

Die Entwicklung regenerativer Implantatmatrices auf der Basis von Kollagen Typ I zur Anwendung bei degenerativen Bandscheibenerkrankungen

Dissertation zur Erlangung des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Alice Krüger
aus Filderstadt

Würzburg, 2014

Eingereicht am: 19. Februar 2014

Mitglieder der Promotionskommission

Vorsitzender: Prof. Dr. Krohne

Gutachter: Prof. Dr. Heike Walles

Gutachter: Prof. Dr. Thomas Dandekar

Tag des Promotionskolloquiums: 26. November 2014

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
1 Zusammenfassung	1
2 Einleitung	7
2.1 Entwicklung und Anatomie der Bandscheiben	7
2.2 Struktur und Biomechanik	10
2.3 Erkrankungen und Therapien	12
2.3.1 Degenerative Bandscheibenerkrankungen	12
2.3.2 Behandlungsmethoden und mögliche Komplikationen	13
2.4 Neue therapeutische Strategien	14
2.4.1 Biologische Therapieansätze	15
2.5 Zulassungsrelevante Aspekte für Medizinprodukte	17
3 Zielsetzung	19
4 Material	21
4.1 Allgemein	21
4.2 Kollagen- und Implantatherstellung	21
4.3 Zellkultur	23
4.4 Histologie	25
4.5 Molekularbiologie	25
4.6 Glykosaminoglykan Assay	27
4.7 Biomechanik	28
4.8 Geräte	28
5 Methoden	31
5.1 Herstellung von Kollagen	31
5.2 Reaktor- und Implantatherstellung	31
5.3 Implantation Humanpräparat	32
5.4 Modifikation des Produkts ChondroFiller ^{liquid}	32
5.5 Carbazol Assay	33
5.6 Ermittlung des Quellpotentials	34
5.7 Rheologische Messungen	34
5.8 Spannungs-Kompressions-Messungen	35
5.9 Isolierung und Kultivierung boviner Bandscheibenzellen	36

5.10	Isolierung und Kultivierung humaner Bandscheibenzellen	38
5.11	Kultivierung mesenchymaler Stammzellen	38
5.12	In vitro Zytotoxizitätstest an Monolayerkulturen.....	39
5.13	Inkubation von Zellen in verschiedenen Gelneutralisationslösungen.....	40
5.14	Zellkulturansätze - Implantatmatrices.....	40
5.14.1	Besiedlung und Zellkultur der verdichteten Implantatmatrix mit Bandscheibenzellen	41
5.14.2	Besiedlung und Zellkultur von ChondroFiller ^{liquid} mit Bandscheiben- und Stammzellen	41
5.14.3	Migration - in vitro Simulationsmodell.....	42
5.14.4	Migration - ex vivo Ansatz	42
5.15	Lebend-/Totfärbung.....	43
5.16	Bestimmung der Zellzahl und Viabilität mit der Neubauer Zählkammer.....	44
5.17	Fixieren, Einbetten und Azanfärbung	44
5.18	Qualitative PCR	46
5.19	Glykosaminoglykan Assay	48
5.20	Biomechanische Testung	49
5.20.1	Präparate	50
5.20.2	Testapparaturen	50
5.20.3	Höhenmessung, Flexibilität und zyklische Dauerbelastung	52
6	Ergebnisse.....	55
6.1	Reaktor- und Implantatdesign	55
6.2	Implantatherstellung, Verpackung und Endsterilisation	57
6.3	Transforaminale Implantation - Humanpräparat	59
6.4	Bestimmung der Hyaluronsäurekonzentration in der verdichteten Implantatmatrix nach dem Herstellungsprozess.....	61
6.5	Quantitative Bestimmung des Hyaluronsäureverlustes unter Kultivierungsbedingungen	62
6.6	Ermittlung des Quellpotentials.....	63
6.7	Rheologische Messungen	64
6.8	Spannungs-Kompressions-Messungen.....	65
6.9	In vitro Zytotoxizitätstest an Monolayerkulturen.....	67
6.10	Inkubation von Zellen in verschiedenen Gelneutralisationslösungen.....	69
6.11	Zellkultur - Verdichtete Implantatmatrix +/-Hyaluronsäurezusatz	72
6.11.1	Lebend-/Totfärbung.....	72
6.11.2	Bestimmung der Proliferation und Viabilität humaner und boviner Bandscheibenzellen	75
6.11.3	Histologie	76
6.12	Zellkultur - ChondroFiller ^{liquid} +/-Hyaluronsäurezusatz.....	80

6.12.1	Bestimmung der Proliferation und Viabilität humaner, boviner Bandscheiben- und Stammzellen	80
6.12.2	Histologie	82
6.12.3	Quantitative Bestimmung synthetisierter sulfatierter Glykosaminoglykane	84
6.13	Genexpression	85
6.14	Migration in ChondroFiller ^{liquid} und die verdichtete Implantatmatrix	87
6.14.1	In vitro Kultursystem	87
6.14.2	Ex vivo Ansatz - bovin	88
6.15	Biomechanische Testung/Zyklische Dauerbelastung	91
6.15.1	Höhenmessung	92
6.15.2	Flexibilitätsmessung.....	93
7	Diskussion	96
7.1	Reaktordesign	96
7.2	Implantatdesign und operatives Handling.....	100
7.2.1	Die verdichtete Kollagenmatrix und die modifizierte ChondroFiller ^{liquid} Matrix	102
7.2.2	In vitro und in vivo Untersuchungen potentieller Nukleusersatzmaterialien	104
7.3	Zellbiologische Parameter	107
7.4	Biomechanische Parameter.....	112
7.4.1	Biomechanische Testung am bovinen Modellsystem	113
8	Ausblick	117
	Literaturverzeichnis	II
	Abbildungsverzeichnis	XV
	Tabellenverzeichnis	XIX
	Abkürzungsverzeichnis.....	XX
	Selbstständigkeitserklärung	XXIII
	Danksagung	XXIV

1 Zusammenfassung

Degenerative Bandscheibenerkrankungen wie Protrusionen oder vorgefallenes Nucleusgewebe führen häufig zu chronischen Schmerzen und schränken die Beweglichkeit sehr ein. Operative Behandlungsmöglichkeiten wie die Nucleotomie oder die Fusion von Wirbelkörpern stellen traumatische Eingriffe in das komplexe System der Wirbelsäule dar. Biologische Verfahren, durch die eine Regeneration des geschädigten Gewebes erzielt werden kann, sind klinisch bisher nicht etabliert.

Ziel dieser Arbeit ist die Entwicklung, Herstellung und Testung regenerativer azellulärer Implantatmatrices auf der Basis von Kollagen Typ I, die den degenerierten Nucleus pulposus ersetzen sollen. Insbesondere eine Höhenminderung der Bandscheibe kann zu Anschlussdegenerationen benachbarter Segmente führen. Dies soll durch die Implantatmatrix ausgeglichen werden. Nach der Konstruktion und dem Bau eines Reaktors aus dem Hochleistungskunststoff Polytetrafluorethylen (PTFE), der allen Anforderungen eines CE-Konformitätsbewertungsverfahrens entspricht, wird eine hoch verdichtete Kollagen Typ I Matrix mit einer Stärke von 1 mm hergestellt. Diese kann über den Prozess der Lyophilisation auf 0,6 mm weiter reduziert werden. Es gelingt, die Matrix in einer Edstahlhülle zu platzieren, über die mit Hilfe eines passgenauen Führungsstabes die endoskopische Implantation in die Nucleuskavität erfolgen soll. Im Rahmen der Interkorporellen Fusionstage des Diakonie Klinikums Stuttgart wird das operative Handling an einem humanem Präparat simuliert. Die Implantation erfolgt offen über einen transforaminalen Zugang in zwei nukleotomierte Segmente der lumbalen Wirbelsäule. Die anwesenden Wirbelsäulenchirurgen beurteilen die Möglichkeit der endoskopischen Applikation als positiv und machbar.

Durch den Zusatz des Polysaccharids Hyaluronsäure gelingt es, die Quelleigenschaften der hoch verdichteten Matrix zu steigern, so dass diese wie natives Nucleusgewebe in der Lage ist, Flüssigkeit in Ruhe wieder aufzunehmen. Das Quellpotential und die damit einhergehende Volumenzunahme nach Kompression sind für ein Nucleusersatzmaterial essentiell. Die hier verwendete Hyaluronsäure geht jedoch im offenen System der in vitro Inkubation innerhalb von 11 Tagen verloren. Dennoch zeigen sich weitere Vortei-

le gegenüber der Matrix ohne Hyaluronsäure-Zusatz innerhalb der Testungen heraus. Diese sind neben dem erhöhten Quellpotential z. B. eine gesteigerte Rate der Zellproliferation der verwendeten bovinen und humanen Bandscheibenzellen (bBSZ und hBSZ) sowie humanen mesenchymalen Stammzellen (hMSC), die über die Bestimmung der Zellzahl und Viabilität ermittelt wird. Zudem zeigt sich eine gesteigerte mechanische Stabilität, die über die Spannungs-Kompressions-Messungen evaluiert wird. Über Lebend-/ Totfärbungen und Zytotoxizitätstests an Monolayerkulturen kann zudem nachgewiesen werden, dass die notwendige Endsterilisation durch γ -Bestrahlung zu keinen zytotoxischen Veränderungen der Matrix führt. Da die verdichtete Implantatmatrix azellulär als Medizinprodukt der Klasse III eingesetzt werden soll, wird als ergänzende Matrix zur Füllung kleinster Hohlräume die zunächst flüssige ChondroFiller^{liquid} Matrix (ein Knorpelersatzmaterial der Firma Amedrix GmbH, Esslingen) durch den Zusatz von Hyaluronsäure modifiziert und in der Zellkultur getestet. Da es sich hierbei um ein Zweikammerspritzensystem handelt, ist die Verwendung von Additiven wie z. B. Stammzellen technisch möglich. Die Ermittlung der maximalen Inkubationszeit von Zellen in verschiedenen konzentrierten hyperosmotischen Neutralisationslösungen ergibt eine Dauer von 5 min, bis irreversible Zellschäden auftreten. In Migrationsversuchen kann gezeigt werden, dass die ChondroFiller^{liquid} Matrix als Konektiv zwischen nativem Nukleusgewebe und verdichteter Implantatmatrix fungiert. Des Weiteren synthetisieren bBSZ, hBSZ und hMSC sulfatierte Glykosaminoglykane und behalten dabei ihr charakteristisches Genexpressionsprofil. Die chondrogene Differenzierung durch die Verwendung eines chondrogenen Differenzierungsmediums gelingt bei den hMSC bereits nach einer Kultivierungsdauer von 14 d. Die Zellverteilung in den Implantatmatrices und deren Morphologie entspricht dem nativen Nukleusgewebe. Die biomechanische Testung an einem international anerkannten Modellsystem für humane Wirbelsäulen – der KalbWirbelsäule – ergibt, dass die Nukleotomie zu einer Erhöhung des Range of Motion (RoM) in alle Richtungen nach Flexion/Extension, Seitneigung rechts/links und axiale Rotation rechts/links sowie zu einer Höhenreduktion des Segments im Vergleich zum Intaktzustand führt. Nach der Implantation der verdichteten Implantatmatrix wird der RoM deutlich reduziert. Das Segment weist dadurch eine hohe Steifigkeit ähnlich dem Intaktzustand auf. Die Höhenreduktion kann durch die Implantation beinahe vollständig wieder ausgeglichen werden. Im Rahmen der zyklischen Dauerbelastungen

treten jedoch Implantatextrusionen auf. Zudem nimmt die Steifigkeit deutlich ab, der RoM hingegen wieder zu. Da das bovine Modell jedoch nicht der in vivo Situation entspricht und beispielsweise eine zunehmende Integration des Implantats durch Einwachsen nicht ermöglicht, ist die hohe Extrusionsrate als nicht realistisch zu werten. Klinische Studien am Tier und Mensch müssen zeigen, inwieweit derartige Extrusionen ohne die Verwendung eines Anulusverschlußsystems auftreten.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit ist es gelungen, einen geeigneten Reaktor zu entwickeln und mit diesem eine biokompatible, stabile und quellfähige Matrix herzustellen, die den Höhenverlust nach einer Nukleotomie auszugleichen vermag. Die modifizierte ChondroFiller^{liquid} Matrix stellt eine ideale Ergänzung dar, da über diese Zellen oder andere Additiva verabreicht werden können und deren konektive Wirkung die Zellbesiedlung der azellulären Matrix begünstigt.

Abstract

Degenerative disc diseases like the protrusion or slipped disc tissue of the nucleus frequently cause chronic pain and restrict the freedom of movement. Surgical therapies like the nucleotomy or spinal fusion are traumatic procedures for the complex system of the spine. Biologic therapies which can lead to a regeneration of the damaged tissue were not clinically established until now.

The aim of this work is the development, fabrication and testing of regenerative acellular implant matrices based on collagen type I, which should replace the degenerated nucleus pulposus. Especially a reduction of the disc height can cause degenerations of the adjacent segments. This should be balanced by the implant matrix. After the reactor construction and its fabrication made of a high-performance plastic polytetrafluorethylene (PTFE), which corresponds to the requirements of a CE-conformity assessment procedure, a highly condensed collagen type I matrix with a thickness of 1 mm is fabricated. Through lyophilisation this thickness can be reduced to 0.6 mm. It succeeds to place the matrix inside a stainless steel sleeve which should permit the endoscopic implantation into the nucleus cavity with the help of custom-fit leading-bar. During the intercorporelle spinal fusion days of the Diakonie Klinikum Stuttgart the surgical handling is simulated on a human specimen. The implantation occurs in an open transforaminal access into two nucleotomised segments of the lumbar spine. The participating spinal surgeons evaluate the possibility of the endoscopic application as positive and feasible.

The addition of polysaccharide hyaluronic acid leads to an increasement of the swelling capacities of the highly condensed matrix. At rest, the matrix was subsequently able to absorb fluids the same way as native nucleus tissue. The increased swelling potential and the accompanied increase of volume after compression are essential for a nucleus replacement material. However within 11 days the used hyaluronic acid gets lost in the open system of the in vitro incubation. Nevertheless there are further advantages of this matrix shown in the scope of testing compared to the matrix without the addition

of hyaluronic acid. Besides the swelling potential these advantages are e.g. an increased rate of cell proliferation of the used bovine and human disc cells (bBSZ and hBSZ) and human mesenchymal stem cells (hMSC), identified by the number and viability of these cells as well as an increased mechanical stability of the matrix, which is shown by tension-compression-measurements. Live/dead staining and cytotoxicity tests on monolayer cultures showed that the required final sterilization through γ -irradiation does not lead to cytotoxic changes of the matrix. Because the condensed matrix should be used as an acellular medical device of classification III the preliminary liquid ChondroFiller^{liquid} matrix (a cartilage replacement material of the company Amextrix GmbH, Esslingen), which is able to fill smallest cavities, is modified by the addition of hyaluronic acid and tested in cell culture experiments. As this matrix comes in a two chamber syringe system the substitution of additives e.g. stem cells is technically feasible. The determination of the maximum cell incubation time in different concentrated hyperosmotic neutralization solutions showed a maximum incubation time of five min before irreversible cell damages occur. Migration experiments can show that the ChondroFiller^{liquid} matrix acts as a connection between the native nucleus tissue and the condensed implant matrix. Furthermore bBSZ, hBSZ and hMSC synthesize sulfated glycosaminoglycans and maintain their characteristic gene expression profile. Also a chondrogenic differentiation of the hMSC takes place followed by the use of a chondrogenic differentiation medium after a cultivation period of 14 d. The cell distribution and their morphology were similar to native nucleus tissue. The biomechanical testing which was done in an international accepted model system of the human spine – the calf spine – showed that the nucleotomy leads to an increased range of motion (RoM) of the segment in all directions to flexion/extension, lateral bending right/left and axial rotation left/right as well as a reduction of the height of the segment compared to the intact condition. Subsequently to the implantation of the condensed implant matrix the RoM is clearly reduced. The segment exhibits a high stiffness similar to the intact condition. The height reduction can be corrected almost completely by the implant matrix. During the cyclic compression however implant extrusions appear. Moreover the stiffness of the segment decreases clearly while the RoM increases. As the bovine model might not be applicable completely to the in vivo situation e.g. it does not facilitate an increasing integration through the ingrowth of the implant, the high extrusion

rate is assessed as unrealistic. Clinical studies on animals and humans have to show in which extent extrusions appear without the use of an anular closure device system.

Within the scope of this work it succeeds to develop an eligible reactor with which the fabrication of a biocompatible, dimensionally stable and swellable matrix which in turn is able to restore the disc height after a nucleotomy. The modified ChondroFiller^{liquid} matrix represents an ideal supplement to the condensed matrix as it offers the possibility to apply cells and other additives and furthermore favours the cell seeding of the acellular condensed matrix by its connective effect.

2 Einleitung

2.1 Entwicklung und Anatomie der Bandscheiben

Als Vorläufer der Wirbelsäule entsteht bei allen Wirbeltieren ein Achsenstrang, die Chorda dorsalis, die noch während der embryonalen Entwicklung durch die knorpelige bzw. knöcherne Wirbelsäule ersetzt wird. Durch den zunehmenden Wachstumsdruck der Knorpelzellen wird die Chorda dorsalis zusammengepresst, so dass lediglich Fragmente zwischen den entstehenden Wirbelkörpern verbleiben. Diese bilden später den Bandscheibenkern (Nucleus pulposus; deutsch abgekürzt „Nukleus“). Die frühe Bandscheibenanlage gliedert sich in eine innere und eine äußere Zone. Die Außenzone, die später dem Faserring (Anulus fibrosus) entspricht, besitzt frühzeitig längs verlaufende Fibrillen. Diese verbinden sich mit der Knorpelschicht der Wirbelkörper, die im Laufe der Entwicklung verknöchert (Kraemer, 2009). Die Bandscheibe ist weder innerviert noch vaskularisiert. Der zentrale Bereich der Bandscheibe wird lediglich durch Diffusion mit Nährstoffen versorgt. Wirbelkörper und Bandscheiben entwickeln sich auch nach der Geburt bis ins frühe Erwachsenen Alter weiter. Zwischen dem 8. und 12. Lebensjahr verknöchern die knorpeligen Endplatten und zwischen dem 14. und 15. Lebensjahr verschmelzen diese mit dem Wirbelkörper (Kraemer, 2009; Johnson et al., 2006). Die Wirbelkörper selbst weisen bis zum 20. Lebensjahr eine Knorpelwachstums- und Knorpelabbauzone auf. Bereits im frühen Kindesalter bilden sich die Blutgefäße aus dem Anulus zurück. Durch das Aufrichten in der frühen Entwicklungsphase erfahren die Bandscheiben eine anhaltende axiale Druckbelastung, die mit einer Rückbildung der Gefäße in Verbindung zu stehen scheint. Frühzeitig können sich erste degenerative Veränderungszeichen wie beispielsweise die Dehydration des Bandscheibenkerns, welche mit zunehmendem Alter fortschreitet. Prä- und postnatal unterliegen die Bandscheiben damit einem stetigen Wandel (Kraemer, 2009; Johnson et al., 2006).

Der Mensch besitzt 23 Bandscheiben. Diese werden, wie in Abb. 2-1 dargestellt, unterteilt in: fünf zervikale-, elf thorakale-, vier lumbale und je eine zervikothorakale, thorakolumbale und lumbosakrale Bandscheibe. Zwischen Atlas und Axis, wie auch zwischen

Atlas und Schädel befindet sich kein Zwischenwirbelsegment. Bei einem Erwachsenen entspricht der Anteil an Bandscheiben 25 % der Gesamtlänge der Wirbelsäule. Die Endplatten zählen zum Wirbelkörper und bestehen aus hyalinem Knorpel. Sie sind durch eine poröse Kalkschicht, die eine Versorgung mit Nährstoffen gewährleistet, mit ihm verbunden (Kraemer, 2009).

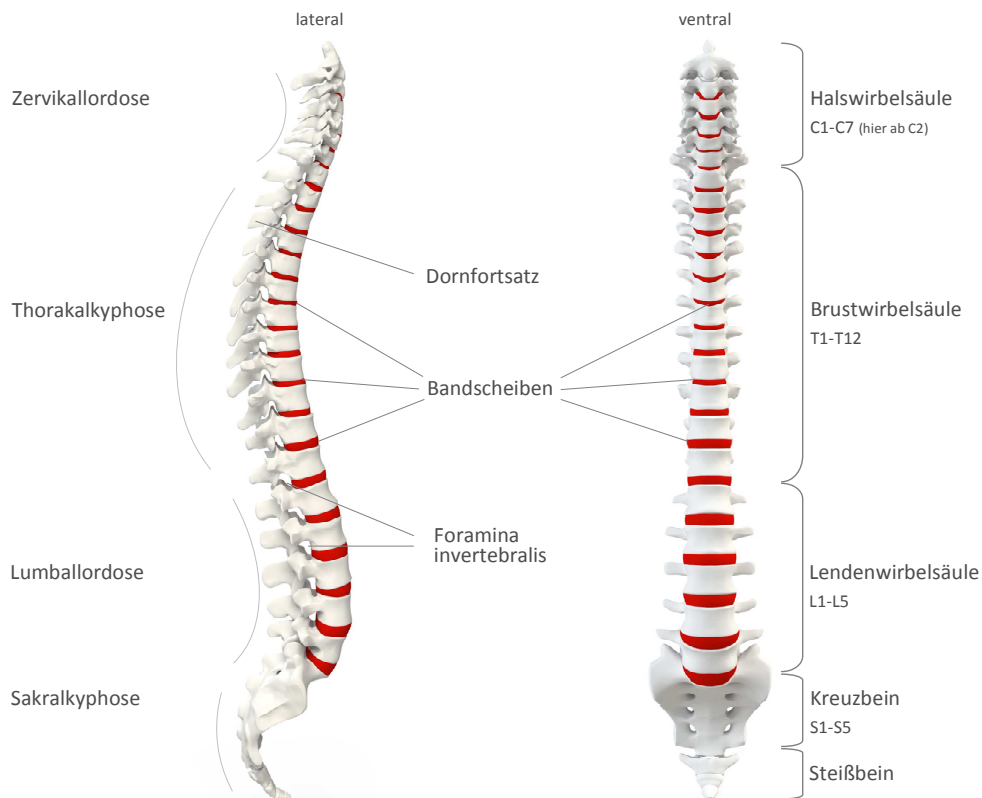


Abbildung 2-1: Anatomie humane Wirbelsäule - Ansicht lateral und ventral: Rote schematische Darstellung der Zwischenwirbelsegmente von der Hals-, Brust- und Lendenwirbelsäule sowie Kreuz- und Steißbein mit den jeweiligen Lordosen und Kyphosen (verändert nach Fotolia).

Die humane Bandscheibe ist 7-10 mm dick, trapezförmig und besitzt einen Durchmesser von ca. 4 cm (Urban und Roberts, 2003). Zu den Hauptbestandteilen des Zwischenwirbels zählen der Kern, der Faserring und die Endplatten der Wirbelkörper. Zum Bewegungssegment, welches den Zwischenwirbel beinhaltet, gehören des weiteren die benachbarten Wirbelkörper, die Wirbelgelenke, das gelbe Band (Ligamentum flavum), das vordere und hintere Längsband (Ligamentum longitudinale anterius und Ligamentum longitudinale posterius) sowie alle Weichteile, die sich im Spinalkanal, im Foramen intervertebralis und zwischen den Quer- und Dornfortsätzen befinden. Ventral überzieht das breite vordere Längsband den Faserring und die Wirbelkörpervorder-

wand. Das hintere Längsband verläuft über die dorsalen Flächen der Wirbel und ist fest mit den Strukturen des Faserrings verankert.

Der Anulus fibrosus bildet den Außenring der Bandscheibe. Er besteht aus einer konzentrisch verlaufenden komplexen Lamellenstruktur von Kollagen- und Elastinfasern sowie Faserknorpel (Richardson et al., 2007). Die Lamellen sind lateral und ventral deutlich kräftiger und zahlreicher als dorsal (Abb. 2-2). Seine äußerste Schicht besteht aus so genannten sharpeyschen Fasern, die fest in den Endplatten des Wirbels verankert sind. Zwischen Faserring und Kern befindet sich eine Übergangszone aus immer feiner werdenden Fibrillen. Die Fasern gehen ohne deutlich erkennbare Grenzen in den Nucleus pulposus über. Dieser ist auf Grund des hohen Proteoglykangehalts äußerst hydrophil und spannt durch seinen Druck den Faserring. Der Wassergehalt schwankt zwischen 50 % und 80 %, da auf Grund der Druckbelastung über den Tagesverlauf Wasser aus der Bandscheibe entweicht und in Ruhe wieder aufgenommen wird (Kraemer, 2009; Richardson et al., 2007).

Anatomie
Bandscheibe (bovin)

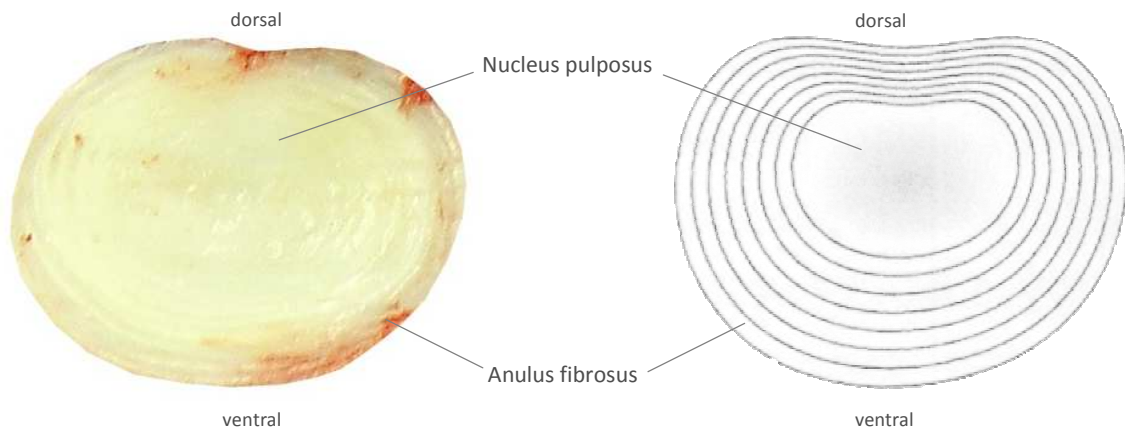


Abbildung 2-2: Anatomischer Aufbau einer bovinen Bandscheibe – Querschnitt. Nucleus pulposus aus gallertartiger hydrophiler Substanz, Anulus fibrosus mit Lamellenstruktur.

2.2 Struktur und Biomechanik

Der Nukleus der humanen Bandscheibe besteht aus vernetzten Kollagenfasern und radial angeordneten Elastinfasern. Er ist relativ zellarm und beinhaltet ca. 5000/mm³ chondrozyten-ähnlichen Zellen, die ab dem Kleinkindalter die Chordazellen ersetzen. Der Anulus setzt sich aus 10-25 Lamellen zusammen (Kalson et al., 2008). Seine Zellen ähneln Fibroblasten und liegen parallel zu den Kollagenfasern der Lamellen. Die gallerartige Konsistenz des Kerns entsteht durch den hohen Anteil an Proteoglykanen – insbesondere Aggrecan und Versican. Proteoglykane bestehen wiederum aus einem Kernprotein mit Glykosaminoglykanseitenketten - wie Hyaluronsäure, Chondroitinsulfat und Keratansulfat - mit negativer Ladung und einer großen Anzahl von Hydroxylgruppen, die das Wasser durch Wasserstoffbrücken anziehen. Die extrazelluläre Matrix ist dadurch äußerst hydrophil, besitzt ein großes osmotisches Potential und gewährleistet damit die Spannung gegen den Faserring sowie die viskoelastischen Eigenschaften des Gewebes. Des Weiteren finden sich die Proteoglykane Decorin, Biglykan, Fibromodulin, Lumikan, Perlecan und Glykoproteine wie Fibronectin und Amyloid (Silver, 2000). 80 % des Kollagennetzwerks der Bandscheibe besteht aus Kollagentyp I und II. Der Anulus besteht zu 70 %, der Nukleus zu 20 % aus Kollagenfasern. Folglich beträgt der Wassergehalt 30 % bzw. 80 %, wobei die Werte, wie bereits beschrieben, Tageschwankungen unterliegen (Kraemer, 2009). Zusätzlich finden sich die Kollagentypen III, V, VI, IX, X, XI, XII und XIV, deren genaue Aufgaben nicht erforscht sind (Urban und Roberts, 2003).

Kollagen fungiert als Schlüsselprotein für die Stabilität des muskuloskelettalen Systems. Es handelt sich um sehr große stabförmige Moleküle (Tropokollagen), die sich beim Kollagentyp II aus drei kovalent quervernetzten Kollagen-Polypeptiden, bestehend aus circa 1000 Aminosäureresten, zu Tripelhelices aufbauen. Gestaffelt angeordnete Tropokollagenmoleküle bilden das Strukturgerüst einer Kollagenfaser. Über Quervernetzungen entstehen aus ihnen Mikrofibrillen, die sich wiederum zu Kollagenfasern zusammenlagern (Friess, 1998).

Die extrazelluläre Matrix ist eine dynamische Struktur. Sie unterliegt einem ständigen Auf- und Abbau, der bei gesunden Bandscheiben ausbalanciert ist. Für den Abbau synthetisieren die Lysosomen der Zellen Proteinasen wie beispielsweise Metalloproteina-

se und Aggrekanase. Die Qualität der extrazellulären Matrix ist sowohl für die avaskuläre und aneurale Struktur, als auch für die biomechanischen Eigenschaften einer intakten Bandscheibe verantwortlich (Urban und Roberts, 2003).

Im Organsystem der Wirbelsäule dienen die Bandscheiben der Kraftfortleitung und Verteilung entlang der Wirbelkörper, der Beweglichkeit, Flexibilität und der Absorption von Druck- und Stoßkräften. Der Bandscheibenkern nimmt unter Entlastung Flüssigkeit auf und setzt hiermit alle ligamentären Strukturen unter eine definierte Spannung (Panjabi et al., 1994; Zhao et al., 2005). Durch die enorme Eigenelastizität wird axialer Druck über den Nukleus gleichmäßig auf die Endplatten und auf den Faserring abgeleitet. Der Nukleus steht unter einem enormen hydrostatischen Druck. Die Anulusfasern werden unter Belastung gedehnt, da sich der Nukleus gegen sie presst. Ein Wirbelsegment besitzt Bewegungsmöglichkeiten zur Flexion/Extension, Seitneigung und Rotation. Die Spannungsverhältnisse in einer intakten Bandscheibe resultieren in einer Torsionssteifigkeit und Kongruenz der Wirbelgelenke, auf Grund derer die axiale Druckbelastung effizient abgeleitet werden kann (Thompson, 2000; White und Panjabi, 1990). Die Bandscheibe fungiert zudem als osmotisches System. Wird durch Belastungsdruck Flüssigkeit aus der Bandscheibe gedrängt, ist sie durch die biochemischen Eigenschaften der Makromoleküle dazu in der Lage, diese zügig wieder aufzunehmen. Dieses System steuert den Transport von Nähr- und Abfallstoffen durch Diffusion. Faserring und Endplatten agieren dabei als semipermeable Grenzschicht. Abhängig vom anzuhebenden Gewicht und der Körperhaltung kann der intradiscale Belastungsdruck lokal zwischen 0,1 und 2,3 MPa betragen (Wilke et al., 1999). Ist die Belastung über einen längeren Zeitraum zu hoch, kann dies zu einer deutlichen Höhenverminderung der Bandscheibe führen. Dadurch werden ankommende Kräfte ungebremst auf die Wirbelgelenke übertragen und verursachen teilweise starke Schmerzen. Dagegen führt eine anhaltende Extension zu einer erhöhten Flüssigkeitsaufnahme, so dass sich die Gelenkkapsel überdehnen kann (Wilke et al., 1999; Kraemer, 2009; Börm und Meyer 2009).

