delivers realistic results for simulating standing. *Journal of biomechanics* 42, 1520-1526.

Rohlmann, A., Zander, T., Schmidt, H., Wilke, H.J., Bergmann, G., 2006. Analysis of the influence of disc degeneration on the mechanical behaviour of a lumbar motion segment using the finite element method. *Journal of biomechanics* 39, 2484-2490.

Ruiz-Torres, A., Beier, W., 2005. On maximum human life span: interdisciplinary approach about its limits. *Adv Gerontol* 16, 14-20.

Sambrook, P.N., MacGregor, A.J., Spector, T.D., 1999. Genetic influences on cervical and lumbar disc degeneration: a magnetic resonance imaging study in twins. *Arthritis Rheum* 42, 366-372.

Sasson, A., Patchornik, S., Eliasy, R., Robinson, D., Haj-Ali, R., 2012. Hyperelastic mechanical behavior of chitosan hydrogels for nucleus pulposus replacement-experimental testing and constitutive modeling. *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials* 8, 143-153.

Schimandle, J.H., Boden, S.D., 1994. Spine update. Animal use in spinal research. *Spine (Phila Pa 1976)* 19, 2474-2477.

Schizas, C., Kulik, G., Kosmopoulos, V., 2010. Disc degeneration: current surgical options. *Eur Cell Mater* 20, 306-315.

Schmidt, C.O., Kohlmann, T., 2005. [What do we know about the symptoms of back pain? Epidemiological results on prevalence, incidence, progression and risk factors]. *Zeitschrift für Orthopädie und ihre Grenzgebiete* 143, 292-298.

Schmidt, H., Heuer, F., Claes, L., Wilke, H.J., 2008a. The relation between the instantaneous center of rotation and facet joint forces - A finite element analysis. *Clin Biomech (Bristol, Avon)* 23, 270-278.

Schmidt, H., Heuer, F., Wilke, H.J., 2008b. Interaction between finite helical axes and facet joint forces under combined loading. *Spine* 33, 2741-2748.

Schmidt, H., Heuer, F., Wilke, H.J., 2009a. Which axial and bending stiffnesses of posterior implants are required to design a flexible lumbar stabilization system? *Journal of biomechanics* 42, 48-54.

Schmidt, H., Kettler, A., Rohlmann, A., Claes, L., Wilke, H.J., 2007. The risk of disc prolapses with complex loading in different degrees of disc degeneration - A finite element analysis. *Clin Biomech (Bristol, Avon)* 22, 988-998.

Schmidt, H., Midderhoff, S., Adkins, K., Wilke, H.J., 2009b. The effect of different design concepts in lumbar total disc arthroplasty on the range of motion, facet joint forces and instantaneous center of rotation of a L4-5 segment. *Eur Spine J* 18, 1695-1705.

Schmidt, H., Reitmaier, S., 2013. Is the ovine intervertebral disc a small human one?: A finite element model study. *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials* 17, 229-241.

Scholz, M., Schleicher, P., Eindorf, T., Friedersdorff, F., Gelinsky, M., König, U., Sewing, A., Haas, N.P., Kandziora, F., 2010. Cages augmented with mineralized collagen and platelet-rich plasma as an osteoconductive/inductive combination for interbody fusion. *Spine* 35, 740-746.

Schultz, A., Andersson, G., Ortengren, R., Haderspeck, K., Nachemson, A., 1982. Loads on the lumbar spine. Validation of a biomechanical analysis by measurements of intradiscal pressures and myoelectric signals. *The Journal of bone and joint surgery. American volume* 64, 713-720.

Schultz, A.B., Andersson, G.B., 1981. Analysis of loads on the lumbar spine. *Spine* 6, 76-82.

Schünke, M., Schulte, E., Schumacher, U., 2005. Prometheus. Lernatlas der Anatomie. Georg Thieme Verlag.