2.3 Erkrankungen und Therapien

2.3.1 Degenerative Bandscheibenerkrankungen

Nichtdegenerative Bandscheibenerkrankungen wie Fehlbildungen, Entzündungen und Tumore, spielen gegenüber Erkrankungen auf degenerativer Basis eine untergeordnete Rolle. Sind Schwachstellen im Anulus entstanden, können die Lamellen dem Druck des Nukleusgewebes nicht mehr standhalten. Dies führt zu einer intradiskalen Massenverschiebung. Dabei wölben sich die Faserringlamellen nach außen, der Nukleus dezentriert sich. Im weiteren Verlauf können sich radiäre und zirkuläre Risse bilden, in die das Gewebe des Nukleus eindringt. Das erste degenerative Stadium - die Protrusion - ist erreicht. Kommt es zu einer Zerstörung der Faserringlamellen, tritt das Nukleusgewebe hervor. Dieses Stadium wird Prolaps (Bandscheibenvorfall) genannt (Kraemer, 2009). Hierbei kann das sequestrierte Gewebe verschiedene Spinalnerven komprimieren und eine Stenose des Spinalkanals verursachen. Die Symptome sind vielfältig und davon abhängig in welchem Abschnitt der Wirbelsäule der Prolaps lokalisiert ist. Am häufigsten sind dynamisch oder statisch stark belastete Segmente der Hals- (C5-C7) und Lendenwirbelsäule (L4-S1) betroffen (Börm und Meyer, 2009). Es zeigen sich Schmerzen, Taubheitsgefühle, Durchblutungs-, Blasen- und Mastdarmstörungen, Wirbelgleiten, Muskelschwäche, Facettengelenksarthrose bis hin zu Lähmungen durch ein Wurzelkompressions-Syndrom. Durch Austrocknung, Fibrosierung und Verknöcherung der Bewegungssegmente kommt es im Alter zu einer natürlichen Versteifung der Wirbelsäule. Daher sind Bandscheibenvorfälle in den späteren Lebensdekaden eher selten. Zu den morphologischen Veränderungen kommen parallel die Biochemischen. Durch den Flüssigkeitsverlust können Nährstoffe und Abfallprodukte nicht mehr ausreichend transportiert werden. Der Zellstoffwechsel gerät aus seiner Balance. Zellen sterben ab und die extrazelluläre Matrix verändert sich. Der Calcium-, Magnesium- und Stickstoffgehalt nimmt zu, während der Kalium- und Kollagengehalt abnimmt. Die Bandscheiben trocknen aus. Diese Degeneration ist bis zu einem gewissen Grad Teil des natürlichen Alterungsprozesses (Kraemer, 2009; Börm und Meyer, 2009; Leitlinie AWMF 074/001, 2009). Bis vor wenigen Jahren wurde angenommen, dass die Ursachen degenerativer Bandscheibenerkrankungen parallel zur Alterung größtenteils auf Risikofaktoren wie me-

chanische Überlastung, z. B. beim Heben schwerer Lasten oder Übergewicht, Rauchen, oder unzureichend ausgeprägte Muskulatur, zurückzuführen sind. Die im Jahr 2009 veröffentlichten Ergebnisse einer Zwillingsstudie „*The Twin Spine Study*“, die seit 1991 multinational durchgeführt wurde, verändert diese Ansicht jedoch zumindest bezüglich degenerativer Erkrankungen der lumbalen Wirbelsäule. Die Studie führt zu der Erkenntnis, dass genetische Faktoren die weitaus größte Rolle spielen. Die erwähnten Risikofaktoren scheinen im Vergleich dazu eine eher geringere Relevanz zu haben. (Battié et al., 2009).

2.3.2 Behandlungsmethoden und mögliche Komplikationen

Halten sich die Symptome nach einem Prolaps in vertretbaren Grenzen, wird in der Regel nicht operiert. Gezielte Schmerz- und Physiotherapie stehen im Vordergrund. Die konservative Behandlung sollte innerhalb weniger Wochen deutliche Verbesserungen erzielen. Ist dies nicht der Fall, stehen verschiedene operative Verfahren zur Verfügung. Die Behandlung ist abhängig von der Indikation und Lokalisation (Rothoerl et al., 2002; Postacchini, 1996). Der Goldstandard des operativen Vorgehens zur Behandlung eines Prolapses ist die Entfernung des vorgefallenen Gewebes in Kombination mit einer Nukleotomie. Dies führt jedoch gezwungenermaßen zu einer Höhenminderung des Zwischenwirbelsegments, was wiederum zu Instabilitäten und langfristig zu weiteren degenerativen Veränderungen der Wirbelsäule führen kann. Degenerative Veränderungen der kleinen Wirbelgelenke stehen beispielsweise in direktem Zusammenhang mit einer vorangegangenen Höhenminderung des Zwischenwirbelsegments (Gotfried et al., 1986; Moore et al., 1999). Nach Operationen an der lumbalen Wirbelsäule treten bei etwa 6,5-10,9 % der Patienten schmerzhaft klinisch-neurologische Verschlechterungen, auch Postnukleotomiesyndrom genannt, auf, die oftmals zu weiteren operativen Eingriffen führen. Des Weiteren kann eine unzureichende Nukleotomie einen Rezidivvorfall begünstigen (Krämer und Herdmann, 2005; Suk et al., 2001). Ist ein Zwischenwirbelsegment nicht mehr zu erhalten, besteht die Möglichkeit eine artifizielle Prothese zu implantieren oder die betroffene Etage zu versteifen (Spondylodese, Fusion zweier Wirbelkörper). Um eine Bandscheibenprothese einsetzen zu können, wird der Discus komplett entfernt.

Die Medizintechnik bieten seit den 70er Jahren diverse Modelle aus verschiedenen Materialien an. In der Regel bestehen die Prothesen aus zwei Titanplatten und einem beweglichen Inlay, um die Beweglichkeit des Segments zu erhalten (Oldenkott, 2005; James et al., 2008). Nachteilig ist, dass die Implantation nicht nur zu Schäden an den Wirbelkörpern führen kann, sondern auch zu Facettengelenksarthrosen auf Grund veränderter Belastungsverhältnisse (Park et al., 2004; Ghiselli et al., 2004). Des Weiteren kann die Dynamik häufig nicht aufrechterhalten werden, so dass postoperativ eine Verknöcherung und somit eine Fusion des Segments stattfindet. Bei einer Spondylodese wird die Bandscheibe ebenfalls vollständig entfernt. Als Platzhalter wird ein Cage aus Titan, Keramik oder einem Hochleistungskunststoff wie Polyetheretherketon (PEEK) implantiert, der zur beschleunigten Verknöcherung mit Knochenersatzstoffen - wie Hydroxylapatit - teilweise in Kombination mit Wachstumsfaktoren wie Bone morphogenic protein (BMP), gefüllt werden kann. Im Anschluss werden die Wirbelkörper durch Pedikelschrauben und Metallstäbe fixiert. Auch wenn bei der Spondylodese mittlerweile dynamische Stabilisationsmethoden zu Verfügung stehen, wird die Beweglichkeit der Wirbelsäule eingeschränkt. Die Belastung auf die intakten Nachbarsegmente verändert sich und kann dort zu Degenerationen führen (Park et al., 2004; Ghiselli et al., 2004). Zudem stellt die Spondylodese nach wie vor einen großen operativen Eingriff dar und steht daher an letzter Stelle der operativen Therapiekaskade.

2.4 Neue therapeutische Strategien

Fernstrom publizierte erstmals im Jahr 1966 den Einsatz einer Metallkugel als Nukleusersatz innerhalb einer kleinen Patientengruppe. Rund ein halbes Jahrhundert später liegt der Fokus der Forschung zur operativen Behandlung degenerierter Bandscheiben auf folgenden Gebieten: dem Nukleus- und Anulusersatz, dem totalen Bandscheibenersatz und zellbasierten Therapieansätzen.

- Um den Kern einer Bandscheibe zu ersetzen, werden verschiedene Materialien erprobt. Das Hauptaugenmerk liegt auf verschiedenen Biomatrizes, die dazu in der Lage sind, Flüssigkeit aufzunehmen und bei Belastung wieder abzugeben (Oldenkott, 2005). Ziel dieser Verfahren ist es, eine ausreichende Höhe der Bandscheibe wieder herzustellen und ein Fortschreiten der Degeneration zu

verhindern. Voraussetzung hierfür ist ein vorwiegend intakter Anulus, für den derzeit Teil-Ersatz Prothesen etabliert werden.

- Bei der Weiterentwicklung von Prothesen, die das gesamte Bandscheibensystem ersetzen, sollen Nebenwirkungen wie Gelenksarthrosen der Facettengelenke zukünftig vermieden werden und die Dynamik langfristig gewährleistet bzw. erhalten bleiben.
- Zellbasierte Therapieansätze umfassen die Implantation autologer Bandscheibenzellen (ADCT – autologous disc cell transplantation) oder mesenchymaler Stammzellen und wurde im Rahmen von Pilotstudien getestet. Das Verfahren ähnelt der etablierten autologen Chondrozyten Transplantation (ACT/MACT) zur Behandlung von Knorpeldefekten im Kniegelenk. Bei der ADCT wird Bandscheibengewebe des Patienten entnommen. Die Zellen werden im Labor isoliert, kultiviert und expandiert. In einem 2. operativen Eingriff werden diese in den degenerierten Kern transplantiert, um diesen zu regenerieren. Die Isolation von Stammzellen erfolgt über eine Punktion des Beckenkamms. Der Verbleib der injizierten Zellsuspension im Discus ist nur nach einer ausreichenden Ausheilung des Anulusdefekts möglich und daher nur für einen Teil der Patienten geeignet (Meisel et al., 2007; Orozco et al., 2011).

2.4.1 Biologische Therapieansätze

Neben biomolekularen und rein zellbasierten Therapieansätzen, die bei frühen degenerativen Stadien erfolgreich sein könnten, stellt das Tissue Engineering eine Möglichkeit zur Behandlung mittlerer bis später Stadien dar (Maidhof et al., 2012). Die Methode des Tissue Engineerings in Bezug auf die regenerative Medizin ist eine Kombination der Technologien der Ingenieurs-, Werkstoff-, Lebenswissenschaften und Medizin. Ziel ist es, Funktionen von Gewebe zu erhalten, zu verbessern oder zu ersetzen. Hierzu werden Zellen aus einem Organismus isoliert, in vitro vermehrt und reimplantiert. Um Abstoßungsreaktionen zu vermeiden, wird die Verwendung autologer Zellen bevorzugt. Das Prinzip des Tissue Engineerings besteht aus zwei grundlegenden Elementen:

1. Vermehrungsfähige, gesunde Zellen
2. Geeignete Matrices mit Strukturen, die den Transport von Signal- und Nährstoffen ermöglichen

Um die Entwicklung eines regenerativen Nucleusersatzmaterials zu ermöglichen sollte eine anwendbare Implantatmatrix folgende Eigenschaften aufweisen:

- Biokompatibilität
- Mechanische Belastungstoleranz
- Geringer Abrieb
- Porosität zur Gewährleistung der Diffusion
- Möglichkeit zur Besiedelung und Proliferation von Zellen
- Viskoelastizität ähnlich des nativen Nucleus zur Kraftweiterleitung
- Quellpotential zur Abgabe und Aufnahme von Flüssigkeit
- Minimalinvasive Implantationsmöglichkeit
- Vollständige Füllmöglichkeit der Nucleuskavität ohne Gefahr einer Extrusion

In vitro, präklinisch und biomechanisch getestet wurden unter anderem verschiedene synthetische Materialien, wie Polymere und Elastomere, sowie biologische Matrices, aus Chitosan, Kollagen, Alginat, Gelatine, Elastin, Fibrin, Hyaluronsäure oder Seidenprotein, die als Beads, Schwämme, Formkörper, Hydrogel oder primär flüssig appliziert werden (Allen et al., 2004; Heuer et al., 2005; Meakin, 2001; Wilke et al., 2004; Sebastine and Williams, 2007; Gruber et al., 2006).

Ein wichtiger Parameter ist die Auswahl eines geeigneten Zelltyps. Momentan stehen hierbei zwei Typen zur Verwendung im Vordergrund: Bandscheibenzellen (BSZ) und mesenchymale Stammzellen (MSC). Die Bandscheibenzellen können bei einem minimal-invasiven Eingriff aus der betroffenen Bandscheibe oder einem benachbarten Segment entnommen werden. Daraufhin werden sie in vitro kultiviert und reimplantiert. Dabei können sie entweder direkt injiziert oder an eine Matrix gekoppelt werden, die implantiert wird. Allerdings birgt dieses Verfahren Risiken. Werden die Zellen aus einem bereits degenerierten Discus gewonnen, sind diese in der Regel geschädigt, dass sie sich für eine erfolgreiche Behandlung nicht eignen (Richardson und Hoyland, 2008). Werden die Zellen aus einer intakten Bandscheibe entnommen, kann dieser Eingriff dort degenerative Veränderungen auslösen. Daher liegt der wissenschaftliche

Fokus nun auf den mesenchymalen Stammzellen. Diese können z. B. aus Knochenmark oder Fettgewebe isoliert werden. Sie sind dazu fähig in unterschiedlichste mesenchymale Gewebe zu differenzieren wie beispielsweise Fett, Knochen, Knorpel und Muskel. Auch wenn für einen therapeutischen Ansatz eine autologe Zellquelle zu bevorzugen ist, zeichnen sich MSCs durch ein sehr niedriges antigenes Potential aus, so dass auch allogene Zellen eines Spenders verwendet werden könnten (Leung et al., 2006). Die Herausforderung liegt in der gezielten Differenzierung der MSC zu Bandscheibenzellen. Co-Kultivierungen - in vitro und in vivo - von MSC in Kombination mit Nucleuszellen zeigen im Tierversuch bereits erste Erfolge zu einer gelungenen Differenzierung (Paesold et al., 2007). Noch steht die Forschung auf diesem Gebiet an ihren Anfängen. Trotzdem scheinen bereits heute stammzell-basierte Therapien zur Behandlung von degenerierten Bandscheiben zukünftig die Methode der Wahl zu sein (Richardson and Hoyland 2008; Orozco et al., 2011).

2.5 Zulassungsrelevante Aspekte für Medizinprodukte

Die Amedrix GmbH aus Esslingen, welche die Entwicklung des Nucleusersatzes unterstützt, entwickelt und produziert Medizinprodukte auf der Basis von tierischem Kollagen Typ I. Es handelt sich um zellfreie Kollagenimplantate zur Regeneration von artikulären Knorpeldefekten, die auf Grund ihres langfristigen Verbleibs im Körper und ihres tierischen Ursprungs der Medizinproduktklasse III zugeordnet werden. Die Entwicklung neuartiger Implantatmatrices zur Behandlung degenerativer Bandscheibenerkrankungen, die ebenfalls eine Zulassung als Medizinprodukt erhalten sollen, unterliegt den Richtlinien des Medizinproduktegesetzes (MPG), der EU-Richtlinie 93/42/EWG vom 14. Juni 1993 und der Richtlinie 2007/47/EG des Europäischen Parlaments des Rates vom 5. September 2007 und damit verbundenen Normen wie z. B. der DIN EN ISO 13485. Diese wird nur dann erteilt, wenn alle Anforderungen gemäß § 7 des MPG erfüllt sind. Für die Zulassung und das Inverkehrbringen von Medizinprodukten der Klasse III ist eine CE-Zertifizierung zwingend erforderlich. Die CE-Kennzeichnung erfolgt über eine akkreditierte benannte Stelle, die nach einem positiv ausgefallenen Konformitätsbewertungsverfahren gemäß § 37 und den entsprechenden Anhängen der Richtlinie des MPG ein CE-Kennzeichen erteilen kann. Das komplexe Bewertungsverfahren besteht

aus verschiedenen Bausteinen, auf die hier nur bruchstückhaft, im Bezug auf die nachfolgenden Inhalte dieser Dissertation, eingegangen wird.

Die Prüfung eines neuen biologischen Implantates gliedert sich in der Regel in eine in vitro Testung, gefolgt von einer präklinischen Studie am Tier und einer klinischen Studie am Mensch. Für die in vitro Testung ist es neben dem Nachweis der generellen Biokompatibilität des Implantats und dessen Funktionalität unter anderem notwendig, dass alle produktberührenden Materialien im Verlauf des Herstellungsprozesses bestimmte Kriterien erfüllen. So sollten beispielsweise keine Partikel oder unerwünschte Substanzen an das Implantat abgegeben werden. Hierfür sind Zertifikate aller Materialkomponenten zur Gewährleistung der Qualität innerhalb der technischen Dokumentation an die benannte Stelle einzureichen. Ein entsprechendes Zertifikat wie z. B. über die Biokompatibilität, Freiheit von löslichen chemischen Zusätzen oder ein FDA-Konformitätszertifikat ist ein geeigneter Nachweis über die Qualität verwendbarer Kunststoffe. Zusätzliche Zytotoxizitätsprüfungen stellen ebenfalls einen geeigneten Nachweis zur Anwendungseignung dar. Ist ein solches Zertifikat nicht über den Lieferant verfügbar, kann der Medizinproduktehersteller Testungen in akkreditierten Laboren in Auftrag geben. Letztendlich ist es entscheidend, die Eignung aller verwendeten Komponenten nachvollziehen zu können und über Zertifikate, Analysen und Validierungen darzustellen.

3 Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Dissertation ist die Entwicklung regenerativer Implantatmatrices auf der Basis einer Kollagen Typ I Lösung der Amedrix GmbH (Esslingen) sowie die Entwicklung eines Verdichtungsreaktors zur Implantatherstellung, der alle Anforderungen innerhalb eines CE-Konformitätsbewertungsverfahrens erfüllt und sich unter der Berücksichtigung wirtschaftlicher Aspekte für eine Serienproduktion eignet. Die Implantatmatrices sollen zellbiologisch in vitro untersucht werden. Zudem soll die biomechanische Eignung, unter Bezugnahme auf die axiale Dauerbelastung, über ein international anerkanntes bovines Modellsystem überprüft und die transforaminale Implantation an einem humanen Präparat simuliert werden.

Ein geeignetes Implantat muss die Fähigkeit haben Flüssigkeit in Ruhe wieder aufnehmen zu können, um die Höhe des Zwischenwirbelsegments aufrechtzuerhalten. Um ein quellfähiges Implantat zu erhalten, soll als zusätzliche Komponente das Polysaccharid Hyaluronsäure in die Matrices integriert werden und eine Charakterisierung im Vergleich zu Kollagenimplantaten ohne HA-Zusatz erfolgen. Auf Grund der Notwendigkeit einer Endsterilisation mittels γ -Strahlen, die zwangsläufig zu biochemischen und biomechanischen Veränderungen der Matrices führt, sollen verschiedene Parameter anhand verschiedener Zelltypen, wie zum Beispiel die Proliferation, Viabilität, Genexpression und Synthese von Glykosaminoglykanen, analysiert werden. Es sollen zwei in ihrer Konsistenz und Zusammensetzung unterschiedliche Matrices entwickelt werden, die in Kombination bzw. einzeln als azellulärer Nucleusersatz, nach einer Nucleotomie oder bei höhenverminderten Bandscheiben endoskopisch in die Nucleuskavität implantiert werden können:

- Implantatmatrix A: eine stark verdichtete, quellfähige Kollagenmatrix mit nucleus-ähnlicher Viskoelastizität, deren Oberfläche und Volumen nach der Implantation sich ausdehnen, um einer Extrusion entgegenzuwirken und die Höhe des Bewegungssegments zu erhalten.
- Implantatmatrix B: eine Modifikation des Produkts ChondroFiller^{liquid} mit dem eine flüssige Applikation eines Kollagenhydrogels, inklusive der Möglichkeit Zel-

len als Additiv zu verwenden, ermöglicht werden soll; um Höhenminderungen in Kombination mit Implantatmatrix A auszugleichen oder Hohlräume zu füllen und somit die zelluläre Besiedlung als Brücke zwischen verbliebenem Nukleusgewebe und Implantatmatrix A in vivo zu unterstützen.

Verbliebene Nukleuszellen oder hinzugefügte Stammzellen sollen in die Matrix migrieren, dort proliferieren und durch die Synthese typischer extrazellulärer Matrixproteine neues Nukleusgewebe aufbauen. Eine weitere Degeneration der betroffenen Bandscheibe soll dadurch verhindert, sowie der Höhenverlust durch die vorausgegangene Nukleotomie ausgeglichen werden. Um die Implantatmatrices auf ihre biomechanische Stabilität und eine mögliche Extrusion in Folge der axialen Druckbelastung zu überprüfen, soll eine biomechanische Testung - eine zyklische Dauerbelastung - im bovinen Modellsystem erfolgen.

4 Material

4.1 Allgemein

Chemikalien und Verbrauchsmaterial:

Bottle Top Filter	Corning, Niederlande
Einweg-Pipetten 5-50 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen
	Corning, Niederlande
Einwegspritzen 1-50 ml	B. Braun, Melsungen
Essigsäure 96 %	Merck, Darmstadt
Ethanol 99,8 %	Roth, Karlsruhe
Laborflaschen	Schott, Mainz
Medizid Rapid	Meditrade, Kiefersfelden
Messkolben	Schott, Mainz
Messpipetten, Glas	Hirschmann, Eberstadt
Messzylinder	Brand, Wertheim
Pasteurpipetten	Roth, Karlsruhe
Petrischalen	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Pinzetten und Scheren	Hammacher, Solingen
Pipettenspitzen 20 µl bis 5 ml	Eppendorf, Hamburg
Sterile Becher mit Schraubverschluss 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Zentrifugenröhrchen 15 und 50 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen

4.2 Kollagen- und Implantatherstellung

Chemikalien und Verbrauchsmaterial:

1-L-Weithalsflasche	Schott, Mainz
Borsäure	Merck, Darmstadt
Calciumchlorid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Carbazol	Merck, Darmstadt

Di-Natriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Edelstahlhülsen Ø 2,6 mm	Eigenanfertigung
Essigsäure 96%	Merck, Darmstadt
Ethanol 99,8%	Roth, Karlsruhe
Filternutschen	Duran, Wertheim
Hakenpinzetten	Hammacher, Solingen
Hyaluronic acid sodium salt from Streptococcus equi	Sigma-Aldrich, Steinheim
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Kaliumhydroxid	Merck, Darmstadt
Magnesiumchlorid-hexahydrat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Rattenschwänze	Charles River, Sulzfeld
Schwefelsäure 95-97 %	Merck, Darmstadt
Skalpell und Klingen	Bayha, Tuttlingen
Skalpellgriffe und Klingen	Bayha, Tuttlingen
Verdichtungsreaktor	Sonderanfertigung, Elring Klinger Kunststofftechnik, Bietigheim
Zentrifugenbecher	Fisher Scientific, Wohlen , CH

Lösungen Kollagen- und Implantatherstellung:

0,1 % Essigsäure	6 ml 96 % Essigsäure + 570 ml H ₂ O ergibt 1 % Essigsäure; 500 ml 1 % Essigsäure, Endvolumen 5 l mit H ₂ O; sterilfiltriert
0,5-molare Essigsäure	148,8 ml 96 % Essigsäure, Endvolumen 5 l mit H ₂ O; sterilfiltriert
2GNL-MP mit HA	5 g Hyaluronsäure, Firmeninterne Zusätze, Endvolumen 1 l mit H ₂ O, pH 8,3; autoklaviert
20 % NaCl-Lösung	1000 g NaCl, , Endvolumen 5 l mit H ₂ O; sterilfiltriert
2GNL-MP	Firmeninterne Zusätze, pH 8,3; sterilfiltriert
4M Boratstammlösung	4 mol/l Borsäure, 4 mol/l KOH
5GNL-MP	Firmeninterne Zusätze, pH 8,3; sterilfiltriert

5GNL-MP mit HA	10 g Hyaluronsäure (HA) Firmeninterne Zusätze, Endvolumen 1 l H ₂ O, pH 8,3, autoklaviert
70 % Ethanol	1,4 l Ethanol, Endvolumen 2 l mit H ₂ O; sterilfiltriert
Boratarbeitslösung	1 Teil Boratstammlösung + 40 Teile Schwefelsäure 95-97 %
Carbazollösung 1 %	0,164 g Carbazol in 12,65 ml Ethanol 96 %
PBS ⁺	40 g NaCl, 1 g KCl, 1 g KH ₂ PO ₄ , 0,5 g MgCl ₂ 5,75 g Na ₂ HPO ₄ , 0,662 g CaCl ₂ , Endvolumen 5 l mit H ₂ O, pH zwischen 7,1 und 7,6; sterilfiltriert

4.3 Zellkultur

Chemikalien und Verbrauchsmaterial:

Biofreeze	Biochrom, Berlin
CASY [®] ton	Innovatis AG, Reutlingen
Collagenase NB4	Serva, Heidelberg
Di-Natriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
DMEM/HAM's F12	Biozol, Eching
Dulbecco's MEM (1x) w/L-Glutamin, w/Phenolrot	Biochrom, Berlin
Ethylendiamintetraessigsäure Dinatriumsalz	BDH Laboratory Supplies, Poole, UK
Fetal Bovine Serum (FBS)	Biochrom, Berlin
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Magnesiumchlorid-hexahydrat	Merck, Darmstadt
Multiwellplatten für Suspensionskulturen 6, 12, 24 und 48 Well	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Natriumhydrogencarbonat	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
StemPro Chondrogenesis Differentiation Kit	Invitrogen, Karlsruhe
Trypanblaulösung 0,5 %	Sigma, Taufkirchen

Lösungen Zellkultur:

2GNL-MP	Firmeninterne Zusätze, pH 8,3; sterilfiltriert
2GNL-MP mit HA	5 g Hyaluronsäure, Firmeninterne Zusätze, Endvolumen 1 l mit H ₂ O, pH 8,3; autoklaviert
5GNL-MP	Firmeninterne Zusätze, pH 8,3; sterilfiltriert
5GNL-MP mit HA	10 g Hyaluronsäure Firmeninterne Zusätze, Endvolumen 1 l H ₂ O, pH 8,3, autoklaviert
10GNL-MPLN	Firmeninterne Zusätze, pH 8,3, sterilfiltriert
Kollagenase-Lösung	Lösen der lyophilisierten Kollagenase in PBS ⁺ entsprechend einer Aktivität von 1,25 PZ-U/ml, aliquotiert in verschiedene Volumina, Lagerung bei -20 °C; sterilfiltriert
PBS-EDTA	16 g NaCl, 0,40 g KCl, 0,40 KH ₂ PO ₄ , 2,30 g Na ₂ HPO ₄ 0,40 g EDTA-Na ₂ , Endvolumen 2 l mit 2 H ₂ O, pH 7,2; sterilfiltriert
Trypsin-Gebrauchslösung 0,25 %	Trypsin-Stammlösung wird mit PBS-EDTA 1:10 verdünnt auf 0,25 %

Zelltypen

1. Bovine Nucleuszellen (bBSZ): isoliert aus bovinen Bandscheiben des Rinderschwanzes vom Schlachthof 71116, Gärtringen. Das Alter der Tiere beträgt < 24 Monate, Geschlecht: männlich.
2. Humane Bandscheibenzellen (hBSZ): isoliert aus humanem Bandscheibengewebe nach einer Nucleotomie oder Spondylodese. Verschiedene Spender, Alter und Geschlecht unbekannt. Erhalten vom Wirbelsäulenzentrum, des Diakonie Klinikums Stuttgart; Beratung durch die Ethik-Kommission der Landesärztekammer Baden-Württemberg, Aktenzeichen: F-2012-061.
3. Mesenchymale Stammzellen (hMSC): isoliert aus Hüftköpfen nach Erhalt einer Endoprothese. Erhalten vom Lehrstuhl für Tissue Engineering und Regenerative Medizin der Universitätsklinik Würzburg.

4.4 Histologie

Chemikalien und Verbrauchsmaterial:

2-Propanol 99,7 %	Roth, Karlsruhe
AnilinblauOrange	Waldeck
Azokarmin-Essigsäure	Waldeck
Deckgläser, 24 mm x 60 mm	Superior, Marienfeld
Entellan neu [®]	Merck, Darmstadt
Ethanol 99,8 %	Roth, Karlsruhe
Faltenfilter, Ø = 185 mm	Schleicher und Schuell, Dassel
Formaldehyd 4 %, neutral	VWR Prolabo, Leuven, Belgien
Neoclear [®]	Merck, Darmstadt
Objektträger, 76 mm x 26 mm	Roth, Karlsruhe
Wolframatophosphorsäure-Hydrat	Merck, Darmstadt
Xylol 98 %	Roth, Karlsruhe

Lösungen Histologie:

Azokarmin-Lösung	0,1 % (w/v) Azokarmin in Reinstwasser gelöst, auf Magnetrührer aufgeköcht; filtriert; Zugabe von 1 % (v/v) Essigsäure (96 %)
Phosphorwolframsäure	5 % (w/v) Wolframatophosphorsäure-Hydrat in Reinstwasser gelöst

4.5 Molekularbiologie

Chemikalien und Verbrauchsmaterial:

2-Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
Agarose	Invitrogen, Karlsruhe
cDNA-Synthese-Kit	Roche, Mannheim
DNA-Leiter 100 bp	Invitrogen, Karlsruhe
Einmal-Feindosierungsspritze, Omnifix-F1, 1 ml	B. Braun, Melsungen
Einmal-Kanülen, Sterican, 0,6 mm x 60 mm	B. Braun, Melsungen
Eppendorf-Gefäße	Eppendorf, Hamburg

Ethanol für Molekularbiologie	Merck, Darmstadt
Filter-Spitzen, ART [®] 20, 100 und 1.000	Molekular Bio Products, Eschwege
Küvetten, UV mikro, 70 µl	Brand, Wertheim
Oligonukleotide	Metabion international AG, Martinsried
PCR Master Kit	Roche, Mannheim
PCR-Tubes 0,2 ml	Molekular Bio Products, Eschwege
PCR-Wasser	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe
RNeasy [®] Mini Kit 50	Quiagen, Hilden
Roti [®] -load DNA-Puffer	Roth, Karlsruhe
Sybr [®] -Green I (10.000 x Lösung in DMSO)	Merck, Darmstadt
Tris-acetate-EDTA-Puffer, 10 x	Sigma, Taufkirchen

Tabelle 4-1: Zusammenstellung der Oligonukleotide der PCR (hBSZ und hMSC)

Zielgen	Primersequenz (5'-3')	Produktgröße (bp)
Aggrecan	links: tctgtaaccaggctccaac	199
	rechts: ctggcaaaatccccactaaa	
Collagen I	links: ggacacaatggattgcaagg	466
	rechts: taaccactgctccactctgg	
Collagen II	links: tctggcaaagatgggtgctaatgg	490
	rechts: tcttctgggaacgtttgctgg	
GAPDH	links: gaaggtgaaggtcggagtc	224
	rechts: gaagatggtgatgggatttc	
MMP-2	links: aagaaccagatcacatacaggatc	185
	rechts: gtatccatcgccatgctcc	

Tabelle 4-2: Zusammenstellung der Oligonukleotide der PCR (bBSZ)

Zielgen	Primersequenz (5´-3´)	Produktgröße (bp)
Aggrecan	links: acagcgctaccaagacaag	155
	rechts: acgatgccttttaccacgac	
Collagen I	links: tgagagaggggttggac	142
	rechts: aggttcacccttcacacctg	
Collagen II	links: cctgtaggaccttgggtca	145
	rechts: atagcgccttggtaggac	
GAPDH	links: aaccagaagactgtggatgg	178
	rechts: caacagacacgttgggagtg	
MMP-2	links: accagagcaccattgagacc	208
	rechts: aaccgtagcggagtccatc	

Lösungen Molekularbiologie:

TAE (1 x konzentriert):

1:10 Verdünnung des 10-fach konzentrierten TAE-Puffers mit Reinstwasser; entspricht 40 mmol/l Tris- Acetat, 1 mmol/l EDTA, pH 8,3

4.6 Glykosaminoglykan Assay

Chemikalien und Verbrauchsmaterial:

Blyscan - Glykosaminoglykan Assay	Biocolor, UK
Collagenase NB4	Serva, Heidelberg

Lösungen Glykosaminoglykan Assay:

Kollagenase-Lösung

Lösen der lyophilisierten Kollagenase in PBS⁺ entsprechend einer Aktivität von 1,25 PZ-U/ml, aliquotiert in verschiedene Volumina, Lagerung bei -20 °C; sterilfiltriert

4.7 Biomechanik

Lösungen und Verbrauchsmaterial:

0,9 % Natriumchloridlösung	B. Braun, Melsungen
Caspar Rongeure gerade und 60 ° gewinkelt	Hersteller nicht bekannt
Einwegspritze 5 ml	B. Braun, Melsungen
Polymethylmethacrylat (Technovit 3040)	Heraeus Kulzer, Werheim/Taunus

4.8 Geräte

Tabelle 4-3: Verwendete Geräte

Gerät	Typ	Hersteller
Autoklav	Melag Typ 23	MELAG OHG, Berlin
CASY [®] 1 Cell-Counter und Analyser-System	Modell TTC	Innovatis AG, Reutlingen
Digitalkamera	DXM 1200	Nikon, Japan
Dokumentationssystem	Bio Imagine System	Syngene, Cambridge, UK
Einbettautomat	Citadel 1000	Thermo Shandon, Cheshire UK
Einschweißgerät	MELAG 101	MELAG OHG, Berlin
Elektrophoresekammer	Horizontal Midi	VWR, Leuven, Belgien
Gefriertrocknungsanlage	Alpha 1-4 LSC	Christ, Osterode
Heizschrank	Typ SUT 6420	Thermo Electron LED GmbH, Langenselbold
Inkubatoren	BB 6220 und BBD 6220	Thermo Electron LED GmbH, Langenselbold
Magnetrührer	MR3001 K8	Heidolph, Schwabach
Mikroskop	Eclipse E600	Nikon, Japan
Mikroskop (invers)	Eclipse TE2000-S	Nikon, Japan
Mikrotom	Shandon Finesse ME	Thermo Shandon, Cheshire UK
Objektive 600	Plan Fluor 4x (4x/0,13)	Nikon, Japan

	Plan Fluor 10x (10x/0,30) Plan Fluor 20x (20x/0,50)	
Objektive TE2000-S	Plan Fluor 4x (4x/0,13) Plan Fluor 10x (10x/0,30) Plan Fluor 20x (20x/0,50)	Nikon, Japan
Paraffin-Aufblockstation	Histocentre 2	Thermo Shandon, Cheshire UK
pH-Elektrode	SenTix 41	WTW, Weilheim
pH-Meter	Inolab Level 2	WTW, Weilheim
Photometer	Genesys 6	ThermoSpectrnic, Rochester, USA
Pipetten	Reference 2,5 Reference 100 Reference 200 Reference 1000 Research Pro 10 Research Pro 300 Research Pro 5000	Eppendorf, Hamburg Eppendorf, Hamburg Eppendorf, Hamburg Eppendorf, Hamburg Eppendorf, Hamburg Eppendorf, Hamburg Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfe	Pipettboy	Integra Bioscience, Chur, Schweiz
Präzisionswaage 1 Präzisionswaage 2	AC 120S 444-33	Sartorius AG, Göttingen Kern, Frommern
Reinstwassersystem	Bioresearch (UF) D11921	Werner GmbH, Leverkusen
Rheometer	C-VOR 150	Bohlin, Pforzheim
Servohydraulische Materialprüfmaschine	Instron 8871	Instron Deutschland GmbH, Pfungstadt
Steril-Werkbank	Herasafe	Thermo Electron LED GmbH, Langenselbold
Thermocycler	T-personal combi	Biometra, Göttingen
Vakuumpumpe	MZ 2C	Greifenberger Antriebstechnik, Marktredwitz
Vakuum-Sicherheits-Absaugsystem	AF 204	Integra Bioscience, Chur, Schweiz
Waagen	CP224S BC3100	Sartorius AG, Göttingen
Wasserbad	HIR-3	Kunz Instruments A/S

	1228-2	Sheldon Manufacturing, Inc., USA
Wippschüttler	AK 110	Infors AG, Schweiz
Wirbelsäulensimulator	Version 2	Sonderanfertigung der Universität Ulm
Zentrifugen	Zentrifuge 5417C Biofuge fresco Multifuge 3S-R Evolution RC	Eppendorf, Hamburg Thermo Electron LED GmbH, Langenselbold Sorvall, Langenselbold

5 Methoden

Die nachfolgenden Versuche finden zum Großteil im Labor für Forschung und Entwicklung der Amedrix GmbH in 73728 Esslingen statt.

5.1 Herstellung von Kollagen

Das verwendete Kollagen wird aus Kollagenfasern von Rattenschwanzsehnen gewonnen. Diese werden bei -20 °C gelagert und vor der Präparation bei Raumtemperatur aufgetaut. Um eine ausreichende Oberflächendesinfektion zu erzielen, werden sie 30 min in 70 % Ethanol inkubiert. Danach erfolgt eine Häutung und eine Zerteilung in ca. 3 bis 4 cm große Stücke, wobei ca. 0,5 cm der dicken Schwanzwurzel und 1 cm des dünnen Schwanzendes verworfen werden. Die gehäuteten Stücke werden mit PBS⁺ gewaschen, 10 min zur Desinfektion in 70 % Ethanol inkubiert und erneut mit PBS⁺ gespült. Anschließend werden die einzelnen Kollagenfasern der vier Kollagenfaserbündel mit Hakenpinzetten herausgezupft und in eine Petrischale mit PBS⁺ überführt. Die Fasern werden mit PBS⁺ und 70 % Ethanol gewaschen, desinfiziert und in 0,5 molarer Essigsäure gelöst. Im Anschluss erfolgt eine spezielle Aufreinigung zur Entfernung der murinen Nukleinsäure. Die gebrauchsfertige Kollagenlösung wird auf einen Proteingehalt von 10 mg/ml eingestellt und bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert. Die Sterilität wird in einem externen Prüflabor analysiert und von diesem bestätigt.

5.2 Reaktor- und Implantatherstellung

Die Herstellung einer verdichteten Implantatmatrix auf der Basis von Kollagen und Hyaluronsäure findet in einem eigens entwickelten Reaktor statt und wird in den Ergebnissen aufgeführt. Das gesamte Handling sowie die Prozessschritte bis zur klinisch relevanten Primärverpackung werden neu etabliert.

5.3 Implantation Humanpräparat

Die Implantation des verdichteten Nukleusimplantats wird im Rahmen der 1. Interkorporellen Fusionstage des Diakonie Klinikums Stuttgart und der Firma Ulrich Medical im anatomischen Institut der Universitätsklinik Tübingen durchgeführt und im Ergenbisteil dieser Arbeit aufgeführt.

5.4 Modifikation des Produkts ChondroFiller^{liquid}

Beim Medizinprodukt ChondroFiller^{liquid} der Amedrix GmbH handelt es sich um eine Zweikammerspritze, die mit saurem Kollagen und Gelneutralisationslösung (GNL) gefüllt ist (Abb. 5-1). Über einen Mischadapter können die Komponenten im Verhältnis 4:1 arthroskopisch in Knorpeldefekte in flüssiger Form implantiert werden, so dass sich in vivo innerhalb weniger Minuten eine formstabile und passgenaue Implantatmatrix bildet, die selbst feinste Läsionen ausfüllt. Dieses System könnte auch bei der Regeneration eines degenerierten Bandscheibenkerns Verwendung finden. So wäre es denkbar, dass das Produkt entweder in Kombination mit dem verdichteten Nukleusimplantat zur Füllung etwaiger Hohlräume eingesetzt werden könnte, um somit eine lückenlose Verbindung zwischen Implantat und nativem Gewebe herzustellen, oder um als alleiniges Implantatmaterial bei höhenreduzierten Segmenten den Gewebeaufbau zu unterstützen. Neben einer unveränderten Variante des Produkts ChondroFiller^{liquid} wird auch hier versucht, das Quellpotential zu steigern und der GNL Hyaluronsäure in einer Konzentration von 10 mg/ml beigemischt. Die Endkonzentration von HA im Gel beträgt 8 mg/ml. Die Befüllung der Zweikammerspritzen erfolgt vorderseitig manuell durch Kanülen. Die Spritzengehäuse und die Kollagenlösung werden vorab durch γ -Bestrahlung sterilisiert. Die GNL wird autoklaviert. Die Lagerung bis zur Verwendung erfolgt bei -20 °C.

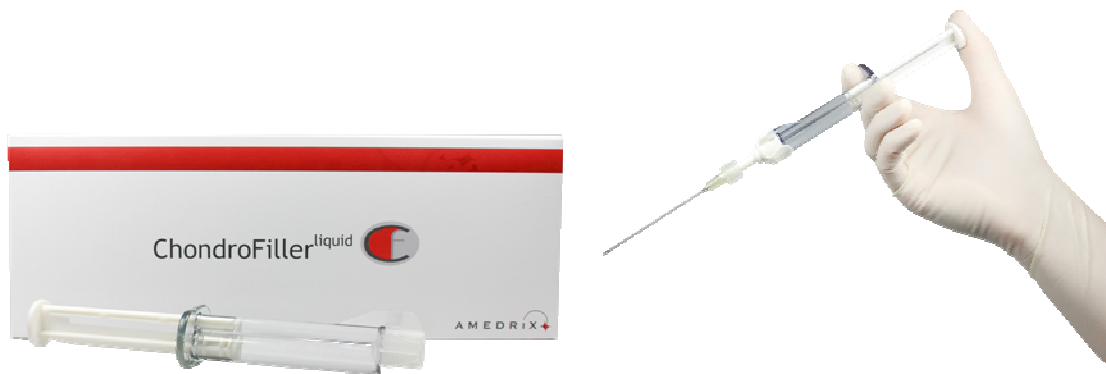


Abbildung 5-1: Zweikammerspritze ChondroFiller^{liquid} der Amedrix GmbH zu regenerativen Behandlung artikulärer Knorpeldefekte.

5.5 Carbazol Assay

Der Carbazol Assay nach May and Chakrabarty dient der Untersuchung des Hyaluronsäuregehalts bzw. dem Verlust in den Nucleusimplantaten bei der Herstellung und im Verlauf der Matrix-Kultivierung mit Zellen. Dazu wird die bei der Verdichtung herausgepresste Flüssigkeit gesammelt bzw. Proben aus dem Mediumüberstand entnommen und analysiert. Begonnen wird mit der Erstellung einer Kalibriergeraden. Dazu werden Referenzstandards mit unterschiedlichem Gehalt an Hyaluronsäure hergestellt. Der Assay ist sensibel im Bereich von $10 \mu\text{g/ml}$ bis $1.000 \mu\text{g/ml}$. Als Negativkontrolle dient GNL ohne Zusatz. In 1,5 ml Tubes werden $870 \mu\text{l}$ Boratarbeitslösung vorgelegt. Zur Boratarbeitslösung werden jeweils $101 \mu\text{l}$ der hyaluronsäurehaltigen GNL-Lösungen pipettiert. Nach vortexen werden $29 \mu\text{l}$ Carbazollösung hinzugefügt. Es folgt erneutes vortexen. Die anschließende Inkubation findet 30 min auf einem Heizblock bei $55 \text{ }^\circ\text{C}$ statt. Anschließend werden jeweils $70 \mu\text{l}$ in eine Küvette überführt und bei 530 nm photometrisch vermessen. Nach der Erstellung der Kalibriergeraden werden je 3 Proben der zu testenden Flüssigkeit analysiert. Über die Steigung der Kalibriergeraden kann anschließend der Probengehalt ermittelt werden.

5.6 Ermittlung des Quellpotentials

Die Methoden in den Kapiteln 5.5 bis 5.7 dienen der Charakterisierung der veränderten Materialeigenschaften beider Implantatmatrices nach dem Zusatz von Hyaluronsäure.

Wie in der Einleitung beschrieben, sollte sich ein Nukleusersatz durch eine hohe Wasserbindungskapazität auszeichnen, um Höhenminderungen in Ruhe ausgleichen zu können. Die verdichtete Kollagenmatrix wird, wie in Kapitel 5.1 beschrieben, mit und ohne den Zusatz von Hyaluronsäure hergestellt und in ca. 1x1 cm große Stücke geschnitten. Pro Auswertungszeitpunkt erfolgt die Analyse von je 5 Stücken. Ob und inwieweit das Polysaccharid das Quellpotential positiv beeinflusst, wird über Gewichtsbestimmungen nach definierten Inkubationszeitpunkten zwischen 0 und 180 min in PBS⁺ mit einer Temperatur von 37 °C im Vergleich zum Trockengewicht analysiert. Der Quellungsfaktor wird rechnerisch ermittelt und ergibt sich durch das Gewichtsverhältnis der trockenen zur feuchten Matrix. ChondroFiller^{liquid} wird aus technischen Gründen nicht untersucht. Stattdessen erfolgt eine rheologische Messung.

5.7 Rheologische Messungen

Zur Bestimmung der viskoelastischen Eigenschaften der verdichteten Kollagenmatrix mit und ohne den Zusatz von Hyaluronsäure werden rheologische Messungen am Rotationsrheometer Bohlin CVOR-150 nach den Parametern in Tabelle 5-1 durchgeführt. Je zwei Gele zweier Kollagenchargen werden in einer 12-Well-Platte mit einer Höhe von 10 mm hergestellt. Jede Probe ist mittig in der Messgeometrie positioniert und wird vermessen. Es erfolgt ein Frequenzsweep, um die Abhängigkeit der elastischen Materialeigenschaften von der Rotationsfrequenz zu bestimmen. Die verdichtete Implantatmatrix kann aus technischen Gründen nicht untersucht werden.

Tabelle 5-1: Übersicht über die Parametereinstellungen des Frequenzsweeps

Parameter	Wert
Stempelgeometrie	PP22
Vorscherung	keine
minimale Frequenz [Hz]	0.0169
maximale Frequenz [Hz]	15
Anzahl Messwerte	15
Messwertverteilung	logarithmischer Abstand
Verzögerungszeit [s]	2
Integrationszeit	1 Periode, 512 Punkte
Steuerung	Deformationsregelung
Deformation	0.001
Initial Stress [Pa]	73.37
Rampe	abwärts
Steady Flow [Pa]	0
Temperaturprofil	isotherm, 23 °C
thermische Ausgleichszeit [s]	0

5.8 Spannungs-Kompressions-Messungen

Zur weiteren Charakterisierung der Materialeigenschaft der verdichteten Kollagenmatrix mit und ohne den Zusatz von Hyaluronsäure werden Spannungs-Kompressions-Messungen am Fraunhofer Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik durchgeführt. Wie in Abb. 5-2 dargestellt, wird die Implantatmatrix zunächst auf der Waage platziert und der Stempel auf eine definierte erste Position heruntergefahren bis er die Probe nahezu berührt, jedoch keine Kraft über die Waage messbar ist. Über den Motor wird die Probe nun auf eine 2. definierte Position komprimiert. Als Messdaten werden in LabVIEW aufgezeichnet z. B. die Kraft in Newton (N), die während der Komprimierung auf die Waage ausgeübt wird sowie die benötigte Strecke des Stempels in mm. Über diese Daten kann die Zugspannung σ in Pascal (Pa) und die Verformung ϵ in Prozent (%) berechnet und anschließend in Excel in einem Spannungs-Kompressions-Diagramm dargestellt werden (Rütschle, 2012). Es findet eine Vermessung von zwei

Matrices -HA-Zusatz und drei Matrices +HA-Zusatz mit einem Durchmesser von 24 mm statt. Diese werden vor der Messung 1 h zur Quellung isotherm in PBS⁺ inkubiert.

Berechnungsformeln:

$$\epsilon = \Delta \text{Position (Position 2 – Position 1)} / \text{Probenhöhe} \quad \text{in [\%]}$$

$$\sigma = \text{Kraft [N]} / \text{Probenoberfläche [m}^2\text{]} \quad \text{in [Pa]}$$

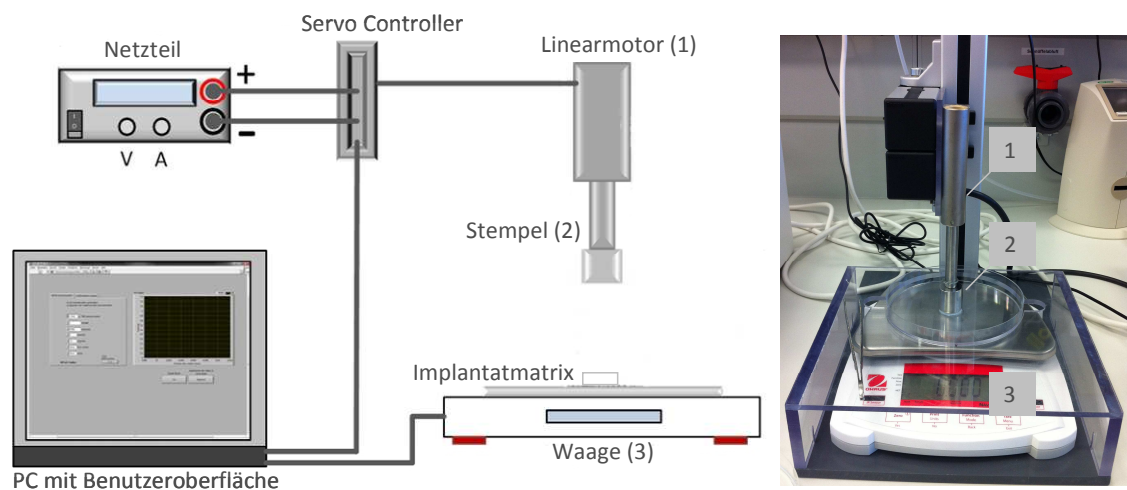


Abbildung 5-2: Anlagenaufbau zur Spannungs-Kompressions-Messung der verdichteten Implantatmatrix am Fraunhofer IGB – Aufbau von Waage und Linearmotor, Benutzeroberfläche für PC und Netzteil zur Steuerung des Servo Controllers

5.9 Isolierung und Kultivierung boviner Bandscheibenzellen

Die Isolierung boviner Bandscheibenzellen (bBSZ) erfolgt aus den Schwänzen zweier Rinder der Rasse: süddeutsches Fleckviehes vom Schlachthof Gärtringen; Alter: ca. 24 Monate; Geschlecht: männlich.

Zur Entfernung grober Verschmutzungen ist eine gründliche Reinigung der Präparate mit Wasser und Seife notwendig. Zusätzlich werden lange Haare mit einer Schere abgetrennt. Um eine ausreichende Oberflächendesinfektion zu erreichen, erfolgt eine 15 min Desinfektion in Medizid Rapid und 70 % Ethanol. Die Präparation findet unter der Laminar Air Flow (LAF) statt. Das Präparat liegt auf der dorsalen Seite. Die ventrale Seite ist relativ haararm und eignet sich daher besser zur Inzision. Restliche Haare werden mit einem desinfizierten Rasierer entfernt. Mit einem Skalpell werden die einzelnen Gewebeschichten von Haut und Muskeln durchtrennt. Die Wirbelkörper wer-

den so weit von Gewebe befreit, bis das Bewegungssegment eindeutig zu lokalisieren ist. Um die Bandscheibe freizulegen, findet, wie in Abb. 5-3 dargestellt, eine Durchtrennung von ventral nach dorsal entlang der Endplatten statt.

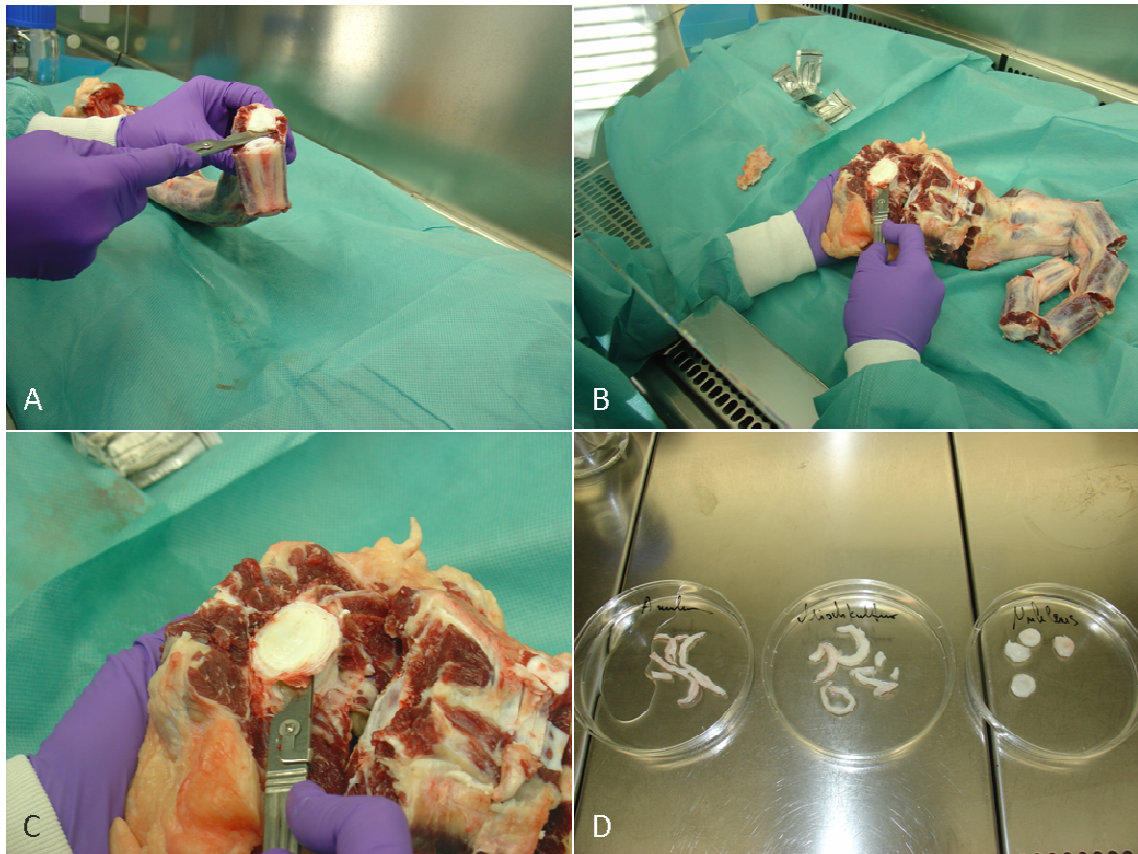


Abbildung 5-3: Isolation boviner Bandscheiben. A, B + C Schneiden des gehäuteten Rinderschwanzes entlang der Endplatten zur Isolation einzelner Bandscheiben mit einem Skalpell; D Teilbereiche der Bandscheibe: Anulus, Übergangszone und Nukleus

Im Anschluss hieran wird die Bandscheibe von der zweiten Endplatte abgetrennt und in eine Petrischale mit PBS⁺ überführt. Insgesamt werden 7 Bandscheiben pro Präparat isoliert. Um ausschließlich Bandscheibenzellen zu isolieren, ist restliches Muskelgewebe mit einer chirurgischen Schere komplett zu entfernen. Jeder Discus wird in drei Bereiche zerteilt (Abb. 5-3 D). Um sicher zu stellen, dass Nukleuszellen getrennt von einer Mischkultur aus Nukleus- und Anuluszellen kultiviert werden können, ist zunächst der äußere Bereich des Faserrings zu entfernen und zu verwerfen. Darauf folgend wird der innere Bereich des Anulus mit Teilen des Nukleus abgetrennt und in PBS⁺ überführt. Übrig bleibt nun der innere Teil des Kerns, der ausschließlich Nukleuszellen enthält. Alle erhaltenen Teilbereiche werden in kleine Stücke zerschnitten und in T75 Zellkulturflaschen überführt. Der Kollagenaseverdau erfolgt über Nacht im Brutschrank bei

einer Temperatur von 37 °C; bestehend aus 18 ml Medium (DMEM ohne FBS, mit 1 % Gentamicin) und 2 ml Kollagenase. Nach 24 h wird der Überstand aus jeder Flasche entfernt und bei 480 x g zentrifugiert. Das Pellet wird in 5 ml Medium resuspendiert und auf neue Zellkulturflaschen verteilt. Der Medienwechsel erfolgt alle 3-4 Tage (DMEM mit 10 % FBS, mit 1 % Gentamicin). Ab einer Konfluenz von 80 % werden die Zellen mit 0,25 % Trypsingebrauchslösung abgelöst und passagiert. Die Ermittlung der Zellzahl und Viabilität erfolgt über das Zellzählgerät CASY. Alle Zellen werden bis zur Verwendung in einer Konzentration von 1×10^6 Zellen pro ml Biofreeze in flüssigem Stickstoff kryokonserviert. Für die Versuche wird die Passage 2 und 3 der Nucleuszellen und Mischkulturen verwendet.

5.10 Isolierung und Kultivierung humaner Bandscheibenzellen

Die humanen Bandscheibenzellen (hBSZ) werden aus verworfenem Bandscheibengewebe im Zuge operativer Maßnahmen wie z. B. einer Nucleotomie oder Spondylodese isoliert. Das Gewebe wird unmittelbar nach der Entnahme in Transportmedium überführt (DMEM mit 1 % Gentamicin) und innerhalb von 24 h aufgearbeitet. Da eine optische Unterscheidung von Anulus- und Nucleusgewebe nicht möglich ist, wird das gesamte Gewebe mit einem Skalpell zerkleinert und analog zu den bBSZ über Nacht durch Kollagenase verdaut. Die Primärkultur wird bis zu Passage 3 kultiviert und direkt für die Versuchsansätze verwendet. Zur Verwendung kommen die Passagen 2 und 3.

5.11 Kultivierung mesenchymaler Stammzellen

Die humanen mesenchymalen Stammzellen (hMSC) werden nach ihrer Isolation aus Hüftköpfen am Lehrstuhl für Tissue Engineering und Regenerative Medizin der Universitätsklinik Würzburg als Monolayer in Zellkulturflaschen kultiviert und an die Amedrix GmbH per Kurier versendet. Nach ihrer Ankunft wird das überflüssige Medium entfernt und die Kultivierung im Brutschrank bei 37 °C fortgesetzt. Der Wechsel des Mediums erfolgt alle 3-4 Tage (DMEM/HAM's F12 mit 10 % FBS, mit 1 % Gentamicin). Ab einer Konfluenz von 80 % werden die Zellen abgelöst und für die Versuche in den Passagen 2 und 3 verwendet. Innerhalb der Kultivierung in der Kollagenmatrix von Chond-

roFiller^{liquid} wird zur chondrogenen Differenzierung das StemPro Chondrogenesis Differentiation Kit eingesetzt.

5.12 In vitro Zytotoxizitätstest an Monolayerkulturen

Zur Klärung, ob die Zusammensetzung von Kollagen und Hyaluronsäure in der verdichteten Implantatmatrix nach der notwendigen Endsterilisation durch γ -Strahlen zu zytotoxischen Veränderungen führt, wird in Anlehnung an die Norm DIN ISO 10993 eine Prüfung auf Zytotoxizität an Monolayerkulturen boviner und humaner Bandscheibenzellen durchgeführt. Verdichtete Implantatmatrices +/- HA-Zusatz werden bei 25 kGy bestrahlt und mit unbestrahlten Matrices derselben Charge verglichen. Da für die hyaluronsäurehaltige GNL im modifizierten Produkt ChondroFiller^{liquid} auch eine Sterilisation durch Dampf möglich ist und eine γ -Bestrahlung umgangen werden kann, sind keine toxischen Veränderungen möglich. Eine Testung auf Zytotoxizität entfällt daher.

Zur Extrakterstellung werden 3 ml Matrix in 9,5 ml Extraktionsmedium (DMEM + 10 % FBS + 1 % Gentamicin) für 72 +/- 2 h bei einer Temperatur von 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank inkubiert. Als Blindlösung wird dasselbe Medium ohne Matrixanteil inkubiert. Als Positivkontrolle dient 1 % SDS-Lösung, als Negativkontrolle nicht-inkubiertes Medium.

Zur Ermittlung der optimal einzusetzenden Zellzahl, erfolgt eine Zelltitration. In einer 96-Well-Platte werden in einem 5fach Ansatz je 1.000, 5.000, 10.000, 25.000, 50.000, 75.000 und 100.000 Zellen in 200 μ l Medium gesät. Nach einer Adhärenzzeit von 4 h im Brutschrank wird das Medium durch Frisches ersetzt und für weitere 72 h kultiviert. Um die Proliferation der Zellen zu bestimmen wird der Assay EZ4U, eine Weiterentwicklung des MTT- Assays, verwendet, bei dem nicht-toxische, schwach gelbe Tetrazoliumverbindungen in rote Formazanderivate verstoffwechselt werden: pro Well werden 20 μ l Farbstofflösung (Substrat + Aktivator) und 200 μ l Medium pipettiert. Nach einer Inkubationszeit von 4 h im Brutschrank wird die Platte im ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 492 nm gemessen.

Auf Grund des linearen Zusammenhangs zwischen Zellzahl und Proliferation im Rahmen der Ergebnisse der Zelltitration werden je 5.000 Zellen pro Well in 200 μ l Medium ausgesät und 4 h zur vollständigen Adhärenz im Brutschrank inkubiert. Anschließend

wird das Medium durch 200 µl der Extraktlösung ersetzt und für 72 +/- 2 h bei einer Temperatur von 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank weiter inkubiert. Nach dem Ablauf dieser Zeit wird der Extrakt abgenommen und analog zur Titration durch 220 µl Farbstofflösung und Medium ersetzt. Nach einer 4-stündigen Inkubation wird die Platte im ELISA bei 492 nm gemessen. Die daraus erhaltenen Absorptionen werden als Prozent der Proliferation im Vergleich zur Negativkontrolle, die einer Proliferation von 100 % entspricht, berechnet.

5.13 Inkubation von Zellen in verschiedenen Gelneutralisationslösungen

Zur Ermittlung der maximalen Inkubationsdauer von Zellen in Gelneutralisationslösung ohne Schäden oder Zellverluste werden hMSC und bBSZ verwendet. Die Zellen werden, wie in Kapitel 4.8 beschrieben, enzymatisch aus den Zellkulturflaschen gelöst und mit dem CASY-Zellzählgerät gezählt. Getestet wird die Inkubation in der 5GNL-MP mit einer Osmolarität von 1501 mOsmol/l und der 10GNL-MPLN mit einer Osmolarität von 1045 mOsmol/l. Da die 10GNL-MPLN unter klinischen Bedingungen 1:1 mit Zellsuspension gemischt werden würde, findet unter in vitro Bedingungen stattdessen eine Verdünnung mit Medium statt. Als Negativkontrolle wird Medium verwendet. Die Zellen werden in einer Konzentration von 1×10^6 Zellen/ml in den GNLS resuspendiert und darin bis zu 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 5, 10, 20 und 30 min werden im Rahmen einer Dreifachbestimmung je 3 x 100 µl der Zellsuspension (1×10^5 Zellen) pro Zelltyp und Auswertungszeitpunkt entnommen und in T25-Zellkulturflächen mit 5 ml Medium überführt. Es erfolgt eine Kultivierung von 48 h im Brutschrank. Im Anschluss werden die Zellen enzymatisch abgelöst und deren Zahl und Viabilität über das CASY-Zellzählgerät ermittelt.

5.14 Zellkulturansätze - Implantatmatrices

Alle Zellkulturansätze werden als Mehrfachansätze mit mindestens 3 Spendern für humane Zellen und 2 Spendertieren für bovine Zellen durchgeführt, um die Ergebnisse zu validieren. Die hMSC werden stets chondrogen differenziert (siehe Kapitel 5.14).

5.14.1 Besiedlung und Zellkultur der verdichteten Implantatmatrix mit Bandscheibenzellen

Mit einer chirurgischen Schere werden 1 cm^2 Stücke der Matrices +/- Hyaluronsäure hergestellt und einzeln in einer 24-Well-Platte platziert. Anschließend findet eine einstündige Äquilibrierung in $500 \mu\text{l}$ Medium im Brutschrank statt. Pro Zelltyp (bBSZ und hBSZ) werden 1×10^4 Zellen in $30 \mu\text{l}$ Medium auf die Oberfläche ausgesät. Nach einer Adhärenzzeit von 3 h im Brutschrank werden die Ansätze behutsam mit $400 \mu\text{l}$ Medium überschichtet. Der Medienwechsel erfolgt 2 x wöchentlich, wobei die Menge des Mediums nach 2 Wochen auf 1,5 ml erhöht wird. Die Kultivierung erfolgt über einen Zeitraum von bis zu 10 Wochen. Sobald die Zellen einen Monolayer am Boden des Wells bilden, werden die Matrices mit einer Pinzette umgesetzt. In regelmäßigen Abständen werden folgende Untersuchungen, die in den Methoden-Kapiteln beschrieben werden, durchgeführt: Carbazol Assay, Lebend-/Totfärbung, Bestimmung der Zellzahl und Viabilität, histologische Azanfärbung und qualitative PCR.

5.14.2 Besiedlung und Zellkultur von ChondroFiller^{liquid} mit Bandscheiben- und Stammzellen

Auf Grund des begrenzten Volumens von ChondroFiller^{liquid} auf 2,3 ml wird für die Herstellung der zahlreichen Versuchsansätze auf die Verwendung der Zweikammerspritze und des Mischadapters verzichtet. Alle Komponenten und Reagenzien entsprechen jedoch dem des Endmedizinprodukts: So wird ausschließlich γ -bestrahtetes Rohkollagen verwendet.

In 24-Well-Platten werden zelluläre Hydrogele mit einer Zellzahl von 6×10^4 Zellen pro Gel hergestellt. Verwendet werden die Zelltypen bBSZ, hBSZ und hMSC. Ein Gel besteht aus $500 \mu\text{l}$ Kollagen, 62,5 ml 5GNL-MP (+/- Hyaluronsäure) und 62,5 ml Medium, wobei die Zellen in der GNL zuvor resuspendiert werden. Die homogene Vermischung der Komponenten erfolgt durch Resuspension mittels einer serologischen Pipette. Die Portionierung in die Wells findet mit einer 5 ml Einwegspritze statt. Nach der 10 min Gelierung im Brutschrank werden die Ansätze in 12-Well-Platten umgesetzt und mit 2,5 ml Medium überschichtet. Der Medienwechsel erfolgt 2 x wöchentlich. Die Kultivierung erstreckt sich über einen Zeitraum von 4 Wochen. In regelmäßigen Abständen

werden folgende Untersuchungen, die in den Methoden-Kapiteln beschrieben werden, durchgeführt: Bestimmung der Zellzahl und Viabilität, histologische Azanfärbung und qualitative PCR.