- Selard, E., Shirazi-Adl, A., Urban, J.P., 2003. Finite element study of nutrient diffusion in the human intervertebral disc. *Spine* 28, 1945-1953; discussion 1953.
- Serhan, H., Mhatre, D., Defossez, H., Bono, C.M., 2011. Motion-preserving technologies for degenerative lumbar spine: The past, present, and future horizons. *SAS Journal* 5, 75-89.
- Sheng, S.R., Wang, X.Y., Xu, H.Z., Zhu, G.Q., Zhou, Y.F., 2010. Anatomy of large animal spines and its comparison to the human spine: a systematic review. *European spine journal : official publication of the European Spine Society, the European Spinal Deformity Society, and the European Section of the Cervical Spine Research Society* 19, 46-56.
- Shi, L., Wang, L., Guo, Z., Wu, Z.X., Liu, D., Gao, M.X., Wan, S.Y., Fu, S.C., Li, S.J., Lei, W., 2012. A study of low elastic modulus expandable pedicle screws in osteoporotic sheep. *Journal of spinal disorders & techniques* 25, 123-128.
- Shirazi-Adl, A., 1989. Strain in fibers of a lumbar disc. Analysis of the role of lifting in producing disc prolapse. *Spine* 14, 96-103.
- Shirazi-Adl, A., Ahmed, A.M., Shrivastava, S.C., 1986. Mechanical response of a lumbar motion segment in axial torque alone and combined with compression. *Spine* 11, 914-927.
- Shirazi-Adl, A., Drouin, G., 1987. Load-bearing role of facets in a lumbar segment under sagittal plane loadings. *Journal of biomechanics* 20, 601-613.
- Shirazi-Adl, A., Taheri, M., Urban, J.P., 2010. Analysis of cell viability in intervertebral disc: Effect of endplate permeability on cell population. *Journal of biomechanics* 43, 1330-1336.
- Shirazi-Adl, S.A., Shrivastava, S.C., Ahmed, A.M., 1984. Stress analysis of the lumbar disc-body unit in compression. A three-dimensional nonlinear finite element study. *Spine* 9, 120-134.
- Silva-Correia, J., Miranda-Goncalves, V., Salgado, A., Sousa, N., Oliveira, J.M., Reis, R.M., Reis, R.L., 2012. Angiogenic potential of gellan gum-based hydrogels for application in nucleus pulposus regeneration: In vivo study. *Tissue engineering. Part A*.
- Silva-Correia, J., Oliveira, J.M., Caridade, S.G., Oliveira, J.T., Sousa, R.A., Mano, J.F., Reis, R.L., 2011. Gellan gum-based hydrogels for intervertebral disc tissue-engineering applications. *J Tissue Eng Regen Med* 5, e97-107.
- Smit, T.H., 2002. The use of a quadruped as an in vivo model for the study of the spine - biomechanical considerations. *European spine journal : official publication of the European Spine Society, the European Spinal Deformity Society, and the European Section of the Cervical Spine Research Society* 11, 137-144.

Smith, L.J., Fazzalari, N.L., 2009. The elastic fibre network of the human lumbar annulus fibrosus: architecture, mechanical function and potential role in the progression of intervertebral disc degeneration. *European spine journal : official publication of the European Spine Society, the European Spinal Deformity Society, and the European Section of the Cervical Spine Research Society* 18, 439-448.

Smith, L.J., Nerurkar, N.L., Choi, K.S., Harfe, B.D., Elliott, D.M., 2011. Degeneration and regeneration of the intervertebral disc: lessons from development. *Dis Model Mech* 4, 31-41.

Smolders, L.A., Kingma, I., Bergknut, N., van der Veen, A.J., Dhert, W.J., Hazewinkel, H.A., van Dieen, J.H., Meij, B.P., 2012. Biomechanical assessment of the effects of decompressive surgery in non-chondrodystrophic and chondrodystrophic canine multisegmented lumbar spines. *European spine journal : official publication of the European Spine Society, the European Spinal Deformity Society, and the European Section of the Cervical Spine Research Society*.

Solomonow, M., Baratta, R.V., Banks, A., Freudenberger, C., Zhou, B.H., 2003. Flexion-relaxation response to static lumbar flexion in males and females. *Clinical biomechanics* 18, 273-279.

Soukane, D.M., Shirazi-Adl, A., Urban, J.P., 2007. Computation of coupled diffusion of oxygen, glucose and lactic acid in an intervertebral disc. *Journal of biomechanics* 40, 2645-2654.

Statistisches Bundesamt, 2009. *Bevölkerung Deutschlands bis 2060*.

Stieber, J.R., Donald, G.D., 3rd, 2006. Early failure of lumbar disc replacement: case report and review of the literature. *Journal of spinal disorders & techniques* 19, 55-60.

Stockwell, R.A., 1971. The interrelationship of cell density and cartilage thickness in mammalian articular cartilage. *Journal of anatomy* 109, 411-421.

Strange, D.G., Oyen, M.L., 2012. Composite hydrogels for nucleus pulposus tissue engineering. *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials* 11, 16-26.

Taksali, S., Grauer, J.N., Vaccaro, A.R., 2004. Material considerations for intervertebral disc replacement implants. *The spine journal : official journal of the North American Spine Society* 4, 231S-238S.

Taylor, T.K., Ghosh, P., Bushell, G.R., 1981. The contribution of the intervertebral disk to the scoliotic deformity. *Clinical orthopaedics and related research*, 79-90.

Team, R.D.C., 2011. *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org/>.

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

- Trout, J.J., Buckwalter, J.A., Moore, K.C., 1982. Ultrastructure of the human intervertebral disc: II. Cells of the nucleus pulposus. *The Anatomical record* 204, 307-314.
- Turner, M.J., Clough, R.W., Martin, H.C., Topp, L.J., 1956. Stiffness and deflection analysis of complex structures. *J Aero Sci* 23, 805-823.
- Tyrrell, A.R., Reilly, T., Troup, J.D., 1985. Circadian variation in stature and the effects of spinal loading. *Spine* 10, 161-164.
- Ulrich, J.A., Liebenberg, E.C., Thuillier, D.U., Lotz, J.C., 2007. ISSLS prize winner: repeated disc injury causes persistent inflammation. *Spine* 32, 2812-2819.
- Urban, J.P., Maroudas, A., 1981. Swelling of the intervertebral disc in vitro. *Connective tissue research* 9, 1-10.
- Urban, J.P., Maroudas, A., Bayliss, M.T., Dillon, J., 1979. Swelling pressures of proteoglycans at the concentrations found in cartilaginous tissues. *Biorheology* 16, 447-464.
- Urban, J.P., Smith, S., Fairbank, J.C., 2004. Nutrition of the intervertebral disc. *Spine* 29, 2700-2709.
- Urban, J.P.G., Roberts, S., Ralphs, J.R., 2000. The nucleus of the intervertebral disc from development to degeneration. *Am Zool* 40, 53-61.
- Vacanti, C.A., 2006. History of tissue engineering and a glimpse into its future. *Tissue Eng* 12, 1137-1142.
- van den Eerenbeemt, K.D., Ostelo, R.W., van Royen, B.J., Peul, W.C., van Tulder, M.W., 2010. Total disc replacement surgery for symptomatic degenerative lumbar disc disease: a systematic review of the literature. *European spine journal : official publication of the European Spine Society, the European Spinal Deformity Society, and the European Section of the Cervical Spine Research Society* 19, 1262-1280.
- van der Veen, A.J., Mullender, M., Smit, T.H., Kingma, I., van Dieen, J.H., 2005. Flow-related mechanics of the intervertebral disc: the validity of an in vitro model. *Spine (Phila Pa 1976)* 30, E534-539.
- van der Veen, A.J., Mullender, M.G., Kingma, I., van Dieen, J.H., Smit, T.H., 2008. Contribution of vertebral [corrected] bodies, endplates, and intervertebral discs to the compression creep of spinal motion segments. *Journal of biomechanics* 41, 1260-1268.
- van der Veen, A.J., van Dieen, J.H., Nadort, A., Stam, B., Smit, T.H., 2007. Intervertebral disc recovery after dynamic or static loading in vitro: is there a role for the endplate? *Journal of biomechanics* 40, 2230-2235.