Zur Analyse der Glykosaminoglykan-Synthese werden Gele mit einer Konzentration von 1×10^6 Zellen pro ml und einem Gesamtvolumen von 1 ml hergestellt. Hierfür wird ausschließlich die GNL mit Hyaluronsäure Zusatz verwendet.

5.14.3 Migration - in vitro Simulationsmodell

Um zu beobachten, wie schnell die verdichtete Implantatmatrix von Zellen besiedelt werden kann, wird ein in vitro Modell zur Simulation der Verhältnisse in vivo entwickelt. Dem Produkt ChondroFiller^{liquid} entsprechend, werden zelluläre Gele mit einer Konzentration von 1×10^6 Zellen/ml in einer 24-Well-Platte hergestellt. Unmittelbar vor der Gelierung wird in die Masse ein Stück der azellulären verdichteten Implantatmatrix eingebettet, so dass diese komplett umschlossen wird. Nach einer Gelierdauer von 10 min im Brutschrank werden die Ansätze in eine 12-Well-Platte überführt und mit 2,5 ml Medium überschichtet. Die Kultivierung erfolgt über einen Zeitraum von 10 w. Verwendet werden die Zelltypen bBSZ und hBSZ. Die Ansätze werden in regelmäßigen Abständen histologisch analysiert.

5.14.4 Migration - ex vivo Ansatz

Ein weiterer Schritt zur Beobachtung der Zellbesiedlung der beiden Implantatmatrices werden Bandscheiben aus einem Rinderschwanz, wie in Kapitel 5.8 beschrieben, isoliert. Mit einer chirurgischen Schere wird ein Teil des Nukleusgewebes entfernt. In die teil-nukleotomierte Bandscheibe wird eine verdichtete Implantatmatrix mit den Maßen 1x1 cm implantiert. Unmittelbar zuvor wird die trockene Implantatmatrix zur Befeuchtung 30 min in Medium äquilibriert. Zur Verschließung übriger Hohlräume und als Brücke/Verbindung für die bovinen Nukleuszellen aus dem umgebenden Nukleusgewebe werden je 1 ml azelluläre Kollagenmatrix über das System ChondroFiller^{liquid} appliziert (Abb. 5-4). Nach einer Gelierung von 10 min im Brutschrank, werden die ex vivo Ansätze in sterile Becher überführt, im Anschluss mit 35 ml Medium überschichtet und bis zu 13 w kultiviert. Die Analyse erfolgt über die Färbung histologischer Schnitte.

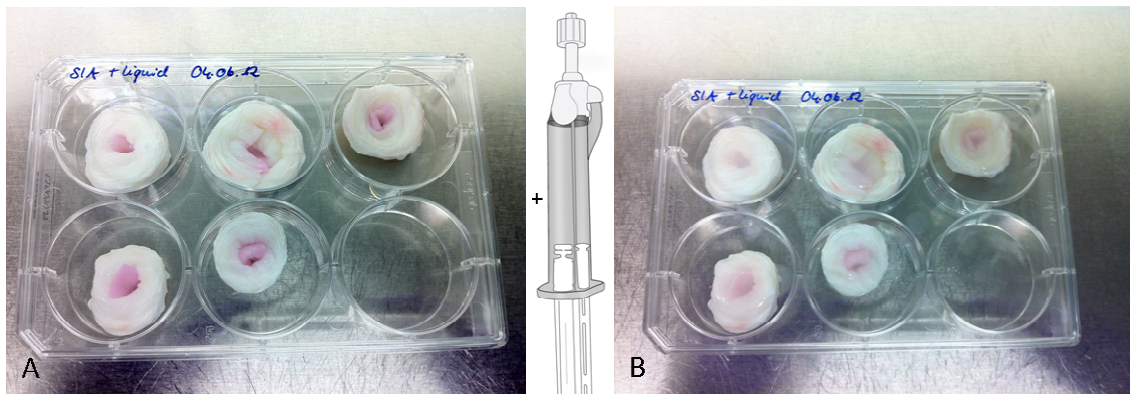


Abbildung 5-4: Ex vivo Ansatz. A: Bovine teil-nukleotomierte Bandscheiben mit implantierter verdichteter Implantatmatrix; B: Füllung der Hohlräume mit ChondroFiller^{liquid}

5.15 Lebend-/Totfärbung

Zunächst wird die trockene, verdichtete Implantatmatrix zur Befeuchtung 1 h im Brutschrank in Medium äquilibriert. Zur Beobachtung der Proliferation und Besiedlung der verdichteten Implantatmatrix werden je 2.000 Zellen, bBSZ, hBSZ und hMSC, in 20 μ l Medium auf eine Matrixfläche von 1x1 cm gesät. Die Matrixstücke befinden sich dabei in einer 12-Well-Platte. Nach einer Adhärenzzeit von 3 h wird die Matrix vorsichtig mit 1,5 ml Medium überschichtet. Die Lebend-/Totfärbung wird nach einer Kultivierungsdauer von 1 d und 7 d durchgeführt. Bei der Lebend-Tot-/Färbung handelt es sich um eine Färbung mit den Fluoreszenzfarbstoffen Fluoresceindiacetat (FDA) und Propidiumjodid (PI). Die grüne Erscheinung lebender Zellen durch das FDA beruht auf der Umsetzung des Stoffs in Fluorescein. Das FDA kann die lipophile Membran der Zellen passieren und dort von Esterasen gespalten werden. Das polare Fluorescein verbleibt in der intakten Zelle. Propidiumjodid hingegen ist ein DNA-Farbstoff, der nur in beschädigte Zellen mit defekter Membran eindringen kann. Im Kern lässt das PI die DNA rot erscheinen (Mulisch, 2010). Die Fluoreszenzlösung besteht aus 10 ml PBS⁺, 20 μ l PI und 2 μ l FDA. Jede Matrix wird mit dieser Lösung vollständig überschichtet und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Unmittelbar im Anschluss werden Aufnahmen mit dem Fluoreszenzmikroskop getätigt. Die Dokumentation der FDA-Färbung erfolgt bei Wellenlängen von 490-514 nm. Bei PI handelt es sich um Wellenlängen von 510-560 nm.

5.16 Bestimmung der Zellzahl und Viabilität mit der Neubauer Zählkammer

Der Verdau einer Implantatmatrix erfolgt durch die Zugabe von 1 ml Kollagenase/PBS⁺ im Verhältnis 1:1 für 2 h im Brutschrank. Um eine größere Oberfläche zu erreichen, wird die Matrix zuvor mit einem Skalpell zerkleinert. Die Zellsuspension wird resuspendiert, um Verklumpungen zu lösen. Für die nachfolgende Bestimmung der Zellzahl werden 2x50 µl entnommen und in eine 96-Wellplatte pipettiert. Es folgt eine Vermischung mit 50 µl Trypanblau und eine Inkubation von 3 min. Die Zell-Farbstoff-Suspension wird nach Ablauf der Zeit in die Neubauer-Zählkammer pipettiert und bei 100-facher Vergrößerung am Mikroskop betrachtet. Lebende Zellen transportieren den Farbstoff wieder heraus und sind daher nicht gefärbt. Tote Zellen stellen sich als dunkelblau gefärbt dar. Es werden je vier Kammern pro 2x50 µl Probe gefüllt und die Zellen innerhalb der Großquadrate gezählt. Die Lebendzellzahl ergibt sich aus dem Kammerfaktor 10.000, dem Verdünnungsfaktor 2 auf Grund der Vermischung mit Trypanblau und dem Volumen der Zellsuspension und der Anzahl der lebenden Zellen pro Großquadrat.

Berechnungsformel:

$$\text{Zellzahl/ml} = \text{Verdünnungsfaktor} \times (\text{in 4 Großquadraten gezählte vitale Zellen}/4) \times 10.000$$

Die Viabilität ergibt sich aus dem Verhältnis lebender Zellen zur Gesamtzellzahl.

5.17 Fixieren, Einbetten und Azanfärbung

Die Implantatmatrices werden in 4 % Formaldehyd 24 h inkubiert. Anschließend werden die Proben in einem Einbettautomat entwässert und in Paraffin überführt. Das Programm des Automats gliedert sich in zwölf Schritte. Zunächst wird die Probe zweimal in VE-Wasser gespült. Es folgt je ein Schritt in einer aufsteigenden Alkoholreihe von 70, 90 und 96 % Ethanol, um die Fixierlösung möglichst vollständig aus der Probe zu entfernen. Anschließend erfolgen drei Schritte in Isopropanol und zwei Schritte in Xylol, um die Probe in den letzten zwei Schritten in Paraffin überführen zu können. Die Details über die Dauer der einzelnen Schritte sind in der nachfolgenden Tabelle aufgeführt:

Tabelle 5-2: Schritte der Paraffinierung

Schritt	Zeit [h]	Inkubation in
1	4	VE-Wasser I
2	4	VE-Wasser II
3	6	Ethanol 70 %
4	6	Ethanol 90 %
5	6	Ethanol 96 %
6	6	Isopropanol I
7	6	Isopropanol II
8	6	Isopropanol III
9	6	Xylol I
10	6	Xylol II
11	6	Paraffin I
12	6	Paraffin II

Nachdem histologische Schnitte am Mikrotom in einer Stärke von 5 µm auf Objektträgern hergestellt werden, erfolgt eine histologische Färbung. Bei der Azanfärbung nach Martin Heidenhain handelt es sich um eine Mehrfach- oder Trichom-Färbung. Der Name setzt sich aus den beiden Farbstoffen Azokarmin G und Anillinblau-Goldorange zusammen. Sie wird zum Differenzieren von Zellbestandteilen, extrazellulären Bindegewebsfasern und Geweben genutzt. Kollagene Bestandteile färben sich blau, Zellkerne und Zytoplasma rot. Tabelle 5-3 zeigt die einzelnen Schritte der Entparaffinierung und Azanfärbung der histologischen Schnitte.

Tabelle 5-3: Schritte der Entparaffinierung und Azanfärbung

Schritt	Zeit [min]	Inkubation in	Prozess
1	20	60 °C Trockenschrank	Anschmelzen
2	8	Neoclear® I	Entparaffinierung
3	8	Neoclear® II	Entparaffinierung
4	2x2	Ethanol 100 %	Entparaffinierung
5	2	Ethanol 70 %	Entparaffinierung
6	2	Ethanol 50 %	Entparaffinierung
7	3x1	VE-Wasser	Wässern
8	12	Azokarmin + 1 % Essigsäure	Färben
9	3x1	VE-Wasser	Waschen
10	50	Phosphorwolframsäure 5 %	Differenzieren
11	3x1	VE-Wasser	Wässern
12	60	Anillinblau-Orange-G	Färben
13	3x1	VE-Wasser	Waschen
14	2x1	Ethanol 96 %	Entwässern
15	5	Isopropanol I	Entwässern
16	5	Isopropanol II	Entwässern
17	3	Xylol I	Intermedium
18	3	Xylol II	Intermedium
Eindecken mit Entellan neu®			
Mikroskopische Bildaufnahmen über NIS-Elements			

5.18 Qualitative PCR

Die Gesamt-RNA der Zellen wird unter der LAF mit dem RNeasy® Mini Kit von Qiagen isoliert.

Die über einen Kollagenaseverdau erhaltenen Zellen werden zentrifugiert. Das Pellet wird in 350 µl RLT-Puffer mit 1 % Mercaptoethanol resuspendiert, lysiert und in ein Eppendorfgefäß überführt. Die Lyse der Zellen wird durch Resuspension mit einer Kanüle unterstützt. Die Proben werden bis zur weiteren Analyse bei -20 °C zwischengelagert oder direkt verwendet. Zum Fällern der RNA werden zu jeder Probe 350 µl Ethanol gegeben. Das gesamte Volumen wird auf die RNeasy®-Mini-Spin-Column aufgetragen

und 15 s bei 10.000 rpm zentrifugiert. Der Durchfluss wird verworfen. Nach mehreren Waschschritten mit RW1-Puffer und RPE-Puffer, mit anschließenden Zentrifugationen, wird die RNA eluiert. Hierzu werden 30 µl RNase freies Wasser direkt auf die Säule gegeben und 1 min bei 10.000 rpm zentrifugiert. Um den RNA-Gehalt zu bestimmen, werden Proben der eluierten RNA 1:10 mit PCR-Wasser verdünnt, in eine Küvette pipettiert und bei 260 nm im Photometer gemessen. Der RNA-Gehalt errechnet sich aus folgender Formel:

$$\text{RNA-Gehalt bei 260 nm } (\mu\text{g/ml}) = \text{OD 260} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 40 \mu\text{g/ml}$$

Für die cDNA-Synthese werden ausschließlich Reagenzien des cDNA-Synthese-Kit, Roche diagnostics verwendet. Zum Annealing der Primer und zur Linearisierung der RNA wird 1 µg der zuvor isolierten DNA in maximal 8,2 µl PCR-Wasser vorgelegt und mit 2 µl Oligo-dT-Gemisch versetzt. Die Proben werden dann 5 min im Thermocycler bei 68 °C und 10 min bei 4 °C inkubiert. Anschließend wird für die Gesamtzahl der Proben ein Mastermix aus folgenden Reagenzien hergestellt: pro Probe 2 µl 10 x Reaktionspuffer, 2 µl dNTPs, 4 µl MgCl₂ (25 nM), 1 µl RNase-Inhibitor und 0,8 µl Reverse Transkriptase. Jeweils 9,8 µl Mastermix werden zu jeder Probe gegeben. Die Amplifikation der cDNA erfolgt im Thermocycler nach folgendem Programm:

Tabelle 5-4: Schritte der cDNA-Synthese

Temperatur [°C]	Dauer [min]	Prozess
25	10	Annealing der Oligo-dTs
42	60	Reverse Transkription
99	5	Inaktivierung der Reversen Transkription
4	5	Abkühlen zur Produktstabilisierung

Für die qualitative PCR werden ausschließlich Reagenzien des PCR-Kit, Roche diagnostics verwendet. Die Proben werden mit 8 µl PCR-Wasser, 12,5 µl PCR-Master 1 µl forward und 1 µl reverse Primer im Verhältnis 1:5 verdünnt. Die Reagenzien werden als Mastermix angesetzt, von dem je 22,5 µl zu je 2,5 µl verdünnter cDNA pipettiert werden. Die Analyse erfolgt für folgende Matrixmoleküle: Aggrekan, Kollagen-I, Kollagen-II, MMP-2 und GAPDH. Die Kollagen Typ II Expression wird als Marker für den Differenzierungsgrad der MSC angesehen. Kollagen Typ I ist ein typisches Matrixprotein. Aggrekan ist das am häufigsten zu findende Proteoglykan in Bandscheiben. MMP-2 aus der Familie der Metalloproteinasen ist am Abbau der extrazellulären Matrix beteiligt. Als Posi-

tivkontrolle dient das housekeeping-Gen Glyceraldehyde 3-phosphate Dehydrogenase (GAPDH). Die Amplifikation erfolgt im Thermocycler nach folgendem Programm:

Tabelle 5-5: Programm PCR

Anzahl der Zyklen	Temperatur [°C]	Dauer [s]	Prozess
1	94	120	Initiale Denaturierung der DNA
35	94	60	Denaturierung der DNA
	58	30	Annealingphase der Primer
	72	90	DNA-Amplifikation
1	72	240	Finale Elongation der DNA
1	4	600	Abkühlen zum Abstoppen der Reaktion

Die gelelektrophoretische Auftrennung der DNA erfolgt in einem 1,5 % Agarosegel unter Verwendung von einfach konzentriertem und frisch angesetztem TAE-Puffer. Die DNA-Leiter setzt sich folgendermaßen zusammen: 0,4 DNA-Leiter (100 bp-DNA-Ladder, Invitrogen), 2 µl Roti[®]-Load-DNA-Probenpuffer und 9,6 µl PCR-Wasser. 10 µl Probe werden mit 2 µl Roti[®]-Load-DNA-Probenpuffer vermischt. Pro Spur werden 10 µl Probengemisch beziehungsweise DNA-Leiter aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgt ca. 1 h 15 min bei einer Spannung von 100 V. Nach erfolgreicher Auftrennung wird das Agarosegel 30 min in Sybr[®]-Green-I Färbelösung (Verdünnung 1:10 000 in 1 x TAE-Puffer) unter Lichtabschluss auf einem Wipp-Schüttler inkubiert. Danach wird mit dem Dokumentationssystem GeneGenius das Gel, mit nun deutlich sichtbaren Banden, fotografiert.

5.19 Glykosaminoglykan Assay

Der Blyscan Assay eignet sich zum quantitativen Nachweis sulfatierter Glykosaminoglykane (sGAG). Durch die Bindung des Farbstoffes 1,9 Dimethylenblau an sulfatierte Glykosaminoglykane und Proteoglykane wie Aggrekan, könne diese spektrophotometrisch quantifiziert werden. Innerhalb der Zellkulturansätze der ChondroFiller^{liquid} Matrix soll für die drei verwendeten Zelltypen bBSZ, hMSC und hMSC ermittelt werden, wie viel sGAG innerhalb eines Kultivierungszeitraums von 21 d synthetisiert werden. Die Syntheserate über einen Zeitraum von 21 d ergibt sich aus der Differenz des Gehalts nach 7 d und nach 28 d. Wie in Kapitel 4.13.2 beschrieben, werden dem Produkt ChondroFil-

ler^{liquid} entsprechend, Gele mit einem Volumen von 1 ml und 1×10^6 Zellen/ml +HA-Zusatz in einer 24-Well-Platte hergestellt. Für alle Gele wird dieselbe Kollagen- und GNL-Charge eingesetzt. Als Zelltypen werden bBSZ, hBSZ und hMSC von je 3 Spendern verwendet. Die bovinen und humanen Bandscheibenzellen werden in DMEM + 10 % FBS + 1 % Gentamicin kultiviert, wohingegen die Stammzellen chondrogen differenziert werden. Die Kultivierung erfolgt über einen Gesamtzeitraum von 28 d. Nach 7 d und 28 d werden die Ansätze bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren und anschließend lyophilisiert. Jede Probe wird in einem 1,5 ml Eppendorfgefäß in 1 ml Kollagenaselösung (0,5 ml Kollagenase + 0,5 ml PBS⁺; Mischungsverhältnis 1:1) innerhalb von 3 h vollständig verdaut. Anschließend erfolgt eine Zentrifugation bei $10.000 \times g$ für 10 min. Der Überstand wird abgenommen, in ein neues Eppendorfgefäß überführt und eine 50 µl Probe entnommen. Diese wird mit 1 ml Blyscan-Farbstoff-Reagenz vermischt und 30 min auf einem Schüttler inkubiert. Hierbei bildet sich ein sulfatierter Glykosaminoglykan-Farbstoff-Komplex. Nach einer weiteren Zentrifugation von 10 min bei 13.000 rpm bildet sich ein festes, violettes Pellet, welches nach der Entfernung des Überstandes in 0,5 ml Dissoziations-Reagenz gelöst wird. Nach einer letzten Zentrifugation bei 12.000 rpm für 5 min, werden je 200 µl der Lösung in einer Dreifachbestimmung in eine 96-Well-Platte überführt und bei 656 nm im ELISA-Reader gemessen. Parallel zur Probenanalyse werden Referenzstandards über die GAG-Stammlösung von 1-5 µg hergestellt, aus deren Messergebnissen eine Kalibriergerade erstellt wird. Anhand der Steigung lässt sich der sGAG-Gehalt der Proben rechnerisch ermitteln.

Die verdichtete Implantatmatrix eignet sich aus technischen Gründen (Sensitivitätsgrenzen) nicht für den Blyscan Assay und kann daher nicht analysiert werden.

5.20 Biomechanische Testung

Die biomechanischen Versuche finden am Institut für Unfallchirurgische Forschung und Biomechanik der Universität Ulm statt. Getestet wird ausschließlich die verdichtete Implantatmatrix +HA-Zusatz, da das verwendete Testmodell für Hydrogele ungeeignet ist.

5.20.1 Präparate

Zur Verwendung kommen 6 x L5-L6 lumbale, monosegmentale Kalbswirbelsäulenpräparate. Das lumbale Bewegungssegment gilt auf Grund seiner Ähnlichkeit zur humanen Wirbelsäule als international anerkanntes Prüfmodell (Cotterill et al., 1986, Wilke et al., 1998). Die Lagerung der Präparate findet bei -20 °C statt. Das Auftauen erfolgt schonend über Nacht bei 2-8 °C. Alle Weichteile werden unter Erhalt der biomechanisch relevanten Strukturen abgetrennt, so dass die Hälfte des kranialen sowie des kaudalen Wirbelkörpers in Polymethylmethacrylat (PMMA) horizontal eingebettet werden kann. Um eine stabile Einspannung in die Testapparaturen zu ermöglichen, erfolgt eine Befestigung mittels angeschraubter Flansche an den PMMA-Blöcken.

Die durchgeführten biomechanischen Testungen beinhalten Flexibilitäts- und Höhenmessungen sowie eine zyklische Dauerbelastung der lumbalen Segmente in 3 unterschiedlichen Zuständen im Verlauf: intakt, nukleotomiert und implantiert.

Nach den Intaktmessungen erfolgt die Nukleotomie. An jedem Präparat wird eine Inzision rechtslateral am Anulus entlang der äußeren Faserorientierung gesetzt. Das Ausräumen des Nukleus findet mittels 60 ° gewinkelter und gerader Caspar Rongeuere statt. Pro Präparat werden 0,8 g Nukleusgewebe entfernt. Die Implantation der verdichteten Implantatmatrix erfolgt unmittelbar nach den Messungen des nukleotomierten Zustandes. Das Implantat wird nach einer Befeuchtung mit 0,9 % NaCl-Lösung über den Führungsstab und die Applikationshülse in die Bandscheibenkavität eingebracht. Anschließend wird das Präparat zur Quellung der Implantatmatrix im Brutschrank für 2 h inkubiert. Um diesen Vorgang zu unterstützen wird in regelmäßigen Abständen 0,9 % NaCl-Lösung über die Anulusinzision injiziert.

5.20.2 Testapparaturen

In der servohydraulischen Materialprüfmaschine Instron wird sowohl die Höhenmessungsvorgenommen als auch die zyklische Dauerbelastung durchgeführt. Mit einer eigens entwickelten Maschine, dem Wirbelsäulenbelastungssimulator (Wisi), erfolgen Standardflexibilitätstests. Beide Apparaturen werden in Abb. 5-5 dargestellt. Der Wisi

besteht aus einem Grundrahmen mit Portalaufbau. Über Spindeln kann eine Verstellung der Portalhöhe stattfinden. Die zu messenden Präparate sind am kaudalen Ende im Grundrahmen fixiert, während das kraniale Ende in einem speziell entwickelten Kardangelen eingespannt ist. Dieses Gelenk erlaubt Rotationen um alle 3 Raumachsen. Das integrierte Führungssystem ermöglicht antero-posteriore, medio-laterale und kranio-kaudale Translationsbewegungen. Somit wird eine Bewegungsmöglichkeit in alle 6 Freiheitsgeraden ermöglicht. 3 Schrittmotoren leiten die reinen Momente der Seitneigung rechts/links, der Flexion/Extension und der axialen Rotation links/rechts ein. Die eingeleiteten Momente und Kräfte werden kontinuierlich über eine 6-Komponenten-Kraftmessdose erfasst. Winkelsensoren und lineare Wegaufnehmer registrieren die resultierenden Rotations- und Translationsbewegungen. Gemäß den international anerkannten Testkriterien für Wirbelsäulen werden die Präparate im Wisi mit reinen Momenten ohne axiale Vorlast belastet.

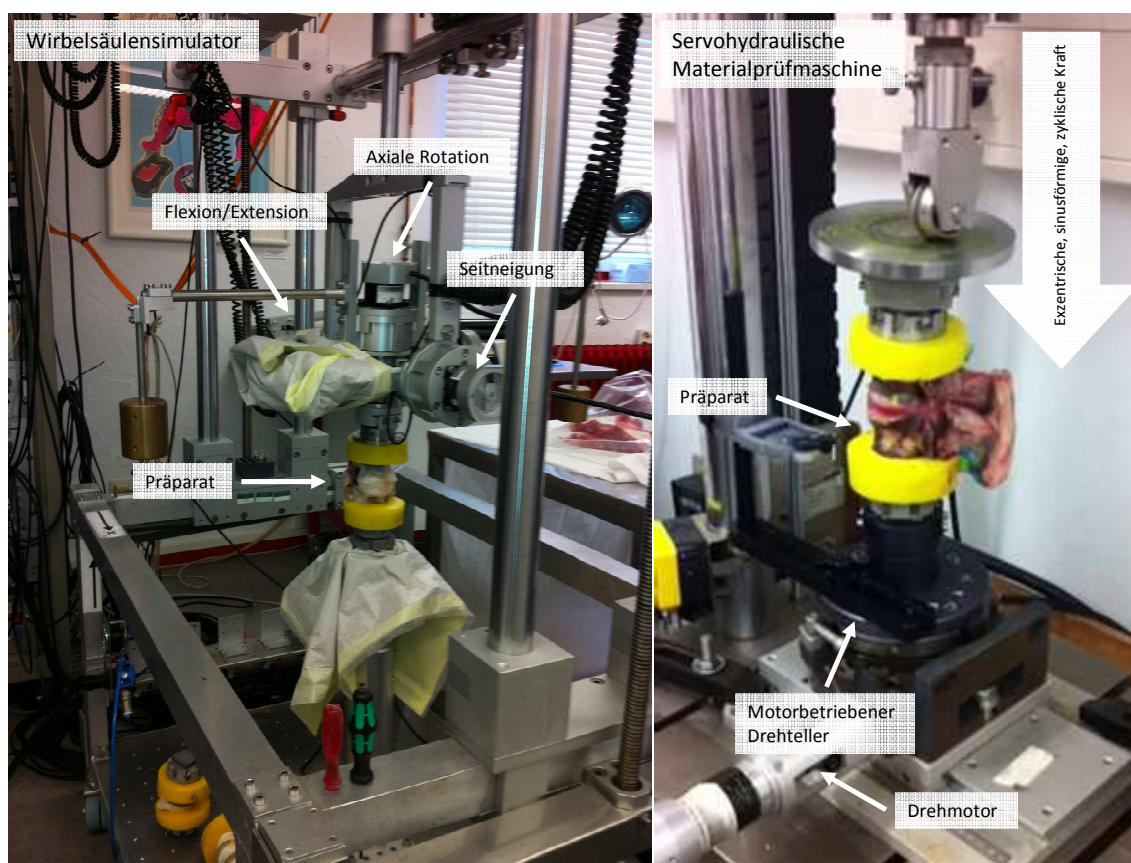


Abbildung 5-5: Links: Wirbelsäulensimulator mit eingespanntem Präparat. Mit Hilfe von 3 Schrittmotoren werden reine Momente eingeleitet und das Präparat in den 3 Hauptebenen in Flexion/Extension, Seitneigung und axialer Rotation belastet. Rechts: Servohydraulische Materialprüfmaschine mit Aufbau für die zyklische Dauerbelastung.

5.20.3 Höhenmessung, Flexibilität und zyklische Dauerbelastung

Die Höhenmessungen finden in der servohydraulischen Materialprüfmaschine (Instron) statt. Ein planer Druckstempel leitet eine konstante axiale Vorlast von 100 N ein. Kraft und Position des Stempels werden während des Messintervalls von 5 Sekunden aufgezeichnet. Aus der Position des Druckstempels ergibt sich ein relatives Maß für die Gesamthöhe des Präparats.

Die Flexibilitätsmessungen finden im Wirbelsäulenbelastungssimulator (Wisi) statt. Um eine Austrocknung zu vermeiden, werden die Präparate während der Messungen mit in 0,9 % NaCl-Lösung getränkten Kompressen feucht gehalten. Die in Tabelle 5-6 aufgeführten, festgelegten Kontrollparameter gewährleisten einen einheitlichen Messablauf für alle 6 Präparate. Die Segmente werden mit reinen Momenten von +/- 7,5 Nm in Seitneigung rechts/links, Flexion/Extension mit einer Geschwindigkeit von 1 °/s und einer axialen Rotation links/rechts mit einer Geschwindigkeit von 0,5 °/s belastet. Je 3,5 Zyklen werden kontrolliert durchgeführt, wobei die ersten zwei Zyklen zur Präkonditionierung der Präparate dienen. Die Messdaten des dritten Zyklus werden für die Auswertung verwendet.

Tabelle 5-6: Parameter einer Wirbelsäulenbelastungssimulator-Messung

Parameter	Wert
Zyklenzahl	3,5
Geschwindigkeit	1,0 °/s bei Flexio/Extension und Seitneigung 0,5 °/s bei axialer Rotation
Max. Moment	+/- 7,5 Nm
Umkehrbedingung	Moment kontrolliert
Maßgebende Kraftmessdose	Obere Kraftmessdose im Kardangelenck
Bewegungsart	x-Achse: Seitneigung rechts/links y-Achse: Flexion/Extension z-Achse: axiale Rotation links/rechts
Startposition	Moment = 0 Nm

Die zyklische Dauerbelastung der Präparate findet in der servohydraulischen Materialprüfmaschine statt. Die Parameter sind in Tabelle 5-7 aufgelistet. Das Präparat wird über den unteren Flansch auf einem motorgetriebenen Drehteller fixiert. Die Drehgeschwindigkeit um die eigene Achse beträgt ca. 360 °/min. Eine runde Metallplatte leitet die sinusförmige, zyklische Kraft exzentrisch zur Drehachse des Präparats. Die Amplitude der Belastung beträgt 250 N (100-600 N) bei einer Frequenz von 5 Hz über eine Testdauer von 100.000 Zyklen. Das Präparat dreht sich im Uhrzeigersinn. Somit wird am Präparat ein kontinuierlicher Biegemoment erzeugt:

Flexion → Flexion + Seitneigung links → Seitneigung links → Seitneigung links + Extension → Extension → Extension + Seitneigung rechts → Seitneigung rechts → Seitneigung rechts → Seitneigung rechts + Flexion → Flexion → etc.

Tabelle 5-7: Parameter der servohydraulischen Materialprüfmaschine

Parameter	Wert
Anzahl der Zyklen	100.000
Hebelarm	40 mm
Vorlast	100 N
Max. Last	600 N
Amplitude	250 N
Frequenz der Krafteinleitung	5 Hz
Lastverlauf	Sinusförmig
Messfrequenz	250 Hz
Messintervalle	Alle 100 Zyklen → 5 Messzyklen
Geschwindigkeit des Drehtellers	360 °/min
Rotationsrichtung	Im Uhrzeigersinn

Alle 6 Präparate durchlaufen die in Tabelle 5-8 dargestellten Schritte des Versuchsprotokolls.

Tabelle 5-8: Versuchsprotokoll der biomechanischen Testung

Schritt	Zustand des Präparats	Testung	Gerät	Parameter
INTAKT				
1	intakt	Höhenbestimmung	Instron	100 N Vorlast
2	intakt	Flexibilität	Wisi	+/- 7,5 Nm
NUKLEOTOMIERT				
3	nukleotomiert	Höhenbestimmung	Instron	100 N Vorlast
4	nukleotomiert	Flexibilität	Wisi	+/- 7,5 Nm
IMPLANTIERT				
5	implantiert	Höhenbestimmung	Instron	100 N Vorlast
6	implantiert	Flexibilität	Wisi	+/- 7,5 Nm
7	implantiert	Belastung	Instron	100 N - 600 N 40 mm Auslenkung 0-10.000 Zyklen 5 Hz
ZYKLISCHE DAUERBELASTUNG				
8	implantiert	Wiederholung der Schritte 5, 6 und 7	Instron + Wisi	10.000-20.000 Zyklen
9	implantiert	Wiederholung der Schritte 5, 6 und 7	Instron + Wisi	20.000-40.000 Zyklen
10	implantiert	Wiederholung der Schritte 5, 6 und 7	Instron + Wisi	40.000-60.000 Zyklen
11	implantiert	Wiederholung der Schritte 5, 6 und 7	Instron + Wisi	60.000-80.000 Zyklen
12	implantiert	Wiederholung der Schritte 5, 6 und 7	Instron + Wisi	80.000-110.000 Zyklen

6 Ergebnisse

6.1 Reaktor- und Implantatdesign

Ziel dieser Arbeit ist es, ein endoskopisch implantierbares Nukleusimplantat zu entwickeln. Daher muss die Implantatmatrix zunächst in einer Führungshülse platziert werden können, um die Implantation über einen kleinen Zugang durch den Faserring zu ermöglichen. Das Implantat sollte seine Form in vivo verändern und/oder sein Volumen erhöhen, um das Risiko einer Extrusion herabzusetzen oder zu verhindern. So entsteht die Idee zur Herstellung einer dünnen, verdichteten Kollagenmatrix, die durch Zusammenrollen in einer Führungshülse Platz findet. Zur Herstellung einer solchen verdichteten Matrix wird ein Reaktor benötigt, der den strengen Kriterien innerhalb eines CE-Konformitätsbewertungsverfahrens gerecht wird. Dies stellt hohe Anforderungen an jede Materialkomponente. Zudem muss die Herstellung unter sterilen Bedingungen erfolgen. Dies bedeutet, dass die sterilisierbaren Einzelkomponenten entweder nur einmal verwendet werden oder komplett zu reinigen sein müssen. Grundsätzlich muss die Geometrie so geformt sein, dass als Resultat ein homogen verdichtetes Implantat ohne Randbildung formbar ist. Dies bedeutet, dass vom Eingießen der Kollagenlösung, über die Gelierung, bis hin zur eigentlichen Verdichtung, keine Verformungen des Reaktormaterials auftreten dürfen. Da die Verdichtung des Kollagens über eine mechanische Krafteinwirkung stattfindet, muss der Reaktor eine entsprechende Robustheit und Wandstärke aufweisen, um im Zuge der Druckbelastung nicht beschädigt zu werden. Des Weiteren ist es notwendig, dass der Verdichtungsstempel passgenau ohne zu verkanten innerhalb des Zylinders gleitet und dabei keinen Materialabrieb verursacht.

In Abb. 6-1 ist der Entwurf des Reaktors dargestellt. Abb. 6-1 A zeigt die benötigten Komponenten: den Gießzylinder in den die Kollagenlösung zur Gelierung gefüllt wird, Stopper zur Einstellung verschiedener Verdichtungsstufen, den Verdichtungsstempel, die porösen Einheiten zum Abfluss der heraus gepressten Flüssigkeit und die Auffang-

schale inklusive schützender Abdeckhaube. Abb. 6-1 B veranschaulicht den Aufbau des Reaktors.

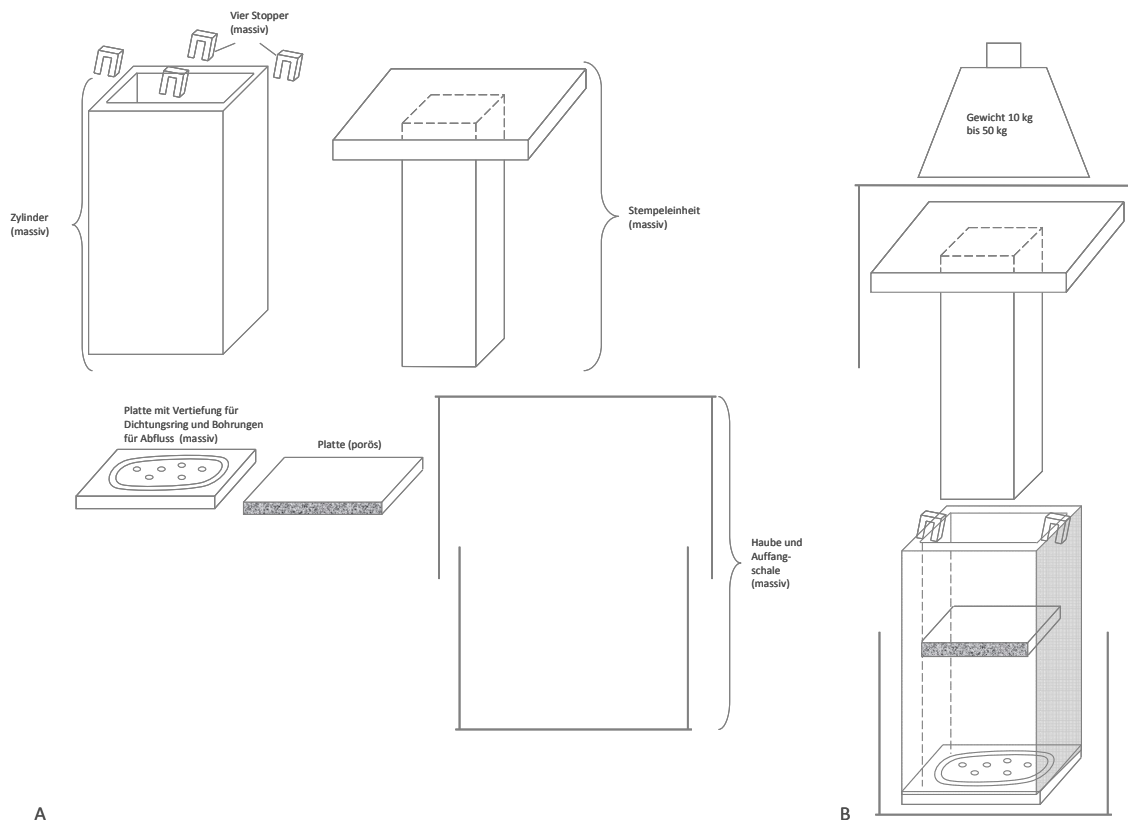


Abbildung 6-1: Entwurf Reaktor - A Einzelkomponenten: Zylinder mit Stoppern zur Einstellung der Implantatendhöhe, Verdichtungsstempel, poröse Einheiten zum Abfluss von Flüssigkeit, Auffangschale und Abdeckhaube; B Gesamtansicht

Der Hochleistungskunststoff Polytetrafluorethylen (PTFE) eignet sich auf Grund folgender Eigenschaften ideal für den Bau des Reaktors: Biokompatibilität, Thermische Beständigkeit, Antiadhäsion und chemische Inertheit. Nach der Testung verschiedenster Filtrationsmaterialien wie porösem PTFE, Nylonsiebgewebe, ummanteltem Glasfasergewebe, hydrophiler und hydrophober Membranen, wird als poröse Einheit ein sich in der Entwicklung befindender Edelstahlschaum vom Fraunhofer Institut für keramische Technologien und Systeme verwendet, der primär zur Behandlung ossärer Defekte zugelassen werden soll. Der Schaum ist mit einer geeigneten Porengröße erhältlich, um Flüssigkeit von Kollagen über Druck separieren zu können. Zudem ist das Material per Laser beliebig schneidbar und auf Grund des geringen Kostenfaktors als Einwegprodukt im Rahmen einer Serienproduktion einsetzbar. Ausgehend vom ersten Ent-

wurf wird eine technische Zeichnung erstellt und 2 Prototypen des Reaktors bei der Firma ElringKlinger Kunststofftechnik angefertigt (Abb. 6-2).

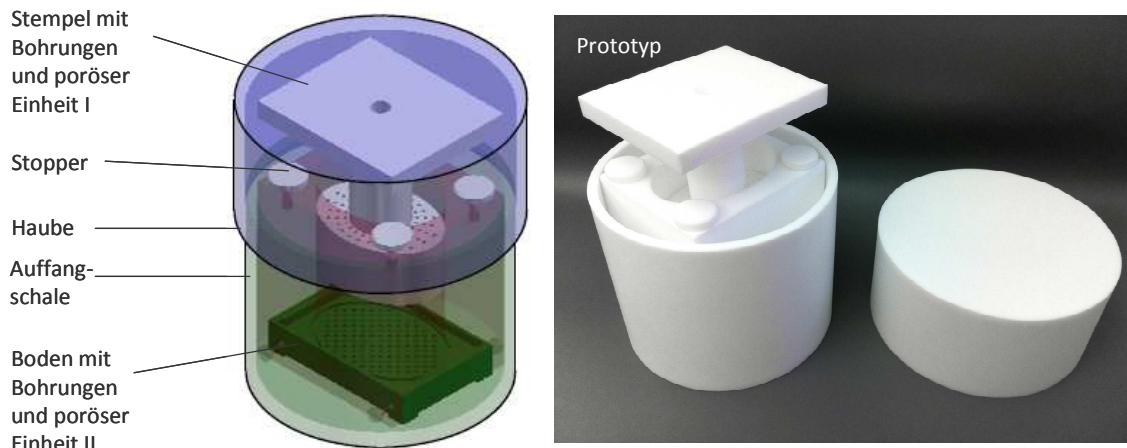


Abbildung 6-2: Reaktor - Technische Zeichnung und Prototyp aus PTFE

6.2 Implantatherstellung, Verpackung und Endsterilisation

Die Herstellung eines Kollagengels, welches im Reaktor zu einer verdichteten Matrix verändert wird, beginnt stets mit der Neutralisation der sauren Rohkollagenlösung. Die Amedrix GmbH hat hierfür spezielle Gelneutralisationslösungen (GNL) entwickelt, um über verschiedene Mischungsverhältnisse, bestimmte Endkonzentrationen an Kollagen zu erzeugen. Zur Herstellung der Implantatmatrix wird ein Mischungsverhältnis von 1:1 gewählt. Als Versuch das Quellpotential der Matrix zu erhöhen, wird das Polysaccharid Hyaluronsäure in der Konzentration 5 mg/ml in der GNL gelöst. Auf Grund der dadurch entstehenden hohen Viskosität, ist eine Sterilisation der GNL nur per Autoklavieren möglich. Zusätzlich werden Matrices ohne Hyaluronsäure hergestellt, um einen Vergleich auf zellbiologischer und biomechanischer Ebene erzielen zu können. Das Kollagen wird mit der GNL homogen durch Rührbewegungen mittels zweier serologischer Pipetten in einer Weithalsflasche vermischt und in den Zylinder des Reaktors gegossen. Der gesamte Prozess und die Gelierung erfolgen bei Raumtemperatur unter der Laminar Air Flow (LAF). Die Gelierzeit und das Verhältnis von Verdichtungsdauer und Kraftausübung, sowie der gesamte Prozess bis zur klinisch relevanten Primärverpackung werden in zahlreichen Vorversuchen ermittelt und etabliert.

Nach einer Gelierzeit von 1,5 h werden der Verdichtungsstempel und die Abdeckhaube aufgesetzt. Der Verdichtungsprozess selbst findet durch das manuelle Auflegen verschiedener Gewichte von 3-25 kg über einen Zeitraum von 72 h bei einer Temperatur von 2-8 °C statt. Die kontinuierliche Ausübung linearen Drucks presst über die poröse Einheit I + II die enthaltene Flüssigkeit des Kollagengels heraus, so dass als Resultat eine ca. 1 mm dünne verdichtete Kollagenmatrix hergestellt werden kann, was einem Verdichtungsfaktor von 32 im Vergleich zum Ursprungsgel entspricht. Um das Verhältnis der Verpackungshülse mit einem Innendurchmesser von 2,6 mm zu Matrixvolumen optimal nutzen zu können, soll die Stärke reduziert werden. Durch eine Gefriertrocknung kann letztendlich eine Stärke von ca. 0,6 mm erzielt werden, indem die noch vorhandene Flüssigkeit restlos entzogen wird. Dies hat allerdings zur Folge, dass die Matrix spröde und starr wird. Zur Verpackung in die Metallhülsen ist daher eine leichte Anfeuchtung mit PBS⁺ notwendig, bis eine ausreichende Flexibilität zum einrollen der Matrix möglich ist. In diesem Zustand kann die verdichtete Kollagenmatrix in beliebige Größen zugeschnitten werden. Es werden Streifen von 1x6 cm hergestellt (Abb. 6-3 A). Diese werden manuell zusammengerollt, so dass eine kompakte Form entsteht (Abb. 6-3 B). Mit Hilfe einer Vakuumpumpe wird das Implantat in die Hülse gesogen (Abb. 6-3 C). Die Lagerung vor und nach der γ -Bestrahlung erfolgt bei -20 °C. Zur Entnahme bzw. Implantation wird ein passgenauer Führungsstab verwendet, mit dem die Matrix aus der Hülse geschoben werden kann (Abb. 6-3 D).

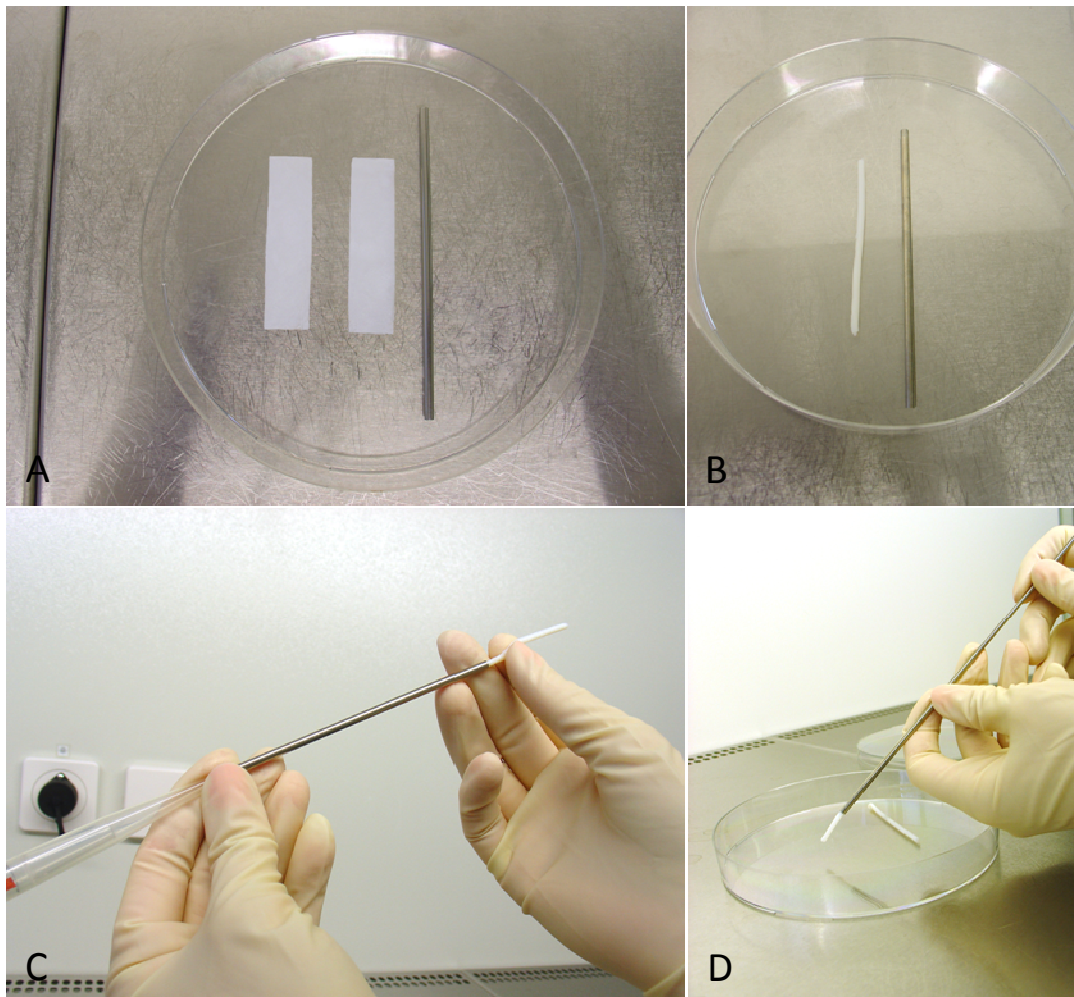


Abbildung 6-3: Implantatverpackung. A: Implantat 1x6 cm; B: Implantat gerollt mit einem Innendurchmesser < 2,6 mm; C: Überführung in Metallhülse durch Unterdruck; D: Entnahme mittels Führungsstab

6.3 Transforaminale Implantation - Humanpräparat

Im Rahmen der 1. interkorporellen Fusionstage des Diakonie Klinikums Stuttgart und der Firma Ulrich Medical wird das verdichtete Kollagenimplantat zweimalig transforaminal in die Lendenwirbelsäule eines humanen Präparats implantiert, um die operative Applikation zu testen.

Eine rein endoskopische Implantation kann nicht stattfinden, da die interkorporellen Fusionstage in erster Linie zur Erlernung der Wirbelkörperfusion über die TLIF-Technik (transforaminal lumbar interbody fusion) konzipiert sind. Daher wird das Präparat dorsal weit eröffnet (Abb. 6-4 A).

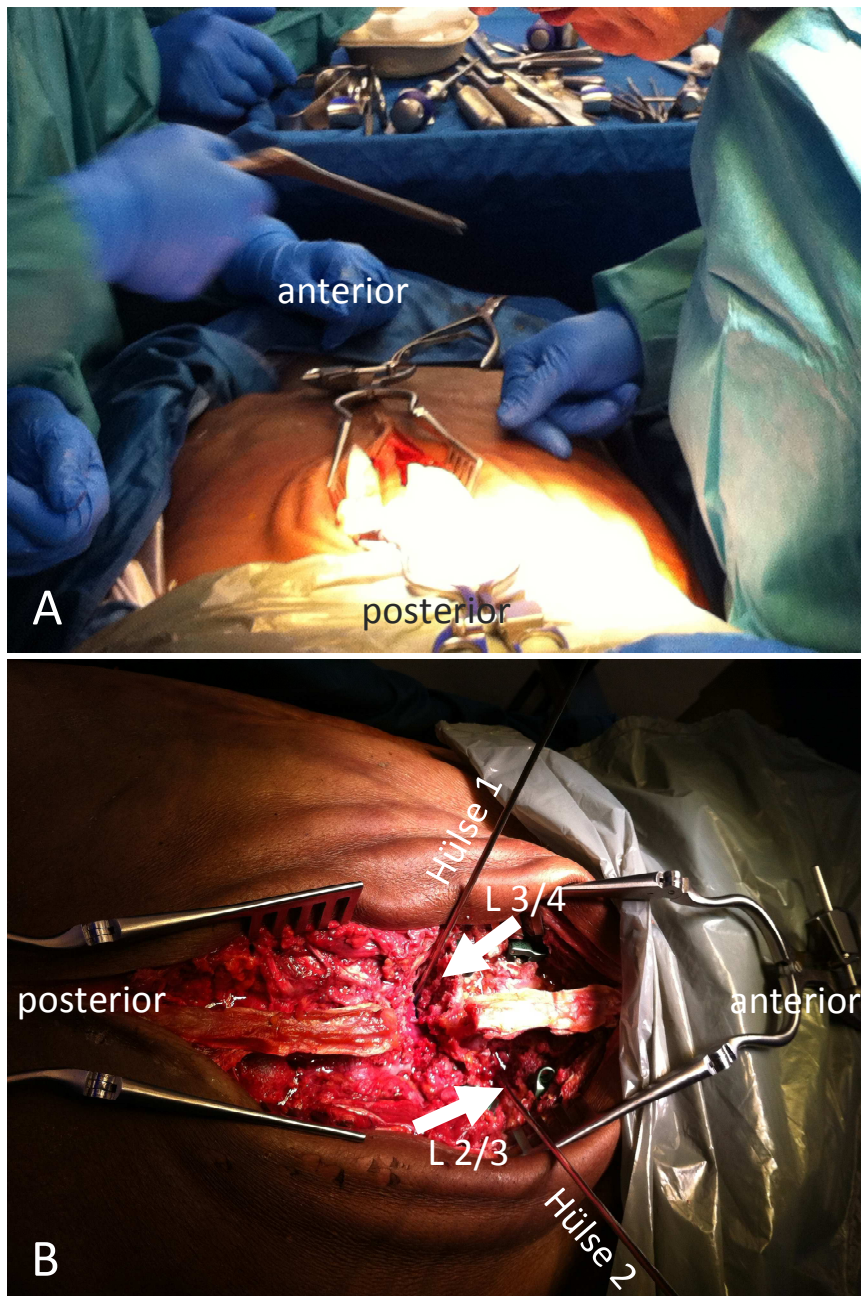


Abbildung 6-4: Implantation der verdichteten Implantatmatrix in ein humanes Präparat. A: Nukleotomie nach Foraminotomie mittels Rongeur; B: Transforaminale Implantation in die Segmente L 2/3 und L 3/4 mittels Applikationshülse und Führungsstab.

Nach einer paramedianen Längsinzision der Haut im unteren Drittel des Rückens, wird die Lumbalfaszie subkutan mit einer Schere erweitert, Muskeln und Bindegewebe werden stumpf mit einem Raspatorium präpariert, bis die Facettengelenksebene und die Ansätze der Querfortsätze frei liegen. Die Foraminotomie findet mit Hilfe einer Knochenstanze statt. Das Foramen invertebrale der Etage L 2/3 und L 3/4 wird leicht er-

weitert, um anschließend die Bandscheibenfächer mit einem Skalpell zu eröffnen. Zur Nukleotomie werden Rongeuere unterschiedlicher Winkelungen verwendet. Nach einer Entnahme von ca. 1 g Nukleusgewebe wird die Applikationshülse mit einem Außendurchmesser von 3 mm in den Nukleus eingeführt (Abb. 6-4 B) und mit dem Führungsstab 0,6 g der verdichteten Matrix (Trockenmasse) implantiert. Zur Erhöhung der Flexibilität und zur Quellung wird das Implantat unmittelbar davor und nach der Implantation mit Natriumchloridlösung hydriert. Die Applikation über die Hülse und den Führungsstab verlaufen reibungslos, wobei darauf zu achten ist, die Enden der Matrix mit dem Stab tief im Defekt zu positionieren. Erfolgt dies nicht, besteht die Gefahr einer Extrusion. Das Außenmaß der Hülse ist mit 3 mm ist ausreichend, so dass der Zugang des Foramen intervertebralis und des Bandscheibenfachs problemlos passiert werden kann.

6.4 Bestimmung der Hyaluronsäurekonzentration in der verdichteten Implantatmatrix nach dem Herstellungsprozess

Die in der GNL gelöste HA geht über den Verdichtungsvorgang des Herstellungsprozesses teilweise verloren. Über den Carbazol Assay wird der HA-Gehalt der herausgepressten Flüssigkeit ermittelt. Aus der Differenz der zu Beginn eingesetzten Menge HA resultiert der Gehalt des Endprodukts. Tabelle 6-1 zeigt die Werte pro Implantatmatrix. Die Auswertung von insgesamt 5 verdichteten Implantatmatrices führt zu einem durchschnittlichen Gehalt von 29,32 mg/g Trockenmasse (STABW 3,2 g) und einen Gesamtverlust von 41,8 % (STABW 7,4 %).

Tabelle 6-1: Werte der einzelnen Implantatmatrices

Matrix		1	2	3	4	5
Gehalt HA [mg]		237	277	245	212	214
Gehalt HA Trockenmasse		30,4	28,3	24,5	33,1	31,0
Verlust [%]		43	30	40	48	48

6.5 Quantitative Bestimmung des Hyaluronsäureverlustes unter Kultivierungsbedingungen

Da bereits während des Herstellungsprozesses HA verloren geht, wird untersucht, ob es im Verlauf der Kultivierung der HA-haltigen Matrix ebenfalls zu einem Verlust kommt. Dazu wird über einen Zeitraum von 11 Tagen eine Matrix in PBS⁺ im Brutschrank inkubiert. An den Auswertungszeitpunkten wird je Implantatstück eine Probe von 180 µL des Puffers entnommen. Die Auswertungen finden am ersten Tag nach 75 min und 6 h statt, dann nach 1, 2, 3, 4, 7 und 11 d (in der Abb. 6-5 den Zeitpunkten 1-8 entsprechend). Die Messungen erfolgen über eine Dreifachbestimmung, wobei die Werte gemittelt werden.

Ein Matrixstück enthält vor Versuchsbeginn ca. 4 mg HA. In Abb. 6-5 ist der Verlust graphisch dargestellt. Bei der Kultivierung in PBS⁺ zeigt sich nach 75 min ein Verlust von 0,611 mg. Nach einer Inkubationsdauer von 1 d ist mit 2,9 mg bereits mehr als die Hälfte der HA in die Lösung übergegangen. Nach 11 Tagen beträgt der Verlust 4,0 mg. Dies entspricht im Vergleich zur Anfangskonzentration einem Verlust von 100 %.

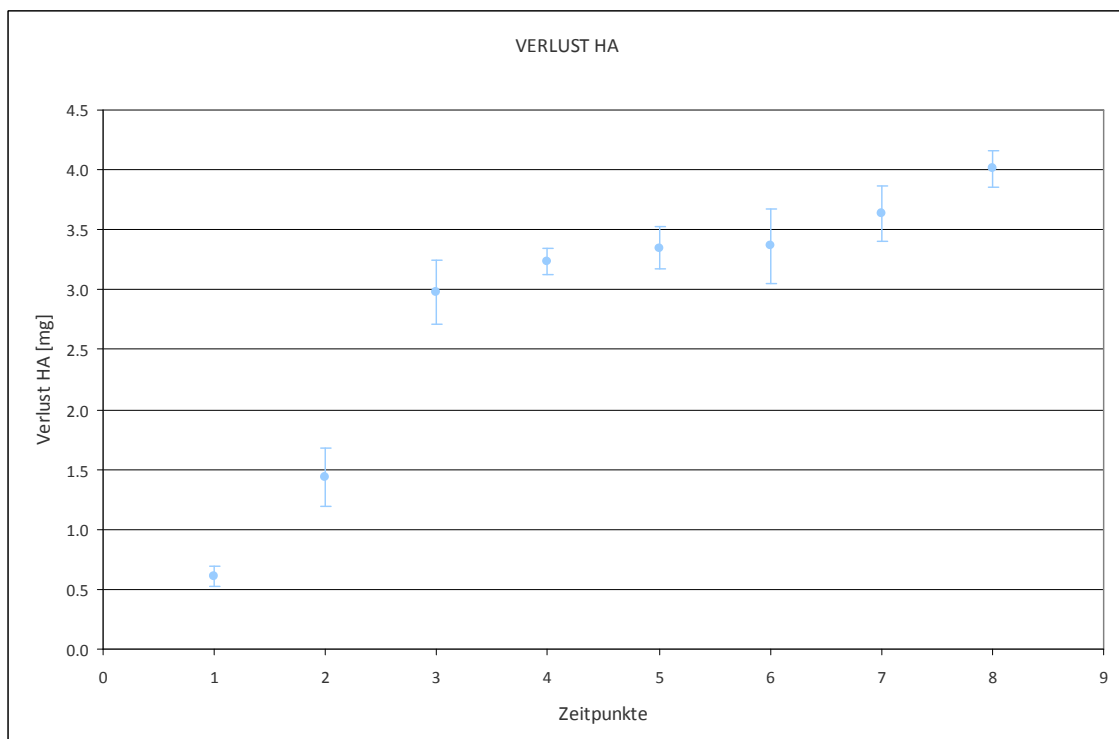


Abbildung 6-5: Verlust der HA [mg] unter Kultivierungsbedingungen. Zeitpunkt 1 (75 min), 2 (6 h), 3 (1 d), 4 (2 d), 5 (3 d), 6 (4 d), 7 (7 d) und 8 (11 d)

6.6 Ermittlung des Quellpotentials

Durch den Zusatz des negativ geladenen Polysaccharids Hyaluronsäure soll das Quellpotential des verdichteten Implantats maßgeblich gesteigert werden. Zur Klärung ob und inwieweit die Wasserbindungskapazität gesteigert werden kann, werden Matrices mit und ohne HA-Zusatz miteinander verglichen. Abbildung 6-4 zeigt den Quellungsfaktor beider Matrices über einen Inkubationszeitraum in PBS⁺ von 0 bis 180 min. Nach 0, 5, 15, 30, 60, 120 und 180 min wird die Menge des aufgenommenen Wassers über eine Gewichtsbestimmung ermittelt. Beide Matrices zeigen eine kontinuierliche Quellung über den gesamten Zeitraum. Die anfänglich lyophilisierten Matrixstückchen unterscheiden sich jedoch bereits nach 5 min deutlich. So wiegt die HA-haltige Matrix 0,136 g, die HA-freie 0,068 g. Dies entspricht bezüglich zum Anfangsgewicht einem Quellungsfaktor von 5,7 bzw. 3,2; nach 180 min 10,7 bzw. 6,4. Der HA-Zusatz von 29 mg/g Trockenmasse steigert das Quellpotential und erhöht somit die Wasserbindungskapazität um den Faktor 4,3.

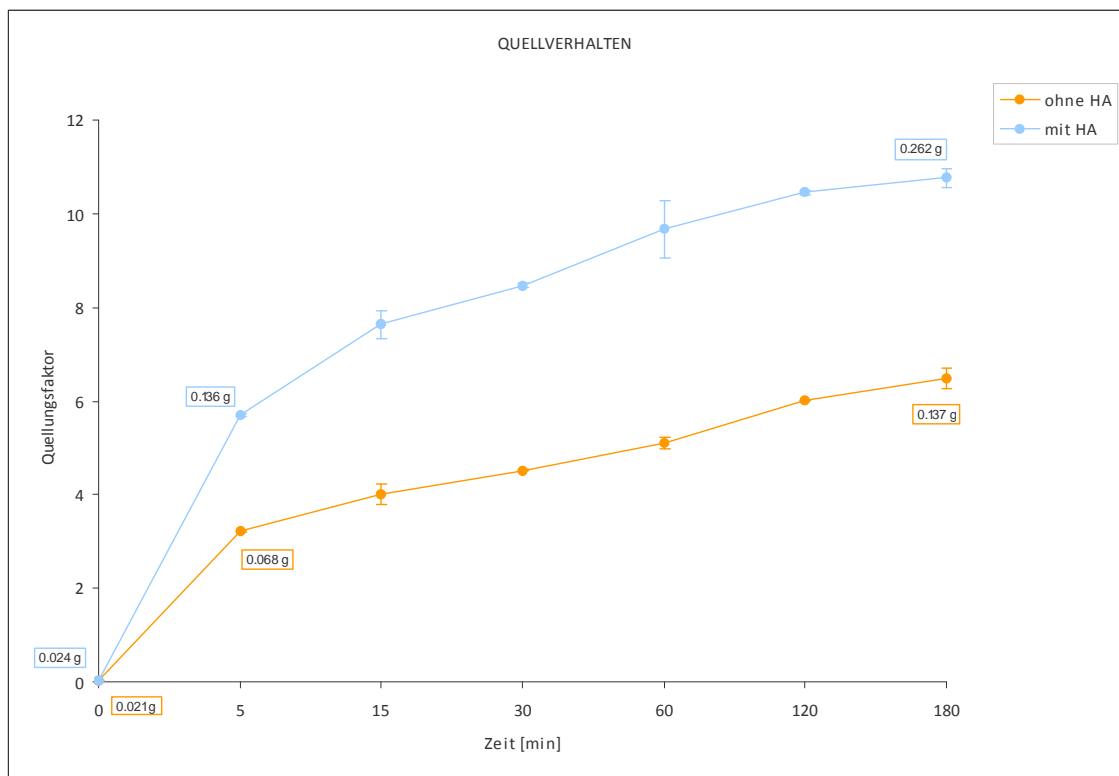


Abbildung 6-6: Quellpotential verdichteter Matrices mit und ohne HA-Zusatz

6.7 Rheologische Messungen

Reale Körper lassen sich rheologisch nur über eine Kombination von Viskosität, Elastizität und Plastizität erklären (Pahl et al., 1991). Zur Klärung ob und inwiefern ein Zusatz von 8 mg/ml HA die viskoelastischen Eigenschaften der entstehenden Implantatmatrix des Systems ChondroFiller^{liquid} beeinflusst, wird durch rheologische Messungen untersucht. In Abbildung 6-5 werden die zusammengefassten Ergebnisse der durchgeführten Oszillationsmessungen von Gelen des Systems ChondroFiller^{liquid}, von je zwei Kollagenchargen, mit und ohne HA-Zusatz im Frequenzsweep gezeigt. Das Diagramm bildet die Werte des elastischen Moduls in Abhängigkeit von der Frequenz ab. Das elastische Modul G' gilt als Maß für den elastischen Anteil der Festigkeitseigenschaften eines Gels. Der Frequenzsweep zeigt das viskoelastische Verhalten der fibrillären Netzwerkstruktur der Matrices bei konstanter Deformation. Die zwei blauen Messkurven der Gele mit HA-Zusatz liegen unterhalb der Zusatzfreien. Der Vergleich der Werte zeigt, dass bei den Gelen ohne HA-Zusatz ein höheres elastisches Modul G' gemessen wird als bei den Gelen mit Zusatz. Die Kurven der zwei verwendeten Kollagenchargen schwanken untereinander geringfügig. Beim Vergleich der Steigung der Kurven zeigt sich kein Unterschied. Daraus lässt sich schließen, dass beide Matrices eine hinreichend homogene Struktur besitzen, wobei die Gele mit HA-Zusatz einen etwas geringeren elastischen Anteil aufweisen.