- van Deursen, D.L., Snijders, C.J., Kingma, I., van Dieen, J.H., 2001. In vitro torsion-induced stress distribution changes in porcine intervertebral discs. *Spine (Phila Pa 1976)* 26, 2582-2586.
- van Ooij, A., Oner, F.C., Verbout, A.J., 2003. Complications of artificial disc replacement: a report of 27 patients with the SB Charite disc. *Journal of spinal disorders & techniques* 16, 369-383.
- Vernon-Roberts, B., Pirie, C.J., 1977. Degenerative changes in the intervertebral discs of the lumbar spine and their sequelae. *Rheumatol Rehabil* 16, 13-21.
- Videman, T., Battie, M.C., Gibbons, L.E., Maravilla, K., Manninen, H., Kaprio, J., 2003. Associations between back pain history and lumbar MRI findings. *Spine* 28, 582-588.
- Wade, K.R., Robertson, P.A., Broom, N.D., 2011. A fresh look at the nucleus-endplate region: new evidence for significant structural integration. *European spine journal : official publication of the European Spine Society, the European Spinal Deformity Society, and the European Section of the Cervical Spine Research Society* 20, 1225-1232.
- Wade, K.R., Robertson, P.A., Broom, N.D., 2012a. On how nucleus-endplate integration is achieved at the fibrillar level in the ovine lumbar disc. *Journal of anatomy* 221, 39-46.
- Wade, K.R., Robertson, P.A., Broom, N.D., 2012b. On the Extent and Nature of Nucleus-Annulus Integration. *Spine*.
- Walter, B.A., Korecki, C.L., Purmessur, D., Roughley, P.J., Michalek, A.J., Iatridis, J.C., 2011. Complex loading affects intervertebral disc mechanics and biology. *Osteoarthritis Cartilage* 19, 1011-1018.
- Wang, P., Yang, L., Hsieh, A.H., 2011a. Nucleus pulposus cell response to confined and unconfined compression implicates mechanoregulation by fluid shear stress. *Annals of biomedical engineering* 39, 1101-1111.
- Wang, Y., Battie, M.C., Boyd, S.K., Videman, T., 2011b. The osseous endplates in lumbar vertebrae: thickness, bone mineral density and their associations with age and disk degeneration. *Bone* 48, 804-809.
- Wang, Y., Boyd, S.K., Battie, M.C., Yasui, Y., Videman, T., 2011c. Is greater lumbar vertebral BMD associated with more disk degeneration? A study using microCT and discography. *J Bone Miner Res* 26, 2785-2791.
- Wang, Y., Chen, H.B., Zhang, L., Zhang, L.Y., Liu, J.C., Wang, Z.G., 2012a. Influence of degenerative changes of intervertebral disc on its material properties and pathology. *Chin J Traumatol* 15, 67-76.

- Wang, Y., Videman, T., Battie, M.C., 2012b. ISSLS Prize Winner: Lumbar Vertebral Endplate Lesions: Associations With Disc Degeneration and Back Pain History. *Spine* 37, 1490-1496.
- Wei, A., Williams, L.A., Bhargava, D., Shen, B., Kishen, T., Duffy, N., Diwan, A.D., 2009. BMP13 prevents the effects of annular injury in an ovine model. *Int J Biol Sci* 5, 388-396.
- Weiler, C., Nerlich, A.G., Schaaf, R., Bachmeier, B.E., Wuertz, K., Boos, N., 2010. Immunohistochemical identification of notochordal markers in cells in the aging human lumbar intervertebral disc. *European spine journal : official publication of the European Spine Society, the European Spinal Deformity Society, and the European Section of the Cervical Spine Research Society* 19, 1761-1770.
- Weinhoffer, S.L., Guyer, R.D., Herbert, M., Griffith, S.L., 1995. Intradiscal pressure measurements above an instrumented fusion. A cadaveric study. *Spine* 20, 526-531.
- Weinstein, J.N., Lurie, J.D., Olson, P.R., Bronner, K.K., Fisher, E.S., 2006. United States' trends and regional variations in lumbar spine surgery: 1992-2003. *Spine* 31, 2707-2714.
- Wenig, C.M., Schmidt, C.O., Kohlmann, T., Schweikert, B., 2009. Costs of back pain in Germany. *Eur J Pain* 13, 280-286.
- Wilke, H.J., Heuer, F., Neidlinger-Wilke, C., Claes, L., 2006a. Is a collagen scaffold for a tissue engineered nucleus replacement capable of restoring disc height and stability in an animal model? *Eur Spine J* 15 Suppl 3, S433-438.
- Wilke, H.J., Kettler, A., Claes, L.E., 1997a. Are sheep spines a valid biomechanical model for human spines? *Spine* 22, 2365-2374.
- Wilke, H.J., Kettler, A., Wenger, K.H., Claes, L.E., 1997b. Anatomy of the sheep spine and its comparison to the human spine. *The Anatomical record* 247, 542-555.
- Wilke, H.J., Neef, P., Caimi, M., Hoogland, T., Claes, L.E., 1999. New in vivo measurements of pressures in the intervertebral disc in daily life. *Spine* 24, 755-762.
- Wilke, H.J., Rohlmann, A., Neller, S., Graichen, F., Claes, L., Bergmann, G., 2003. ISSLS prize winner: A novel approach to determine trunk muscle forces during flexion and extension: a comparison of data from an in vitro experiment and in vivo measurements. *Spine* 28, 2585-2593.
- Wilke, H.J., Rohlmann, F., Neidlinger-Wilke, C., Werner, K., Claes, L., Kettler, A., 2006b. Validity and interobserver agreement of a new radiographic grading system for intervertebral disc degeneration: Part I. Lumbar spine. *Eur Spine J* 15, 720-730.
- Wilke, H.J., Wolf, S., Claes, L.E., Arand, M., Wiesend, A., 1996. Influence of varying muscle forces on lumbar intradiscal pressure: an in vitro study. *Journal of biomechanics* 29, 549-555.