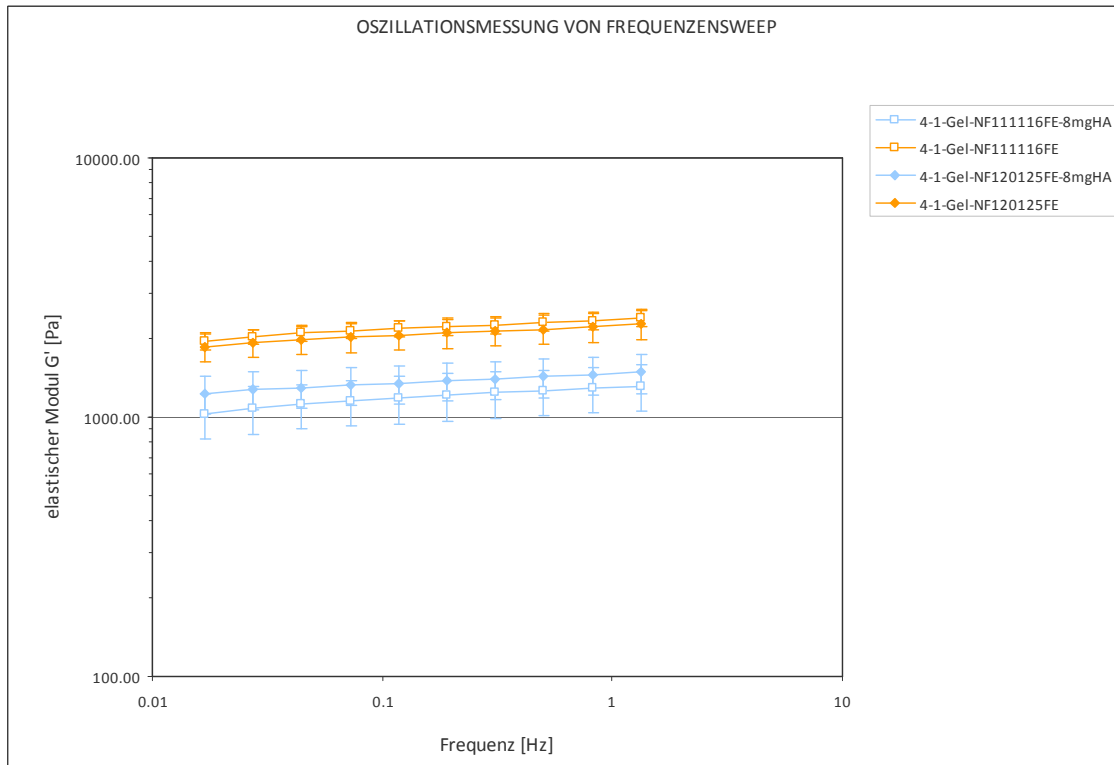


Abbildung 6-7: Oszillationsmessung von Frequenzsweep. ChondroFiller^{liquid} mit und ohne HA-Zusatz; zwei Kollagenchargen. Darstellung des elastischen Moduls in Abhängigkeit von der Frequenz.

6.8 Spannungs-Kompressions-Messungen

Am Fraunhofer Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik (IGB) wurde, zur Bestimmung mechanischer Eigenschaften der Haut und Optimierung eines 3D-Hautmodells, eine neue Anlage entwickelt, über die Spannungs-Kompressions-Kurven erstellt werden können. Diese Messung findet zur Charakterisierung mechanischer Eigenschaften bzw. Unterschiede der verdichteten Implantatmatrix +/- HA-Zusatz statt. Wie in Abb. 6-6 dargestellt, liegen die zwei Messkurven der Matrix ohne HA-Zusatz deutlich tiefer im Vergleich zu den drei Matrices mit HA-Zusatz. Um die HA-freie Matrix um 100 % zu deformieren, wird eine Schubspannung von ca. 1.700 Pa benötigt. Im Vergleich dazu muss für dieselbe Verformung einer HA-haltigen Matrix ein Druck von mindestens 2.480 Pa ausgeübt werden. Die 3 Messkurven der HA-haltigen Matrix weichen untereinander ab, wobei zur Erstellung der niedrigsten Kurve eine optisch nicht völlig einwandfreie Implantatmatrix verwendet wird. Die zwei Kurven der HA-freien verlaufen dagegen fast parallel. Werden die Werte der Einzelkurven gemittelt, wie in Abb. 6-7, ergibt sich für die HA-freien Matrices ein Wert von 2.321 Pa, um eine Defor-

mation von 50 % zu erreichen. Für die HA-haltigen wird eine mehr als doppelt so hohe Schubspannung von 5.881 Pa benötigt.

Diese Werte lassen schlussfolgern, dass der Zusatz von 29 mg HA in der verdichteten Kollagenmatrix zu einer deutlichen Verbesserung der mechanischen Stabilität führt. Wobei an keiner der getesteten Matrices nach der Druckbelastung optisch sichtbare Schäden zu erkennen sind. Die Messwerte, der bisher vermessenen deutlich geringer komprimierten Kollagengele zum Aufbau eines Hautäquivalents des Fraunhofer IGB, liegen deutlich darunter und sind zudem nach der Messung sichtbar beschädigt (persönliche Mitteilung; Rütschle, 2012).

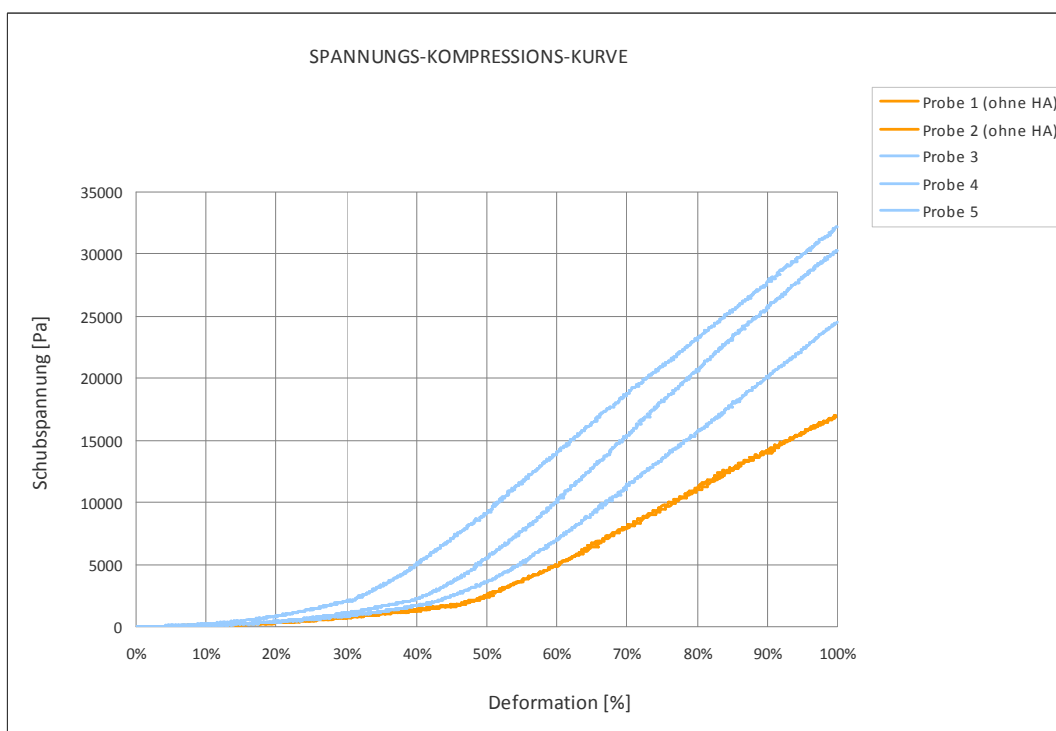


Abbildung 6-8: Spannungs-Kompressions-Kurven der verdichteten Implantatmatrix +/- HA-Zusatz; bis zu einer Deformation von 100 %.

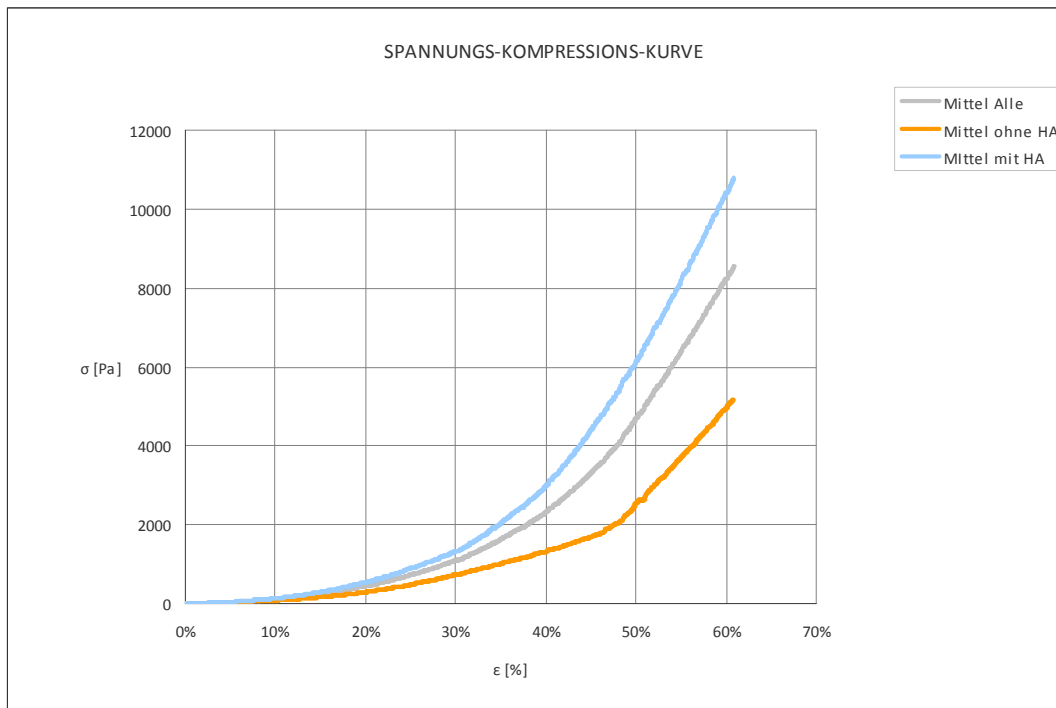


Abbildung 6-9: Spannungs-Kompressions-Kurven der verdichteten Implantatmatrix +/- HA-Zusatz; gemittelt; bis zu einer Deformation < 60 %.

6.9 In vitro Zytotoxizitätstest an Monolayerkulturen

In Anlehnung an die Norm DIN ISO 10993 findet eine Prüfung auf Zytotoxizität an Monolayerkulturen boviner und humaner Bandscheibenzellen statt. Findet die verdichtete Matrix zukünftig Verwendung als Medizinprodukt der Klasse III, ist eine Endsterilisation durch γ -Bestrahlung unumgänglich. Diese Sterilisationsmethode kann zu biomolekularen Änderungen innerhalb der Matrix führen und somit zytotoxische Effekte verursachen, die sich negativ auf Zellen auswirken können. Es ist aus der Literatur und der Erfahrung der Amedrix GmbH bekannt, dass insbesondere der Zusatz von Sacchariden nach der Bestrahlung zu toxischen Veränderungen führen kann (Di Cicco et al., 2005; Ardjomandi 2008; Reich et al., 2013). Zur Klärung etwaiger Veränderungen werden zwei Extrakte aus der verdichteten Implantatmatrix +/-HA-Zusatz hergestellt und mit zwei Extrakten unbestrahlter Matrices verglichen. Diese Extrakte werden über einen Zeitraum von 72 h als Zellkulturmedium verwendet. Die Proliferation der verwendeten bBSZ und hBSZ wird über einen Proliferationsassay ermittelt. Die Werte der Negativkontrolle werden als Marke für 100 % Vermehrung verwendet (hier nicht dargestellt). In Abb. 6-10 und 6-11 ist die Proliferation der bBSZ und hBSZ in Balkendiagrammen

dargestellt. Im Vergleich zur Negativkontrolle ergibt sich bei den bBSZ für die unbestrahlten Matrices eine Proliferationsrate von 100 (-HA) bzw. 103 % (+HA). Die Rate der Bestrahlten liegt bei jeweils 115 %. Bei den hBSZ ist die Proliferation ebenfalls nach der Extraktinkubation der bestrahlten Matrix +HA-Zusatz mit 101 % am höchsten. Im Mittel proliferieren die Zellen -HA-Zusatz um 87 %. Matrices ohne HA-Zusatz resultieren in einer Proliferation von 88 % (bestrahlt) bzw. 100 % (unbestrahlt).

Die Beurteilung eines potentiell schädlichen Einflusses erfolgt anhand einer Zytotoxizitätsskala. Diese gibt vor, dass eine Proliferation zwischen 71-80 % schwach toxisch und zwischen 81-100 % als nicht zytotoxisch zu bewerten ist. Da die hier ermittelten Vermehrungsraten stets über 80 % liegen, hat keiner der getesteten Extrakte einen zytotoxischen Effekt auf die hier verwendeten Zelltypen.

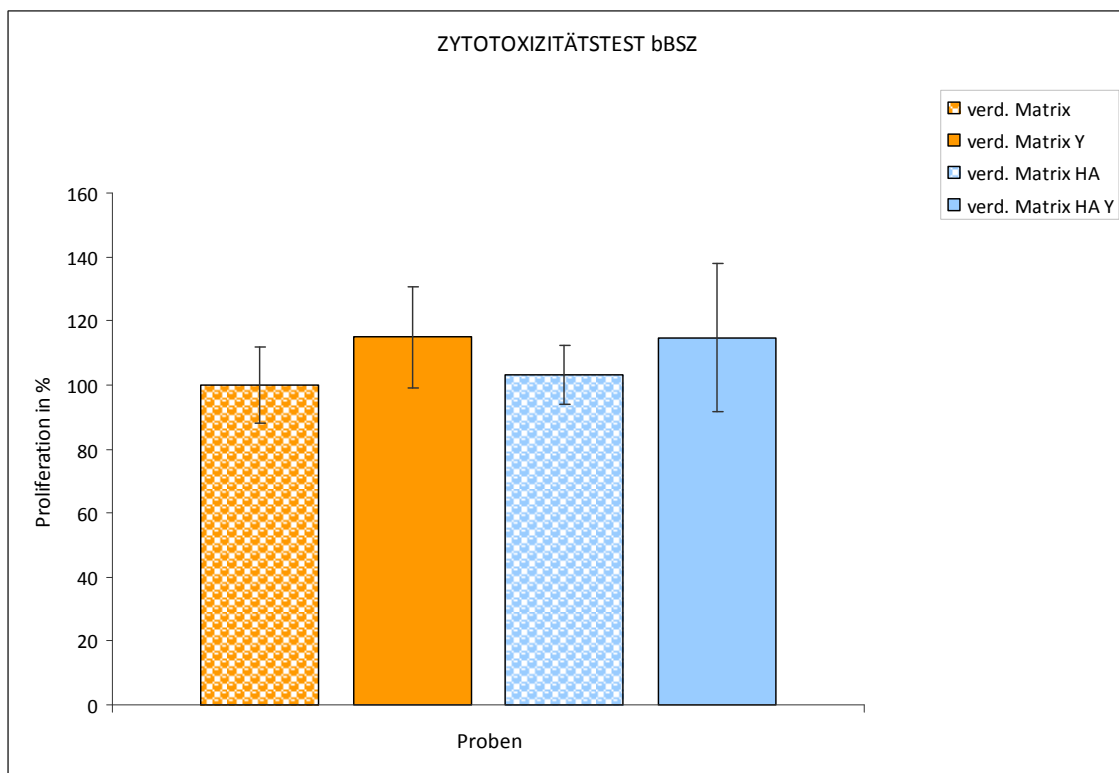


Abbildung 6-10: Zytotoxizitätstest bBSZ. Zellproliferation [%] nach 72 h Extraktinkubation

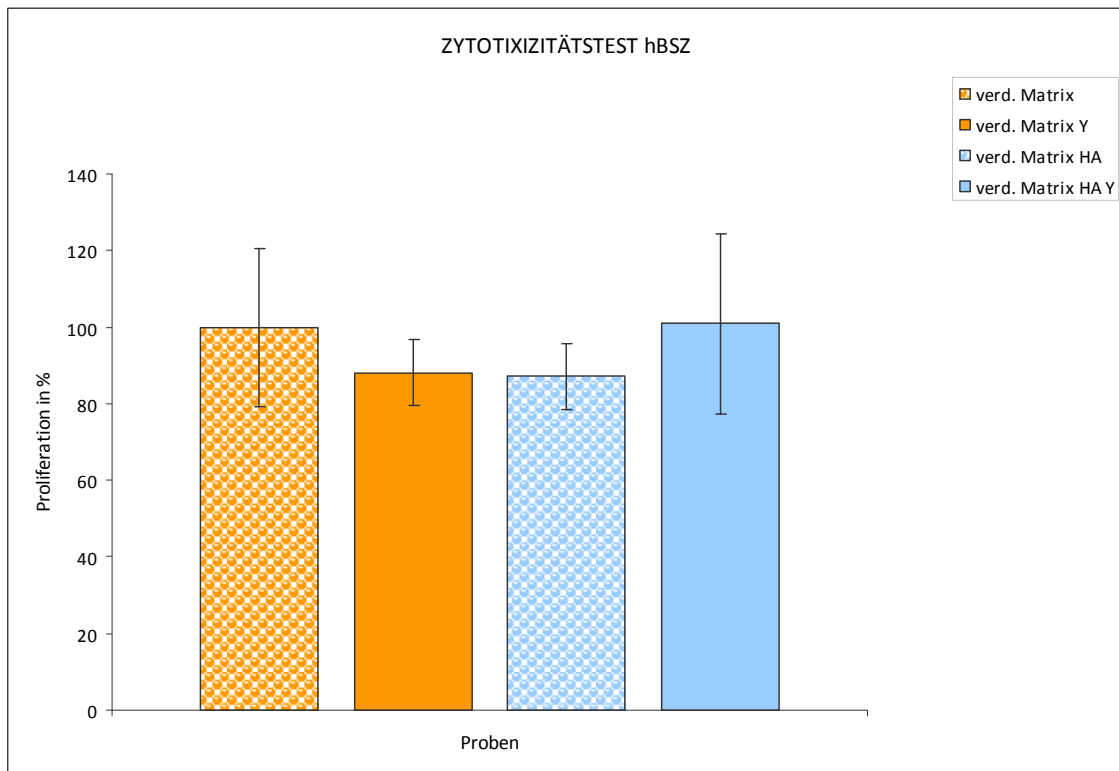


Abbildung 6-11: Zytotoxizitätstest hBSZ. Zellproliferation [%] nach 72 h Extraktinkubation

6.10 Inkubation von Zellen in verschiedenen Gelneutralisationslösungen

Sollen Zellen über das System ChondroFiller^{liquid} als Additiv transplantiert werden, müssen abhängig vom Zustand des Zellprodukts, in Form eines festen Pellets oder als Suspension, verschieden konzentrierte Gelneutralisationslösungen (GNL) verwendet werden, um final im Endprodukt eine osmotisch ausgewogene Matrix zu erhalten. Ein wichtiger Parameter zur Anwendungsbeschreibung ist die maximale Inkubationsdauer in den hyperosmolaren GNLs ohne Zellverluste. Zur Testung werden bBSZ, hBSZ und hMSC verwendet. Nach der Inkubation werden die Zellen für 48 h in Kulturflaschen expandiert, um etwaige Spätschäden in der Auswertung zu inkludieren. Die Abb. 6-12 bis 6-12 zeigen die Zellzahl nach verschiedenen Inkubationszeiten in den zwei getesteten GNLs. Da die 5GNL-MP im Rahmen einer klinischen Anwendung pur verwendet wird, ist die Salzkonzentration höher als in der mit Aspirat oder Plasma zu verdünnenden 10GNL-MP. Im Vergleich zur Negativkontrolle (hier nicht gezeigt) beeinflusst die hyperosmotische Umgebung die Zellen bereits nach 5 min. So liegt die Zellzahl der Negativkontrolle bei den hBSZ und hMSC stets zwischen 8×10^4 und 1×10^5 , bei den bBSZ zwischen $2,6 \times 10^5$ und $3,7 \times 10^5$. Nach einer Inkubationsdauer von 5 min in den GNLs

sinkt die Zellzahl deutlich und kontinuierlich ab. Die Inkubation in der 5GNL-MP führt im Vergleich zur 10GNL-MP zu einem ausgeprägten Zellsterben. So ergibt die Inkubation der hMSC in der 5GNL-MP eine Reduktion der Zellzahl von $6,59 \times 10^4$ nach 5 min auf $1,00 \times 10^4$ und nach 30 min; in der 10GNL-MP von $7,37 \times 10^4$ auf $3,43 \times 10^4$. Die Inkubation der hBSZ führt analog zu den hMSC zu einer massiven Reduktion von anfänglich $6,69 \times 10^4$ auf $2,13 \times 10^4$ nach der Inkubation in der 5GNL-MP bzw. von $8,87 \times 10^4$ auf $6,63 \times 10^4$ in der 10GNL-MP. Insgesamt reagieren die hMSC sensibler auf die hyperosmotischen Lösungen. Die Werte der hMSC liegen über den gesamten Verlauf hinweg stets am niedrigsten. Die ermittelten Zellzahlen der bBSZ schwanken und ergeben vergleichsweise höhere Abweichungen. Auch hier findet eine deutliche Reduktion von $2,40 \times 10^5$ auf $8,93 \times 10^4$ in der 5GNL-MP bzw. $2,10 \times 10^5$ auf $1,43 \times 10^5$ in der 10GNL-MP statt. Diese Daten führen somit zu dem Ergebnis, im Rahmen einer zellbasierten klinischen Anwendung des Systems ChondroFiller^{liquid}, eine maximale Inkubationsdauer von < 5 min festzulegen. Dies gilt insbesondere für den sensiblen Zelltyp der hMSC.

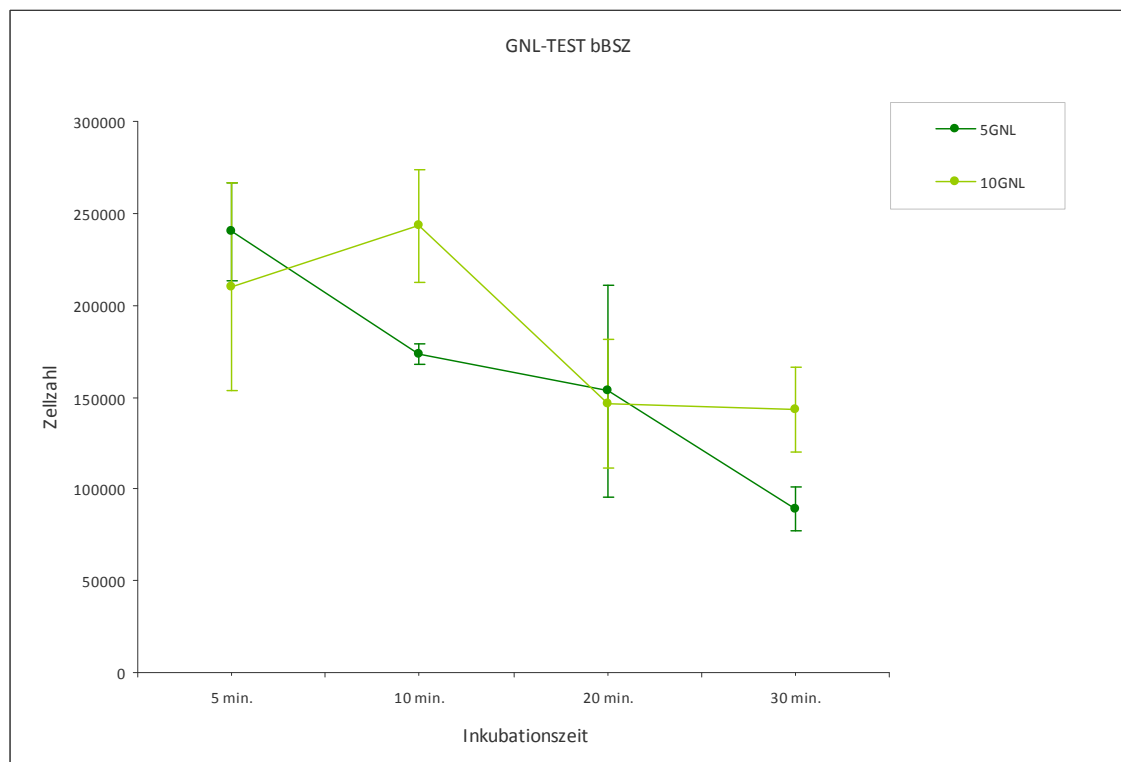


Abbildung 6-12: Zellzahl in Abhängigkeit zur Inkubationsdauer bBSZ in 10GNL-MP und 5GNL-MP

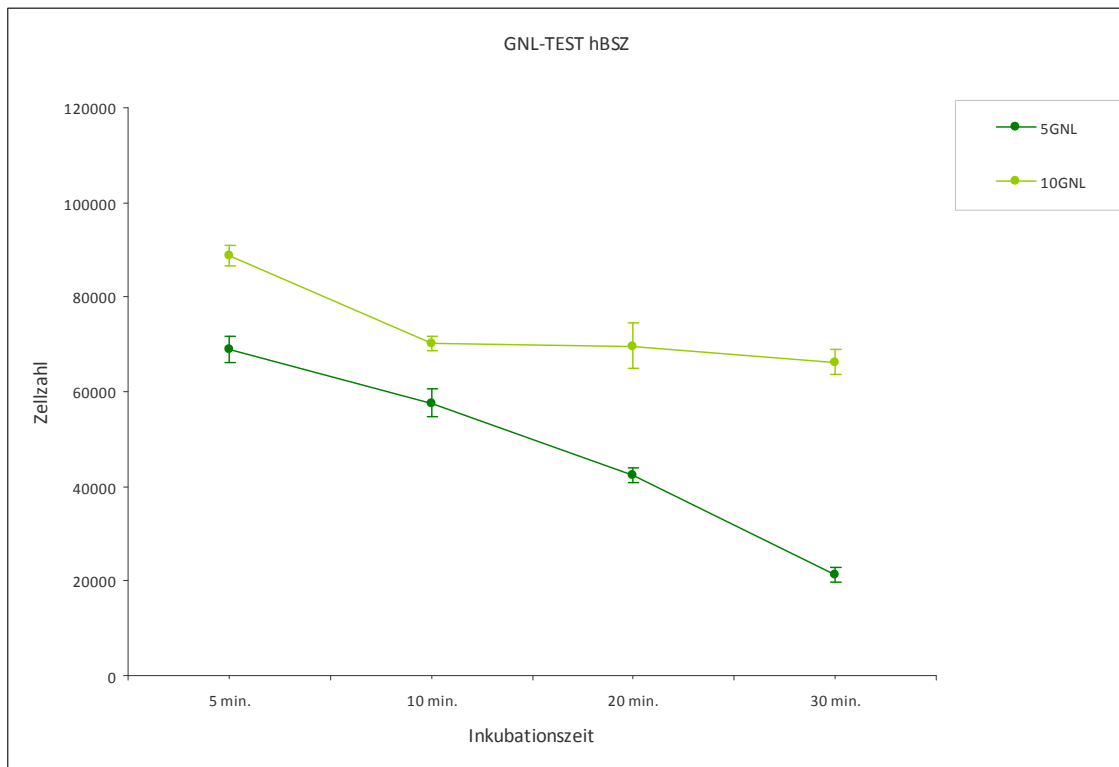


Abbildung 6-13: Zellzahl in Abhängigkeit zur Inkubationsdauer hBSZ in 10GNL-MP und 5GNL-MP

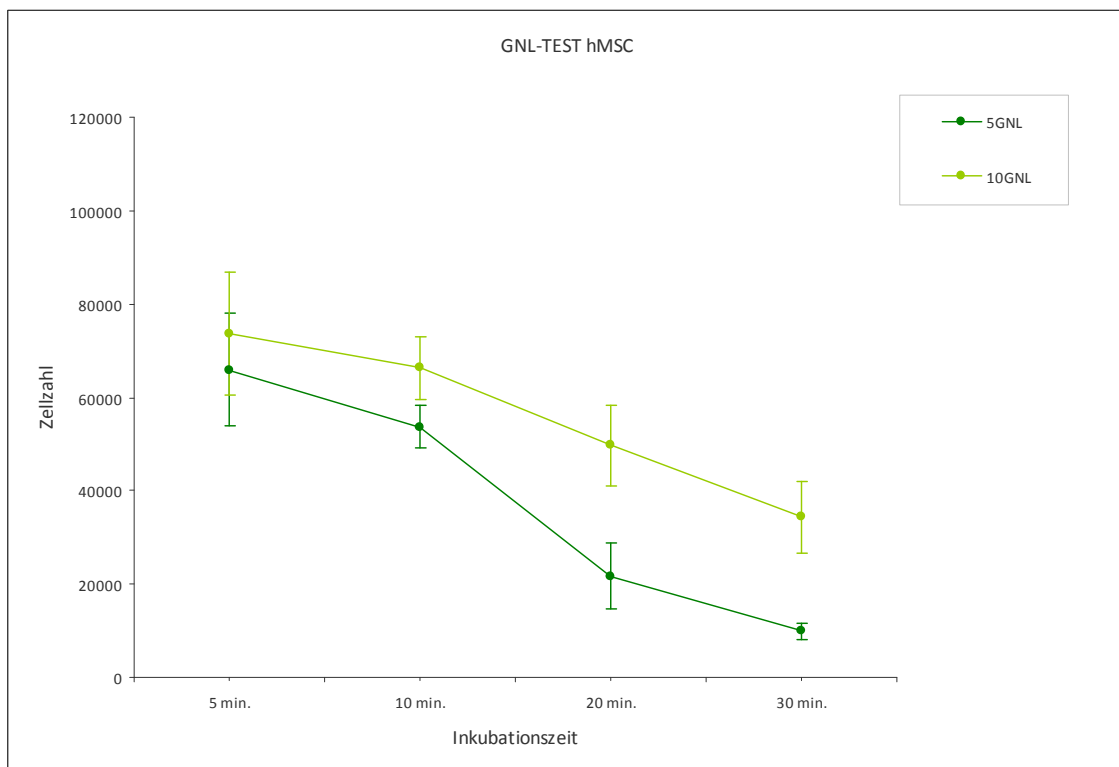


Abbildung 6-14: Zellzahl in Abhängigkeit zur Inkubationsdauer hMSC in 10GNL-MP und 5GNL-MP

6.11 Zellkultur - Verdichtete Implantatmatrix +/-Hyaluronsäurezusatz

6.11.1 Lebend-/Totfärbung

Um die Ausbreitung der Zellen und qualitative Viabilität auf den Implantatmatrices +/- HA-Zusatz analysieren zu können, werden Fluoreszenzfärbungen bzw. mikroskopische Bildaufnahmen nach einer Kultivierungsdauer von 1 d und 7 d angefertigt. Bovine und humane Bandscheibenzellen und Stammzellen werden mittig auf die Implantatstücke ausgesät. Die Lebend-Tot-Färbung wird mit den Farbstoffen Fluorescein-Diacetat (FDA) und Propidiumiodid (PI) durchgeführt. FDA lässt lebende Zellen grün erscheinen, PI tote Zellen rot. Die Abb. 6-15, 6-16 und 6-17 zeigt die Ausbreitung der vitalen grün fluoreszierenden bBSZ, hbSZ und hMSC über die gesamte Matrixoberfläche. Die Zellen proliferieren deutlich und besiedeln innerhalb von 7 d selbst den Randbereich, wie in Abb. 6-15 D deutlich erkennbar ist. Die hMSC werden ausschließlich auf Matrices +HA kultiviert. Abb 6-17 zeigt nach 1 und 7 d vereinzelt tote Zellen. Die Konfluenz beträgt nach 1 d bei allen Ansätzen 10-20 %, nach 7 d ca. 80 % bei den hbSZ und hMSC bzw. 95 % bei den bBSZ. Die Proliferation der bBSZ ist somit im Vergleich zu den hbSZ und hMSC stärker ausgeprägt. Weder nach 1 d noch nach 7 d sind bei den BSZ tote Zellen, die durch den Farbstoff PI rot fluoreszieren würden, zu finden. Lediglich am Boden der Well-Platte (hier nicht gezeigt) befinden sich vereinzelt tote bzw. abgelöste Zellen. Morphologisch betrachtet erscheinen die Bandscheibenzellen auf den Matrices -HA-Zusatz leicht kugelig. Im direkten Vergleich wirken die Zellen auf den HA-haltigen Implantaten etwas spindelförmiger. Dieses Resultat zeigt nicht nur, dass die Zellen ausreichend an den Implantaten adhärieren und sich über die gesamte Oberfläche hinweg ausbreiten, sondern bekräftigt zusätzlich zum Zytotoxizitätstest, dass keine toxischen Eigenschaften nach der Sterilisation mittels γ -Bestrahlung entstanden sind.

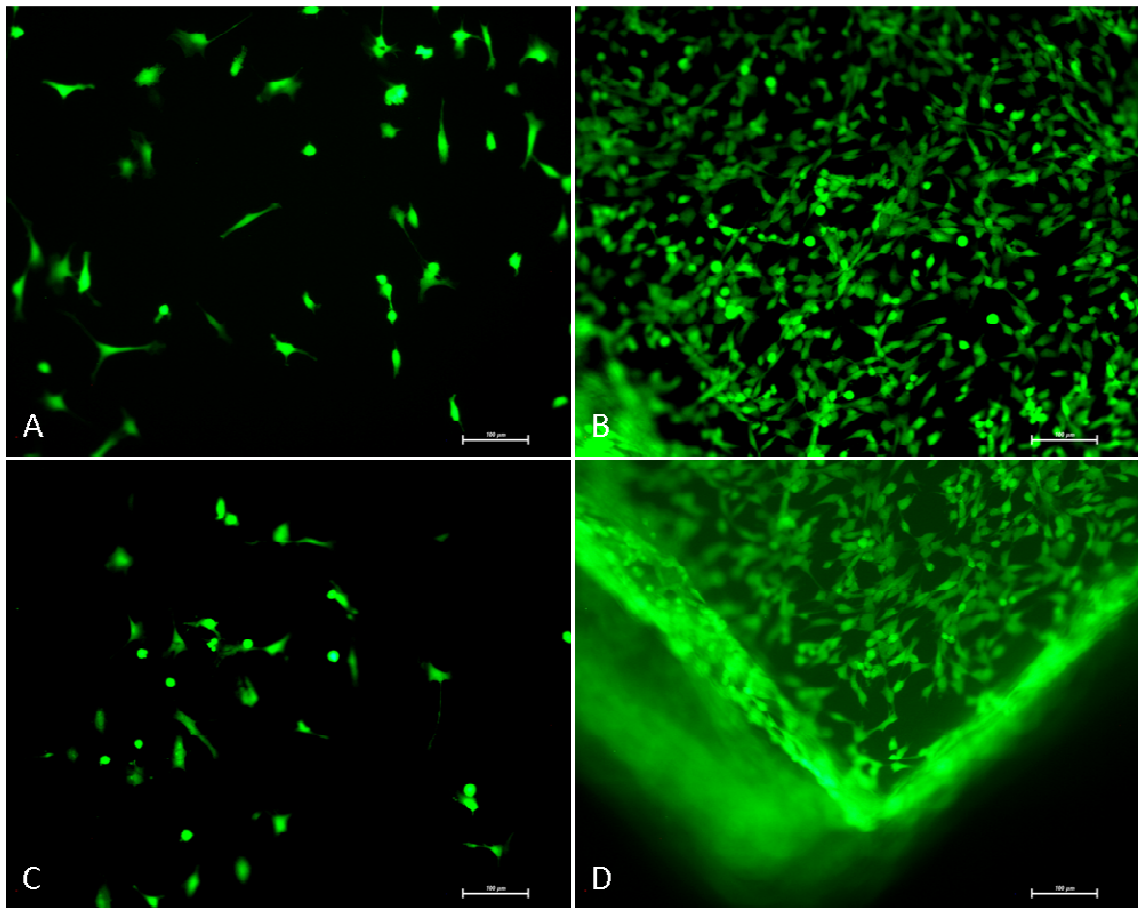


Abbildung 6-15: Fluoreszenzfärbung bBSZ auf der verdichteten Matrix +/-HA-Zusatz, Maßstab 100 µm.
A: -HA, nach 1 d; B: -HA, nach 7 d; C: +HA, nach 1 d; D: +HA nach 7 d

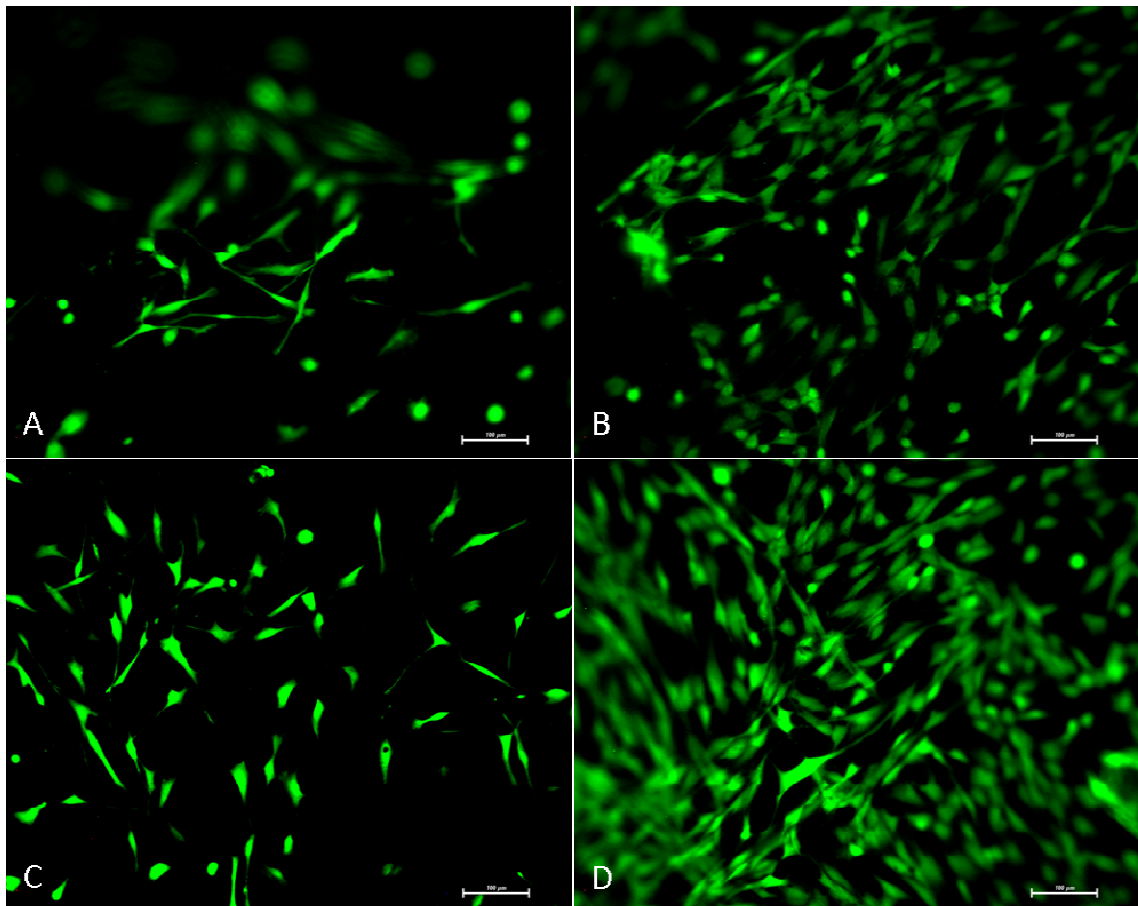


Abbildung 6-16: Fluoreszenzfärbung hBSZ auf der verdichteten Matrix +/-HA-Zusatz, Maßstab 100 μm . A: -HA, nach 1 d; B: -HA, nach 7 d; C: +HA, nach 1 d; D: +HA nach 7 d

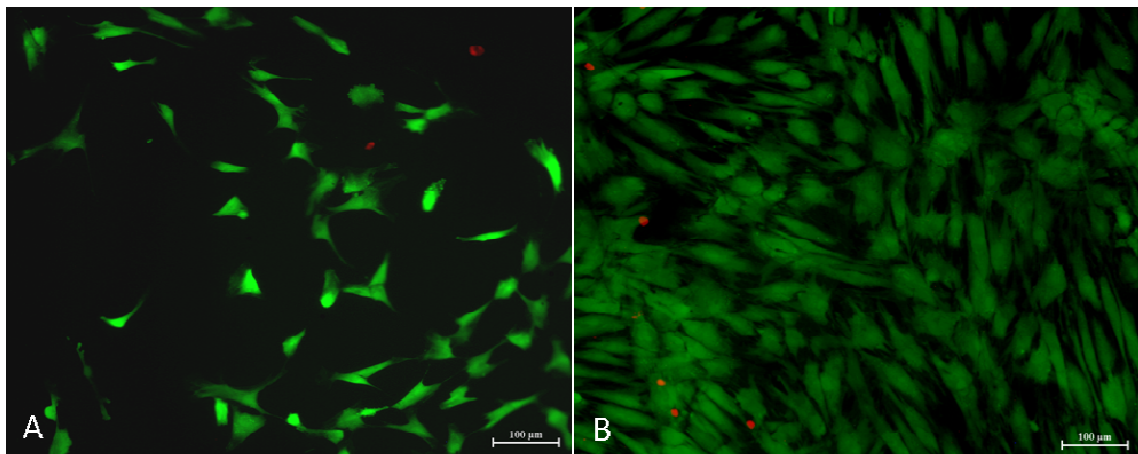


Abbildung 6-17: Fluoreszenzfärbung hMSC auf der verdichteten Matrix +HA-Zusatz, Maßstab 100 μm . A: nach 1 d; B: nach 7 d

6.11.2 Bestimmung der Proliferation und Viabilität humaner und boviner Bandscheibenzellen

Zur Ermittlung der Zellproliferation und quantitativen Viabilität in der verdichteten Implantatmatrix +/-HA-Zusatz werden bBSZ und hBSZ mit einer Zellzahl von 1×10^4 auf je 1 cm^2 Matrixstücke gesät und kultiviert. Die Bestimmung der Zellzahl und Viabilität erfolgt im Anschluss eines enzymatischen Verdaus mittels Neubauer-Zählkammer nach folgenden Zeitpunkten: 7, 14, 21 und 28 Tagen. Pro Auswertungszeitpunkt werden drei Stücke analysiert. In Abb. 6-18 und 6-19 ist die Proliferation der hBSZ und bBSZ graphisch dargestellt. Die hBSZ vermehren sich kontinuierlich und erreichen nach 28 d eine Zellzahl von durchschnittlich $2,12 \times 10^5$ -HA-Zusatz bzw. $2,52 \times 10^5$ +HA-Zusatz pro Matrixstück. Die Wachstumskurve der bBSZ -HA-Zusatz steigt bis zum Zeitpunkt 14 d auf $7,45 \times 10^5$ bzw. sinkt nach weiteren 7 Tagen auf $4,4 \times 10^5$ und steigt bis zum Zeitpunkt 28 d wieder auf $5,34 \times 10^5$ an. Die Kurve der bBSZ +HA-Zusatz steigt dagegen kontinuierlich bis zu einer Zellzahl von $6,1 \times 10^5$. Die Vitalität der hBSZ liegt über den gesamten Kultivierungszeitraum über 88 %, bei den bBSZ über 91 %.

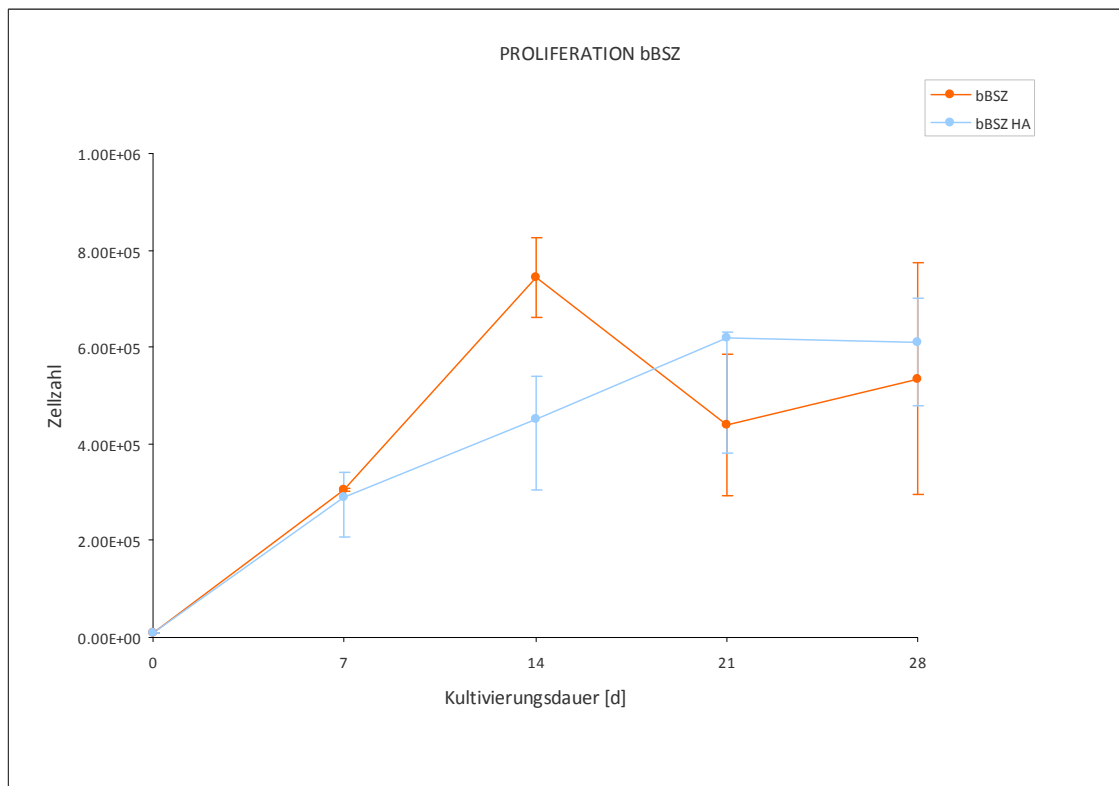


Abbildung 6-18: Proliferation bBSZ über 28 d in der verdichteten Implantatmatrix +/-HA-Zusatz

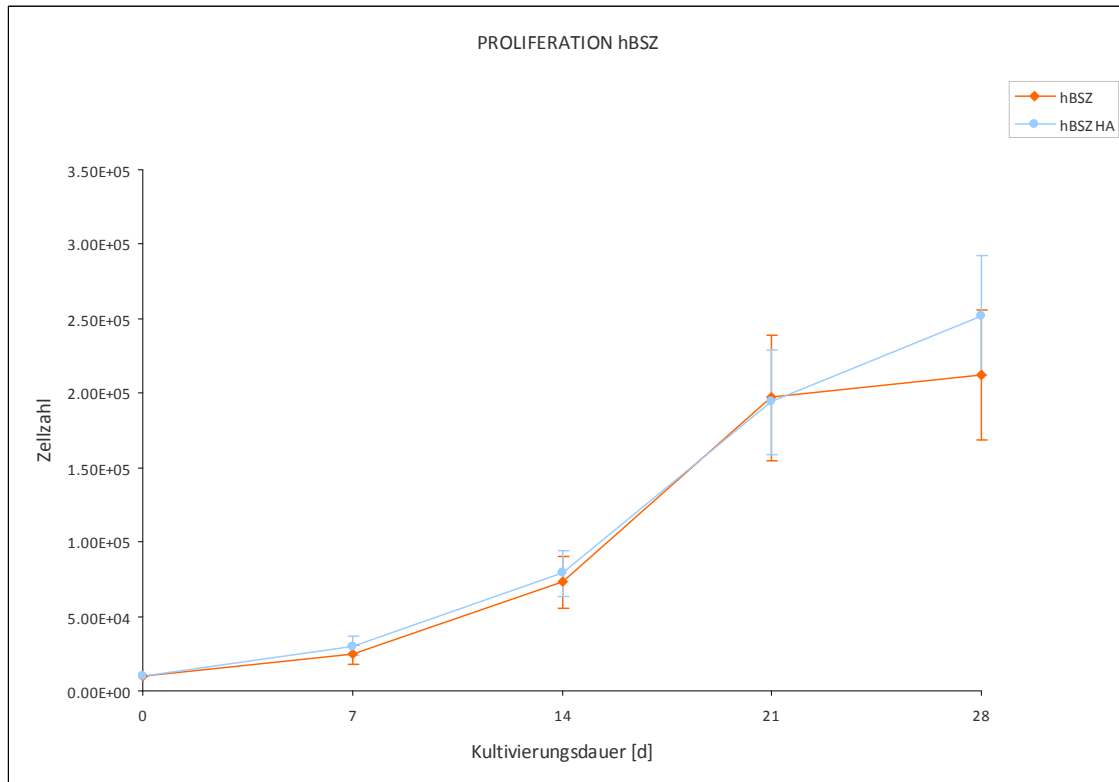


Abbildung 6-19: Proliferation hBSZ über 28 d in der verdichteten Implantatmatrix +/-HA-Zusatz

6.11.3 Histologie

Um die Besiedlung und Proliferation der BSZ in der verdichteten Implantatmatrix +/-HA-Zusatz langfristig beobachten zu können, werden bBSZ und hBSZ mit einer Zellzahl von 1×10^5 mittig auf ein Implantatstück gesät und 5 w (bBSZ) bzw. bis zu 9 w (hBSZ) kultiviert. Nach definierten Zeitpunkten werden histologische Schnitte angefertigt. Die darauf folgende Azanfärbung färbt Zellen rot und kollagene Bestandteile blau. Zur Vermeidung von Zellverlusten wird die Matrix kurz vor der Fixierung mit einer Schutzschicht aus Kollagen umhüllt. Dies ist in den nachfolgenden Abbildungen als hellblaue Schicht teilweise sichtbar.

Die Abb. 6-20 A+B zeigt die mit bBSZ besiedelte Matrix -HA, nach einer Kultivierungsdauer von 1 w und 5 w, im Vergleich zur HA-haltigen. Die Struktur der Matrices ist sichtbar unterschiedlich: Die Matrix +HA ist weniger kompakt, was über die helle Blaufärbung und die aufgelockerte Struktur ersichtlich wird. Die HA-freie Matrix erscheint dagegen dichter und dunkelblau. Die nach 1 w oberflächlich besiedelten Implantate werden nach einer Kultivierungsdauer von weiteren 4 w auch in den tiefen Schichten

von Zellen durchdrungen. Die Zellzahl nimmt deutlich zu. Nach 5 w ist die Verteilung der bBSZ in der Matrix +HA-Zusatz homogener im Vergleich zur Matrix -HA. Die Zellen liegen gleichmäßig verteilt innerhalb des Kollagennetzwerks, wobei stets eine dünne Zelllage die Implantatoberfläche umgibt. Im Kontrast dazu befindet sich eine mehrlagige Zellschicht auf der Matrix -HA-Zusatz und nur ein geringer Anteil innerhalb.

Auf Grund der geringeren Proliferationsrate der hBSZ, verglichen mit den bBSZ, wird deren Kultivierungsdauer auf 9 w verlängert. Die Abb. 6-21 A, B und C zeigen die Matrix -HA-Zusatz nach 1, 5 und 9 w im Vergleich zu Abb. 6-21 D, E und F, welche die Zellproliferation in der HA-haltigen Matrix darstellen. Auch hier ist der strukturelle Unterschied zwischen den Matrices deutlich über die verschiedenen Blau-Intensitäten sichtbar. Die Matrices sind anfänglich ebenfalls nur gering an der Oberfläche besiedelt. Nach einer Kultivierungsdauer von 5 Wochen ist die Matrix +HA mit einer Vielzahl von hBSZ homogen besiedelt, wohingegen die tiefen Schichten der zusatzlosen Matrix gering durchwachsen werden. Auch nach weiteren 4 w wird das Implantat -HA-Zusatz nicht vollständig, nur in den Randzonen, von hBSZ besiedelt. Die Matrix +HA-Zusatz ist komplett von Zellen durchdrungen, die sich größtenteils parallel zu den kollagenen Fasern ausrichten.

Zusammenfassend wird festgestellt, dass der Zusatz von HA in der verdichteten Kollagenmatrix einen Vorteil bezüglich der Besiedlung und Proliferation boviner und humaner BSZ bietet.

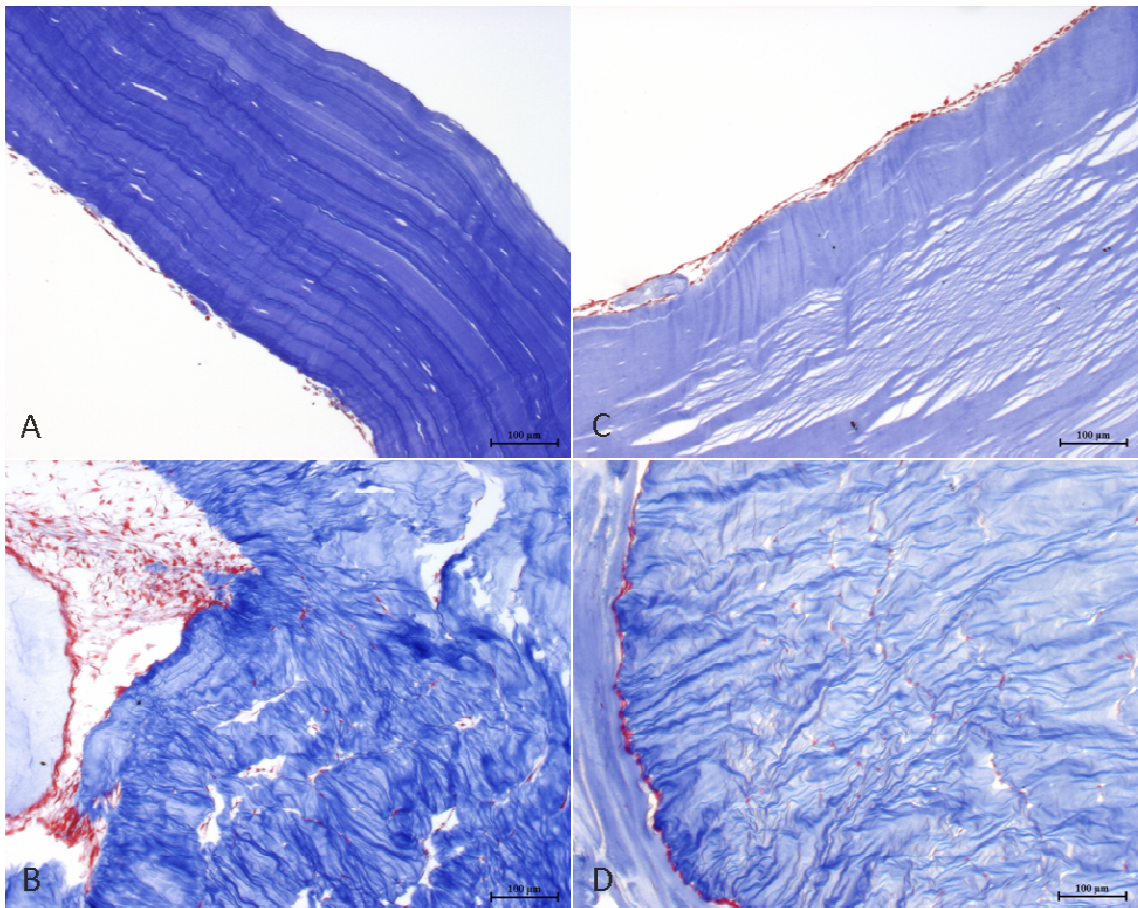


Abbildung 6-20: Besiedlung und Proliferation bBSZ in der verdichteten Matrix. A: Kultivierungsdauer 1 w -HA-Zusatz; B: Kultivierungsdauer 5 w -HA-Zusatz; C: Kultivierungsdauer 1 w +HA-Zusatz; D: Kultivierungsdauer 5 w +HA-Zusatz; Maßstab 100 µm

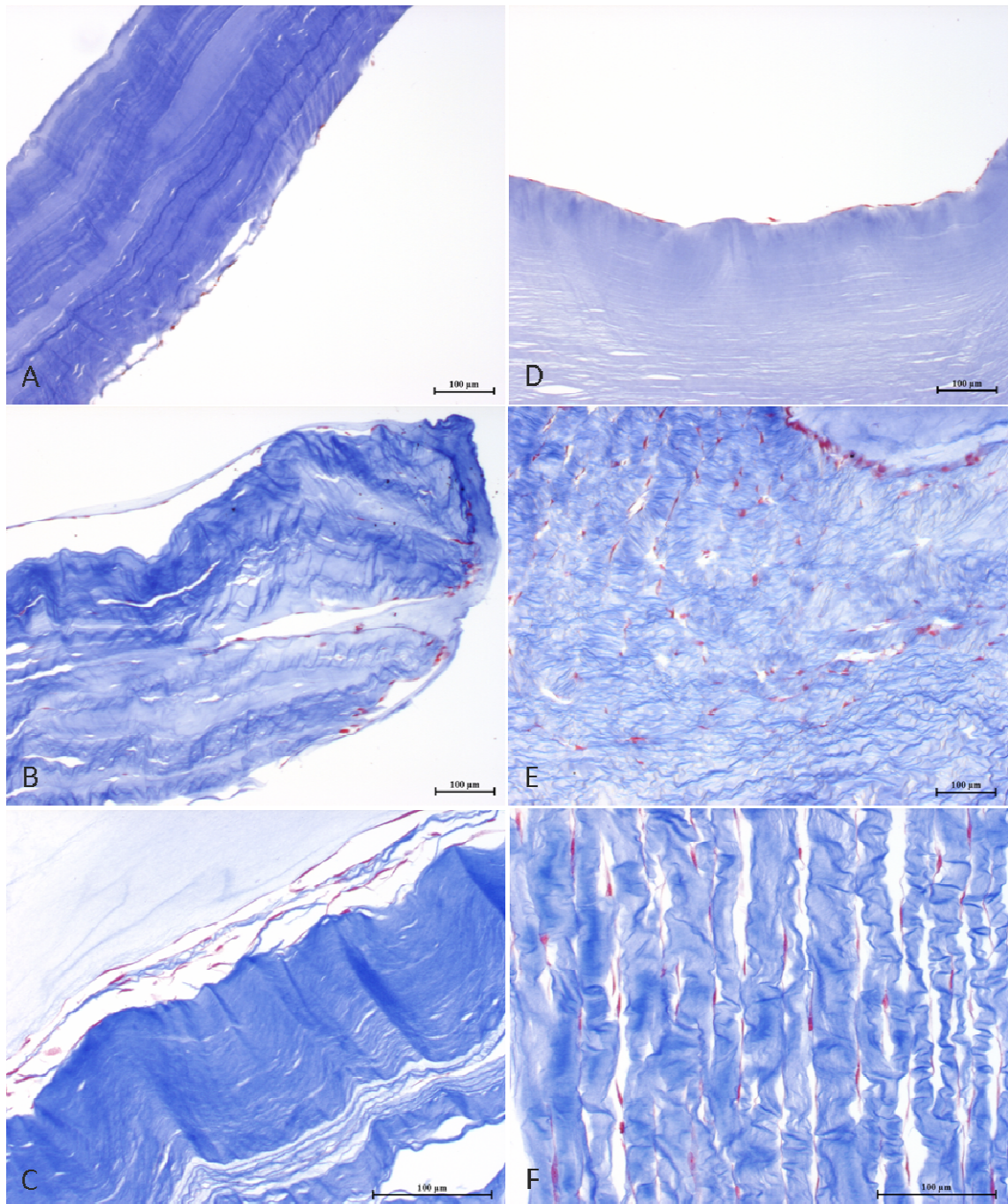
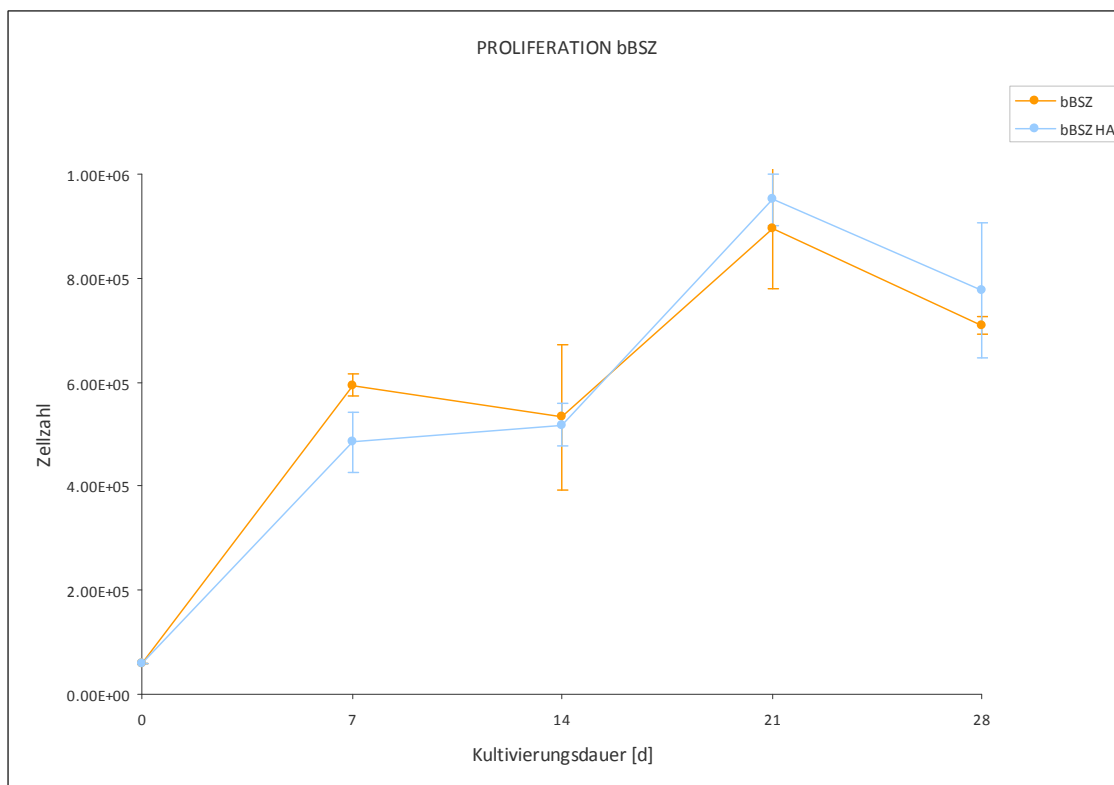
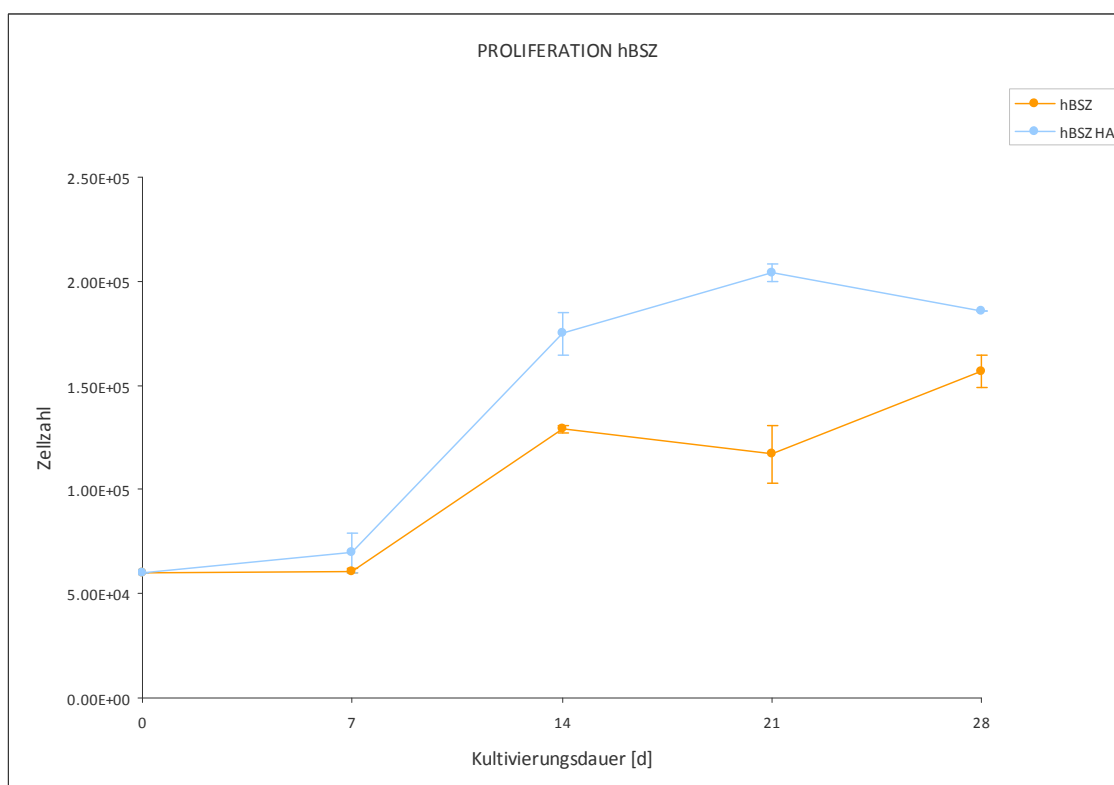


Abbildung 6-21: Besiedlung und Proliferation hBSZ in der verdichteten Matrix. A: Kultivierungsdauer 1 w -HA-Zusatz; B: Kultivierungsdauer 5 w -HA-Zusatz; C: Kultivierungsdauer 9 w -HA-Zusatz; D: Kultivierungsdauer 1 w +HA-Zusatz; E: Kultivierungsdauer 5 w +HA-Zusatz; F: Kultivierungsdauer 9 w +HA-Zusatz; Maßstab 100 µm

6.12 Zellkultur - ChondroFiller^{liquid} +/-Hyaluronsäurezusatz

6.12.1 Bestimmung der Proliferation und Viabilität humaner, boviner Bandscheiben- und Stammzellen

Zur Ermittlung der Zellproliferation und quantitativen Viabilität in der ChondroFiller^{liquid} Matrix +/-HA-Zusatz werden bBSZ, hBSZ und hMSC mit einer Zellzahl von 6×10^4 in 625 μ l Kollagengel gesät und kultiviert. Die Bestimmung der Zellzahl und Viabilität erfolgt im Anschluss eines enzymatischen Verdauens mittels Neubauer-Zählkammer nach folgenden Zeitpunkten: 7, 14, 21 und 28 d. Pro Auswertungszeitpunkt werden 3 Gele analysiert. In Abb. 6-22, 6-23, und 6-24 ist die Proliferation der bBSZ, hBSZ und hMSC graphisch dargestellt. Die bBSZ proliferieren im Vergleich zu den hBSZ und hMSC stärker und erreichen im Mittel nach 28 d eine Zellzahl von $7,77 \times 10^5$ in der Matrix +HA-Zusatz bzw. $7,09 \times 10^5$ in der Matrix -HA-Zusatz. Die Vitalität liegt stets über 90 %. Die hBSZ vermehren sich ebenfalls kontinuierlich, so dass am letzten Auswertungszeitpunkt eine Zellzahl von $1,86 \times 10^5$ in der HA-haltigen Matrix bzw. $1,57 \times 10^5$ in der HA-freien sowie eine Vitalität von über 93 % ermittelt wird. Die Analyse der hMSC Matrices ergibt nach 7 d eine Reduktion der Anfangszellzahl von 6×10^4 auf $3,25 \times 10^4$ in der Matrix +HA-Zusatz bzw. $1,69 \times 10^4$ in der Matrix -HA-Zusatz. In den nachfolgenden 21 d der Kultivierung steigt die Zellzahl wieder. So erreichen die hMSC nach 28 d eine Zellzahl von $1,25 \times 10^5$ in der HA-haltigen Matrix bzw. $9,48 \times 10^4$ in der HA-freien Matrix. Die Vitalität liegt im Verlauf des gesamten Kultivierungszeitraums bei über 89 %. Insgesamt ist die Proliferation der drei verwendeten Zelltypen in der Matrix +HA-Zusatz gegenüber der HA-freien erhöht.