Williams, A.L., Gornet, M.F., Burkus, J.K., 2005. CT evaluation of lumbar interbody fusion: current concepts. *AJNR Am J Neuroradiol* 26, 2057-2066.

Woiciechowsky, C., Abbushi, A., Zenclussen, M.L., Casalis, P., Kruger, J.P., Freymann, U., Endres, M., Kaps, C., 2012. Regeneration of nucleus pulposus tissue in an ovine intervertebral disc degeneration model by cell-free resorbable polymer scaffolds. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*.

Wong, V.W., Wan, D.C., Gurtner, G.C., Longaker, M.T., 2012. *Regenerative Surgery: Tissue Engineering in General Surgical Practice*. World J Surg.

Wuertz, K., Urban, J.P., Klasen, J., Ignatius, A., Wilke, H.J., Claes, L., Neidlinger-Wilke, C., 2007. Influence of extracellular osmolarity and mechanical stimulation on gene expression of intervertebral disc cells. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* 25, 1513-1522.

Yasuma, T., Koh, S., Okamura, T., Yamauchi, Y., 1990. Histological changes in aging lumbar intervertebral discs. Their role in protrusions and prolapses. *The Journal of bone and joint surgery. American volume* 72, 220-229.

Yasuma, T., Makino, E., Saito, S., Inui, M., 1986. Histological development of intervertebral disc herniation. *The Journal of bone and joint surgery. American volume* 68, 1066-1072.

Yu, J., 2002. Elastic tissues of the intervertebral disc. *Biochem Soc Trans* 30, 848-852.

Zentralinstitut für die kassenärztliche Versorgung in der Bundesrepublik Deutschland, 2003. *DIE 50 HÄUFIGSTEN DIAGNOSEN in der Vertragsarztpraxis nach Fachgebieten*.

Zhao, C.Q., Wang, L.M., Jiang, L.S., Dai, L.Y., 2007. The cell biology of intervertebral disc aging and degeneration. *Ageing Res Rev* 6, 247-261.

Zollner, J., Heine, J., Eysel, P., 2000. [Effect of enucleation on the biomechanical behavior of the lumbar motion segment]. *Zentralbl Neurochir* 61, 138-142.

Danksagung

„Es ist ein lobenswerter Brauch: Wer Gutes bekommt, der bedankt sich auch.“

(Wilhelm Busch)

Den Abschluss meiner Arbeit soll der Versuch bilden, meinen Dank an Menschen zu richten, die bewusst oder unbewusst, aber für mich auf eine nicht selbstverständliche Art und Weise zu der vorliegenden Dissertation beigetragen haben.

Ich danke Frau Prof. Dr. Anita Ignatius sowie Herrn Prof. Dr. Hans-Joachim Wilke, die durch die Bereitstellung des Forschungsprojekts den Grundstein für meine Dissertation am Institut für Unfallchirurgische Forschung und Biomechanik gelegt haben. In gleichem Maße fühle ich mich Herrn Prof. Dr. Eckhard Wolf zu Dank verpflichtet, der mir die Möglichkeit gab, meine Arbeit an der Tiermedizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München einreichen zu können.

Im Detail wurde meine Arbeit durch die Ideen und Anregungen, die konstruktive Kritik und die Unterstützung einer Vielzahl an Personen beeinflusst, denen ich im Folgenden auf das Herzlichste danken möchte.

Lieber Herbert Schmitt, nicht nur als tatkräftiger Konstrukteur, fachmännischer Fotograf und geselliger Kollege, sondern auch als Ratgeber, Wanderkamerad und begeisternder Astrologe bin ich dir unendlich dankbar, dass ich dich die ersten beiden Jahre meiner Arbeit hier am Institut zugegen wusste.

Einen ganz wesentlichen Wohlfühlfaktor am Institut bildete auch Martina Reusch für mich. Danke Martina für all die Gespräche, deren tiefsinnige Inhalte ich zu keiner Zeit missen mochte.

Meiner nicht wegzudenkenden Zimmerkollegin Ludwika Kreja möchte ich für all die wundervollen Kurzurlaube danken, die sie mir beim Betrachten ihrer Urlaubsfotos beschert hat. Danke liebe Ludwika für das Lachen zwischendurch und das schöne Gefühl, auch während der Arbeit zuhause „bei Mutti“ zu sein.

Nicolas Graf, dem technischen Alleskönner, möchte ich danken, da er ein wesentlicher Wegbereiter in der Entwicklung meiner Dissertation in der heute vorliegenden Form war. Auch an unsere „Frau Renate“, die sich lückenlos an Nicolas Graf für alle technischen Belange (und vieles mehr) anschloss geht hiermit ein riesengroßes Dankeschön. Renate, du hast Nachtschichten im Nu vorbeigehen

lassen, mit Witz, Schokolade, koffeinhaltigen Getränken und Bauchmuskelkrämpfen gefüllt und damit bei den Schäfchen und mir einen bleibenden Eindruck hinterlassen. Für den Witz und das Gelingen der Tier-OPs sorgte in wesentlichem Umfang Tugrul Kocak. Tugi, durch deine helfenden Hände, deine chirurgische Kompetenz und dein Wissen hast du wesentlich zum Gelingen meiner Arbeit beigetragen. Danke für die unzähligen Lacher im OP.

Auch den Kollegen des gesamten OP-Teams des UFB, Ronny Bindl, Stefan Recknagel, Katharina Gruchenberg, Aline Heilmann, Britta Kanter, Claudia Nemitz, Anna Rapp, Uschi Maile, Marion Tomo, Sevil Essig, Tobias Rosigkeit und Esther Wehrle gilt mein herzlichster Dank für die zahlreichen Assistenzen, Narkoseüberwachungen und die freundschaftliche Atmosphäre im OP. Für die Übernahme der Narkose und die Erinnerungen an „alte Studienzeiten“ geht hierbei mein herzlicher Dank auch an Christina Sand vom TFZ.

Wilhelm Gebel, Ricco Richter und Vanessa Traub gilt mein uneingeschränkter Dank im Namen meiner Schäfchen. Danke, dass ich bei euch meine Tiere immer in guten Händen wusste.

Für das Lesen meiner Dissertation soll hiermit großer Dank an meine Freundin Stufi gehen. Darüber hinaus danke ich Prof. Aboufazi Shirazi-Adl aus Montreal für die wertvolle, aber leider viel zu kurze Zusammenarbeit und all das, was ich von ihm lernen durfte. Thank you sincerely!

Für die geselligen „Besprechungen“ geht mein Dank an alle Kollegen am UFB. Danke an die gesamte „Wirbelsäulengruppe“, in deren Runde ich mich (auch als einzige Tierärztin) immer sehr wohl fühlte. Namentlich hervorheben möchte ich hierbei Uwe Wolfram, der durch direkte und unverblümete Diskussionen wertvolle Denkanstöße für meine Arbeit lieferte. Den vielen kleinen freundlichen und freundschaftlichen Helferlein aus dem „Aquarium“ kann ich nicht genug für alles danken. Zu nennen hierbei v.a. Michael „Noixi“ Denoix, Christian Liebsch, Daniel Kämmerer, David Volkheimer und Jens Feierabend.

In einem Maße, für das Worte nicht mehr ausreichen möchte ich Hendrik Schmidt danken. Hendrik, „ohne Worte“.

Zu guter Letzt möchte ich meinen uneingeschränkten Dank meiner Familie zukommen lassen, die das Fundament all meiner Arbeit bildeten. V.a. meinem Mann Peter gilt dabei unendlicher Dank, den ich nicht in Worte fassen kann.