Abbildung 6-22: Proliferation bBSZ in der ChondroFiller^{liquid} Implantatmatrix +/-HA-ZusatzAbbildung 6-23: Proliferation hBSZ in der ChondroFiller^{liquid} Implantatmatrix +/-HA-Zusatz

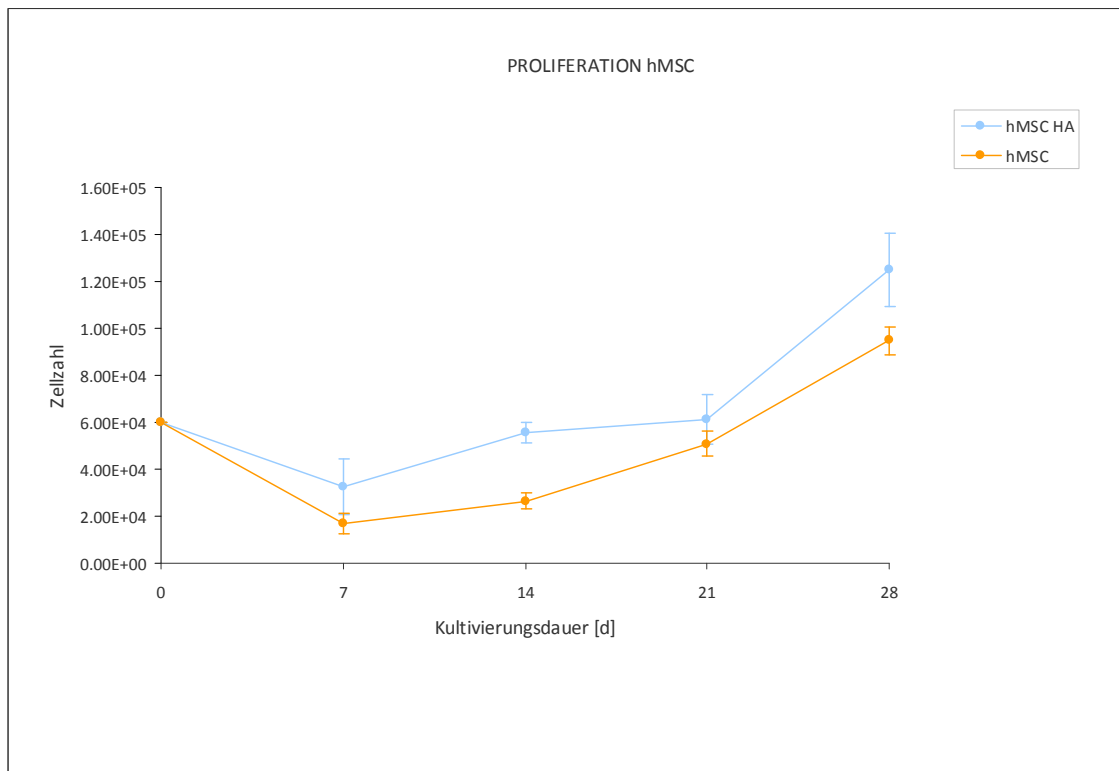


Abbildung 6-24: Proliferation hMSC in der ChondroFiller^{liquid} Implantatmatrix +/-HA-Zusatz

6.12.2 Histologie

Für die nachfolgenden Versuche wird die ChondroFiller^{liquid} Matrix ausschließlich +HA-Zusatz verwendet.

Um die Zellproliferation der bBSZ, hBSZ und hMSC in der ChondroFiller^{liquid} Matrix langfristig beobachten zu können, werden Matrices mit einer Zellzahl von 6×10^4 hergestellt und 28 d kultiviert. Nach 7, 14, 21 und 28 d werden histologische Schnitte angefertigt. Die darauf folgende Azanfärbung färbt Zellen rot und kollagene Bestandteile blau.

Die Abb. 6-25 A+B zeigt die mit bBSZ, hBSZ und hMSC besiedelte Matrix nach einer Kultivierungsdauer von 1 w und 4 w, wobei für die Aufnahmen der hMSC auf Grund der Zellgröße ein kleinerer Maßstab gewählt wird. Die Proliferation der drei verwendeten Zelltypen ist, analog zu Kapitel 6.12.1, auch optisch sichtbar. Die anfänglich gering besiedelte Matrix enthält nach 4 w eine Vielzahl an Zellen. Deren Verteilung innerhalb des Gels ist homogen. An den Randzonen oder Hohlräumen bilden sich mehrschichtige Zellansammlungen, an welchen die Matrix teilweise leicht komprimiert wird. Insbesondere die bBSZ und hMSC ziehen die Matrix partiell zusammen. Dies ist an den dun-

kelblauen Bereichen bzw. dem Wechsel der anfänglich blassblauen zu einer dunkelblauen und strukturierten Matrix optisch ersichtlich. Auch makroskopisch ist eine leichte Komprimierung über den Kultivierungsverlauf hinweg beobachtbar. Morphologisch betrachtet weisen die bBSZ und hBSZ einen spindelförmigen Phänotyp auf. Die hMSC entwickeln, begründet durch die chondrogene Differenzierung, ein rundliches Erscheinungsbild.

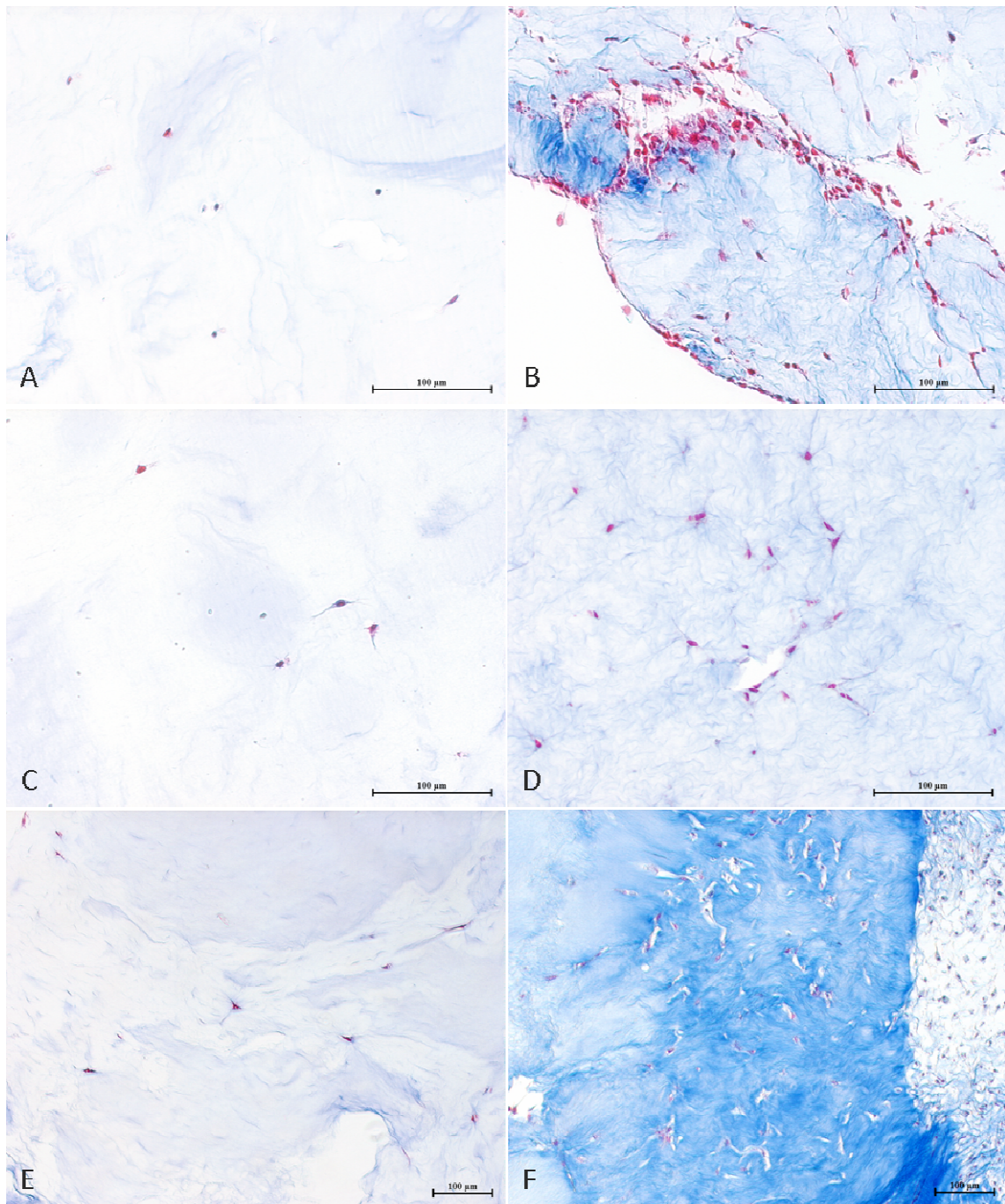


Abbildung 6-25: Besiedlung und Proliferation bBSZ, hBSZ und hMSC in der ChondroFiller^{liquid} Matrix +HA-Zusatz. A: Kultivierungsdauer 1 w bBSZ; B: Kultivierungsdauer 4 w bBSZ; C: Kultivierungsdauer 1 w hBSZ; D: Kultivierungsdauer 4 w hBSZ; E: Kultivierungsdauer 1 w hMSC; F: Kultivierungsdauer 4 w hMSC; Maßstab 100 µm

6.12.3 Quantitative Bestimmung synthetisierter sulfatierter Glykosaminoglykane

Für den Assay wird die ChondroFiller^{liquid} Matrix ausschließlich +HA-Zusatz verwendet.

Der Blyscan Assay eignet sich zum quantitativen Nachweis sulfatierter Glykosaminoglykane (sGAG). Dazu zählen Chondroitin-4-Sulfat, Chondroitin-6-Sulfat und Keratansulfat, die in der extrazellulären Matrix von nativem Nukleusgewebe stets vorkommen. So setzen sich nach Kitano et al., 1993 die sGAG einer nicht degenerativ veränderten Bandscheibe zu 72,3 % aus Chondroitinsulfat und zu 18,1 % aus Keratansulfat zusammen. Der Assay dient der Analyse, inwieweit ein Matrixumbau durch die Zellen erfolgt. Das Diagramm in Abb. 6-26 spiegelt die Synthese von sGAG innerhalb der ChondroFiller^{liquid} Matrix +HA-Zusatz nach einer Kultivierungsdauer von 21 d wieder. In diesem Versuchsansatz treten deutliche Varianzen unter den Zellen der humanen Spender auf. Daher werden die Ergebnisse der drei Spender pro Zelltyp separat dargestellt. So beträgt die synthetisierte Menge an sGAG der hMSC Spender 43,8, 28,9 bzw. 23,3 µg und der bBSZ im Mittel 50,8 µg. Die Syntheserate der hBSZ liegt bei zwei Spendern mit 7,8 und 8,4 µg deutlich darunter. Nur die Zellen eines Spenders synthetisieren eine mit den anderen Zelltypen vergleichbare Menge von 35,9 µg.

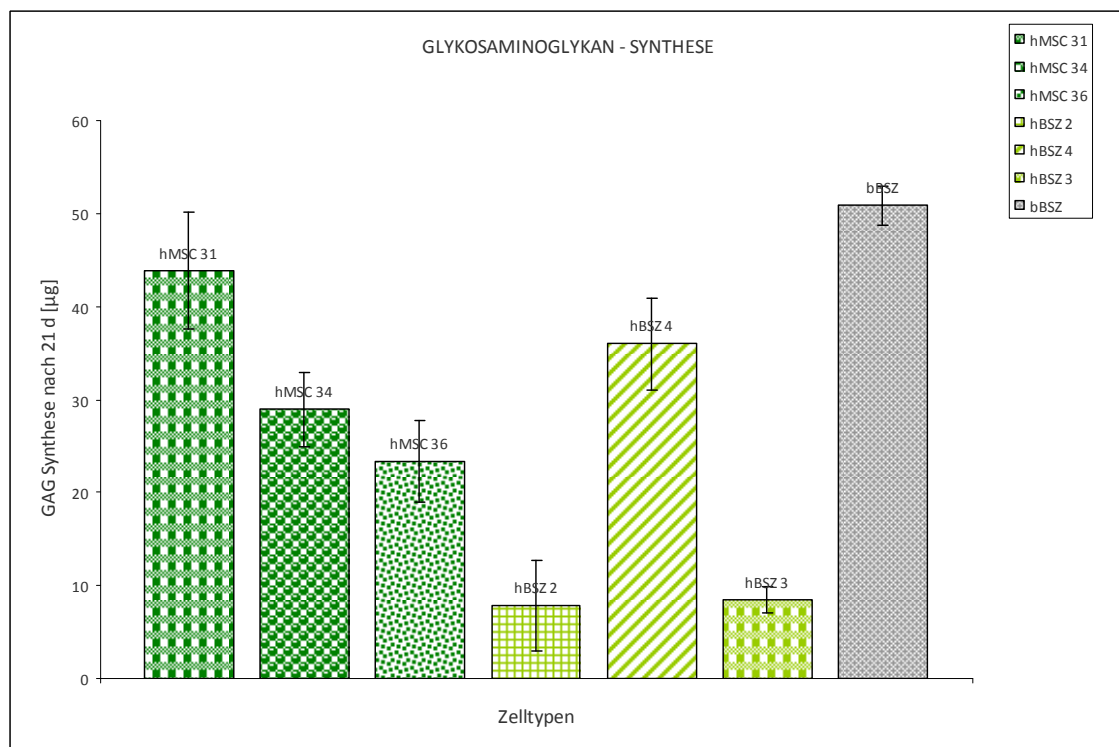


Abbildung 6-26: Synthese sulfatierter Glykosaminoglykane nach einer Kultivierungsdauer von 21 d in der ChondroFiller^{liquid} Matrix +HA-Zusatz; 3 x hMSC, 3 x hBSZ und 1 x bBSZ

6.13 Genexpression

Zur Untersuchung der Genexpression wird sowohl die ChondroFiller^{liquid} Matrix als auch die verdichtete Implantatmatrix ausschließlich +HA-Zusatz verwendet.

Um den Metabolismus der bBSZ und hBSZ sowie die chondrogene Differenzierung der hMSC während der Kultivierung in der verdichteten Implantatmatrix und der ChondroFiller^{liquid} Matrix zu analysieren, wird eine qualitative PCR durchgeführt. Als Positivkontrolle (hier nicht dargestellt) dient das housekeeping-Gen Glyceraldehyde 3-Phosphat Dehydrogenase (GAPDH). Es werden sowohl die Expression anaboler Matrixgene wie Aggrekan, Kollagen Typ I und Kollagen Typ II, als auch des katabolen matrixdegradierenden Enzyms MMP-2 untersucht. Die hMSC werden ausschließlich in der ChondroFiller^{liquid} Matrix kultiviert.

Abb. 6-27 zeigt die Expression des anabolen Matrixgens Aggrekan nach einer Kultivierungsdauer von 1 d, 14 d und 28 d. Aggrekan wird zu jedem Zeitpunkt von allen drei verwendeten Zelltypen exprimiert. Die spezifischen Banden befinden sich bei 155 bp (bBSZ) bzw. 190 bp (hBSZ und hMSC) und weisen eine gleichmäßige Stärke auf. Lediglich die Bande der hBSZ nach einer Kultivierung von 24 h in der verdichteten Matrix ist relativ schwach ausgeprägt. Analog dazu wird die Synthese von Kollagen Typ I ebenfalls an jedem Auswertungszeitpunkt über den gesamten Kultivierungszeitraum nachgewiesen. Die spezifischen Banden treten bei 142 bp (bBSZ) bzw. 650 bp (hBSZ und hMSC) auf (Abb. 6-28). Die Expression von Kollagen Typ II ist in Abb. 6-29 dargestellt. Die bBSZ exprimieren dieses kontinuierlich sowohl in der verdichteten als auch in der ChondroFiller^{liquid} Matrix. Die Banden bilden sich auf der Höhe von 145 bp. Dagegen erfolgt die konstante Synthese der hBSZ lediglich in der ChondroFiller^{liquid} Matrix. In der verdichteten Implantatmatrix ist nach einer Kultivierungsdauer von 14 d und 28 d keine spezifische Bande bei 490 bp detektierbar.

Die Expression von Kollagen Typ II dient als Nachweis einer erfolgreichen chondrogenen Differenzierung der hMSC. Die charakteristische Bande ist bereits ab einer Kultivierungsdauer von 14 d detektierbar, obgleich nach Herstellerangaben des Differenzierungsmediums eine vollständige Differenzierung erst nach 21 d erreicht wird. Die Kollagen Typ II Expression wird durch die enthaltenen Faktoren des Mediums folglich innerhalb von 14 d induziert. Die Expression des katabolen matrixdegradierenden En-

zyms MMP-2 erfolgt kontinuierlich und ist an jedem Auswertungszeitpunkt durch die spezifischen Banden bei 208 bp (bBSZ) bzw. 185 bp (hBSZ und hMSC) nachweisbar. Lediglich nach einer Kultivierungsdauer von 1 d ist keine Bande der hBSZ in der verdichteten Matrix zu detektieren (Abb. 6-30).

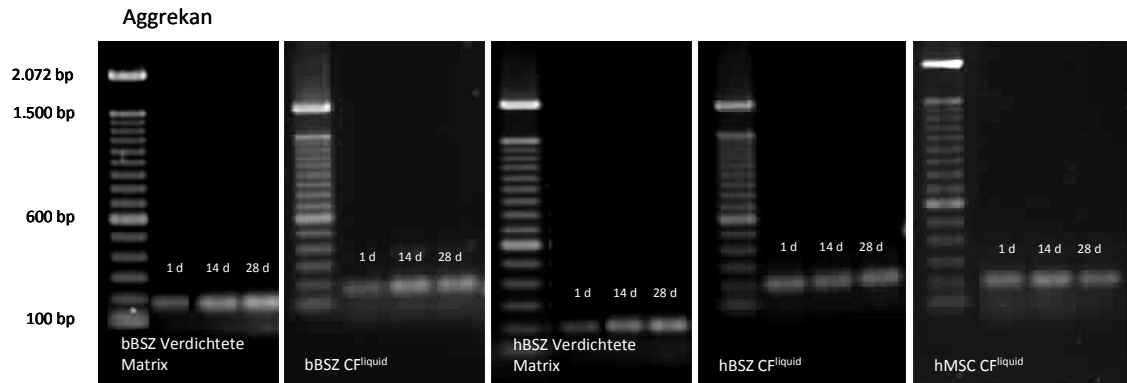


Abbildung 6-27: Genexpression Aggrekan. Verdichtete Matrix: bBSZ und hBSZ; ChondroFiller^{liquid} Matrix: bBSZ, hBSZ und hMSC; nach 1, 14 und 28 d

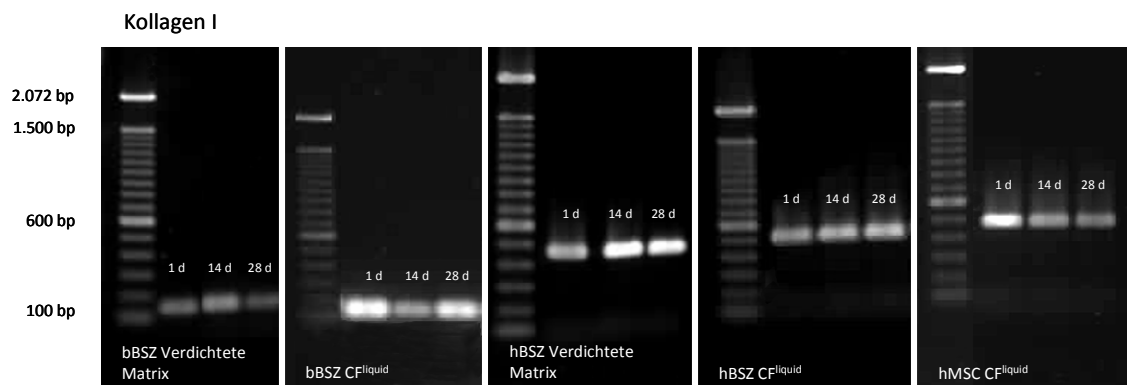


Abbildung 6-28: Genexpression Kollagen Typ I. Verdichtete Matrix: bBSZ und hBSZ; ChondroFiller^{liquid} Matrix: bBSZ, hBSZ und hMSC; nach 1, 14 und 28 d

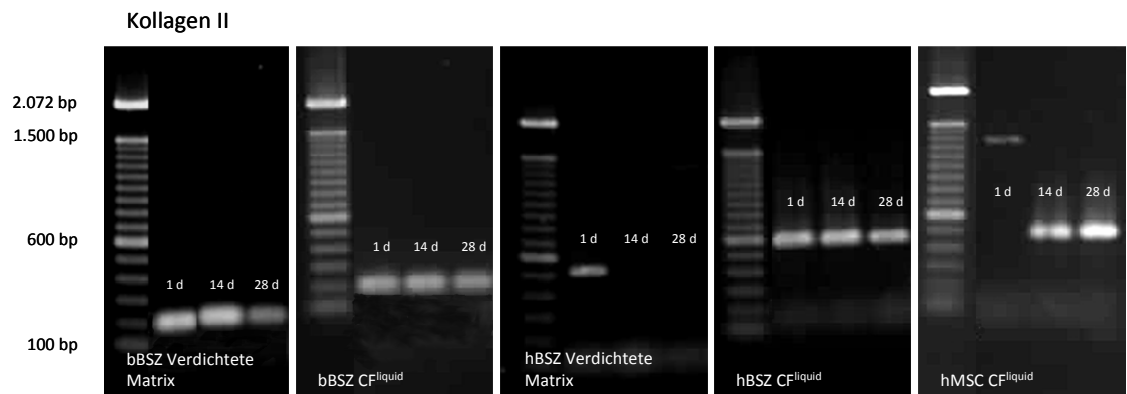


Abbildung 6-29: Genexpression Kollagen Typ II. Verdichtete Matrix: bBSZ und hBSZ; ChondroFiller^{liquid} Matrix: bBSZ, hBSZ und hMSC; nach 1, 14 und 28 d



Abbildung 6-30: Genexpression MMP-2. Verdichtete Matrix: bBSZ und hBSZ; ChondroFiller^{liquid} Matrix: bBSZ, hBSZ und hMSC; nach 1, 14 und 28 d

6.14 Migration in ChondroFiller^{liquid} und die verdichtete Implantatmatrix

Zur Untersuchung der Zellmigration wird sowohl die ChondroFiller^{liquid} Matrix als auch die verdichtete Implantatmatrix ausschließlich +HA-Zusatz verwendet.

6.14.1 In vitro Kultursystem

Die Idee beide Implantatmatrices in Kombination als Nukleusersatz zu implantieren, führt zu einem in vitro Kultursystem, indem die Migration boviner und humaner BSZ in die verdichtete Matrix untersucht werden soll. Wird ChondroFiller^{liquid} mit Zellen als Additivum verwendet, entsteht eine zelluläre Gelmatrix, mit der Hohlräume geschlossen werden sollen und ein Konnektiv zum verdichteten Implantat entstehen soll.

Das Modell setzt sich aus einer zellulären ChondroFiller^{liquid} Matrix und einer darin eingebetteten verdichteten Implantatmatrix zusammen. Die Kultivierung erfolgt über einen Zeitraum von 10 w. Abb. 6-31 A zeigt den Besiedlungsbeginn bBSZ nach 1 w. Die Zellen migrieren aus der ChondroFiller^{liquid} Matrix zum Randbereich der verdichteten Implantatmatrix. Nach weiteren 9 w (Abb. 6-31 B) ist die Zellmigration weiter fortgeschritten. Die Randschichten der verdichteten Matrix sind von einigen Zellen besiedelt. Zudem finden sich vereinzelte Zellen in tieferen Schichten. Die Migration der hBSZ findet vergleichsweise langsamer statt. Wie in Abb. 6-32 A ersichtlich, nähern sich diese Zellen nach 1 w der verdichteten Matrix an, gehen jedoch noch keine Verbindung zur Randzone ein. Nach einer Kultivierungsdauer von 10 w befinden sich vereinzelte Zellen in den äußeren Schichten der verdichteten Matrix.

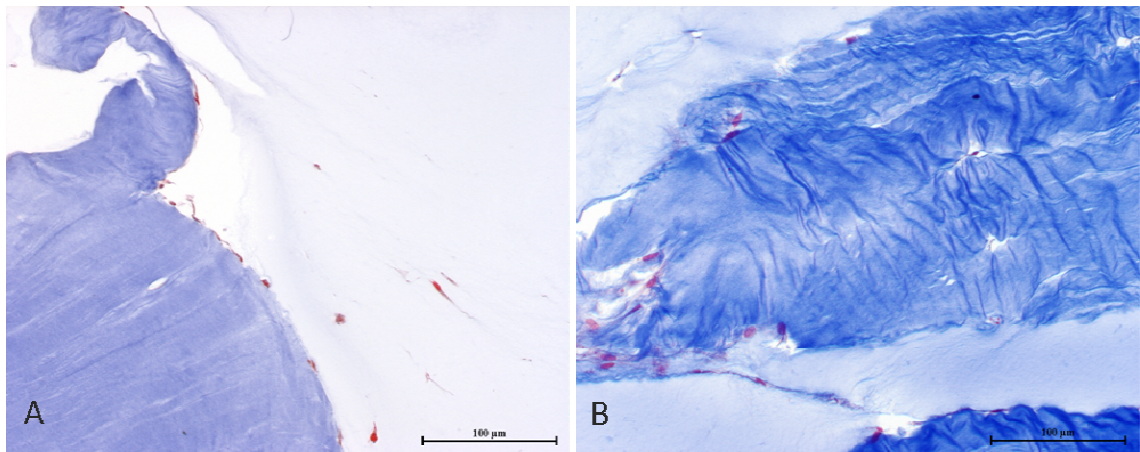


Abbildung 6-31: In vitro Kultursystem - Migration bBSZ aus der ChondroFiller^{liquid} Matrix in die verdichtete Implantatmatrix. A: Kultivierungsdauer 1 w; B: Kultivierungsdauer 10 w; Maßstab 100 µm

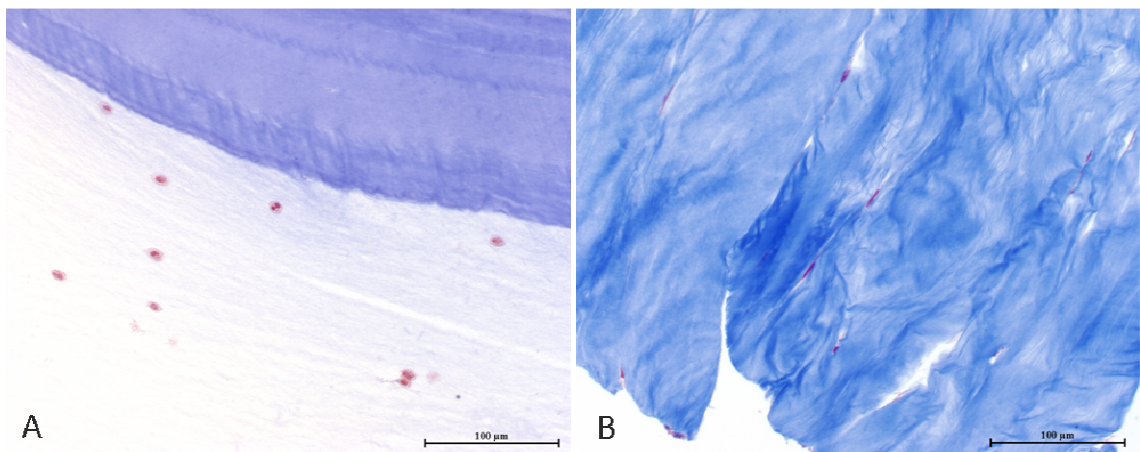


Abbildung 6-32: In vitro Kultursystem - Migration hBSZ aus der ChondroFiller^{liquid} Matrix in die verdichtete Implantatmatrix. A: Kultivierungsdauer 1 w; B: Kultivierungsdauer 10 w; Maßstab 100 µm

6.14.2 Ex vivo Ansatz - bovin

Als weiterer Testansatz zur Beobachtung der Zellmigration bzw. Besiedlung der grundsätzlich azellulär implantierbaren ChondroFiller^{liquid} Matrix und der verdichteten Implantatmatrix werden frisch isolierte bovine Bandscheiben verwendet. Nach einer partiellen Nukleotomie wird die verdichtete Matrix in den entstandenen Defekt eingesetzt. Anschließend erfolgt eine Füllung aller optisch erkennbaren Hohlräume mit dem System ChondroFiller^{liquid}, um ein Konnektiv zum nativen Nukleusgewebe herzustellen. Die Kultivierung erfolgt über einen Zeitraum von 13 w. In Abb. 6-33 ist die Besiedlung der Matrices dargestellt. Bild A+B zeigt die Verbindung von nativem Nukleusgewebe mit der ChondroFiller^{liquid} Matrix und der verdichteten Matrix nach 10 w. Innerhalb

dieses Zeitraums sind Nucleuszellen aus dem Nativgewebe in Richtung der Matrices migriert. Zwischen Nativgewebe und ChondroFiller^{liquid} Matrix ist eine Zellschicht zu sehen. Beide Matrices sind in tieferen Schichten von wenigen Zellen besiedelt. Nach einer Kultivierungsdauer von 13 w ist die Besiedlung deutlich gestiegen (Abb. 6-33 C-E). So befindet sich ein Großteil der Zellen nicht mehr an den Randzonen, sondern auch innerhalb der Matrices. Die Zelldichte entspricht in der verdichteten Matrix der des nativen Gewebes (Vergleich Abb. 6-35 A+B). Die Dichte in der ChondroFiller^{liquid} Matrix ist dagegen etwas erhöht. Bezüglich der Morphologie weisen die Zellen in der verdichteten Implantatmatrix hauptsächlich einen rundlichen, chondrozytären Phänotyp auf (Abb. 6-34 B). In der ChondroFiller^{liquid} Matrix hingegen finden sich tendenziell spindelförmige aber auch rundliche Zellformen (Abb. 6-34 A).

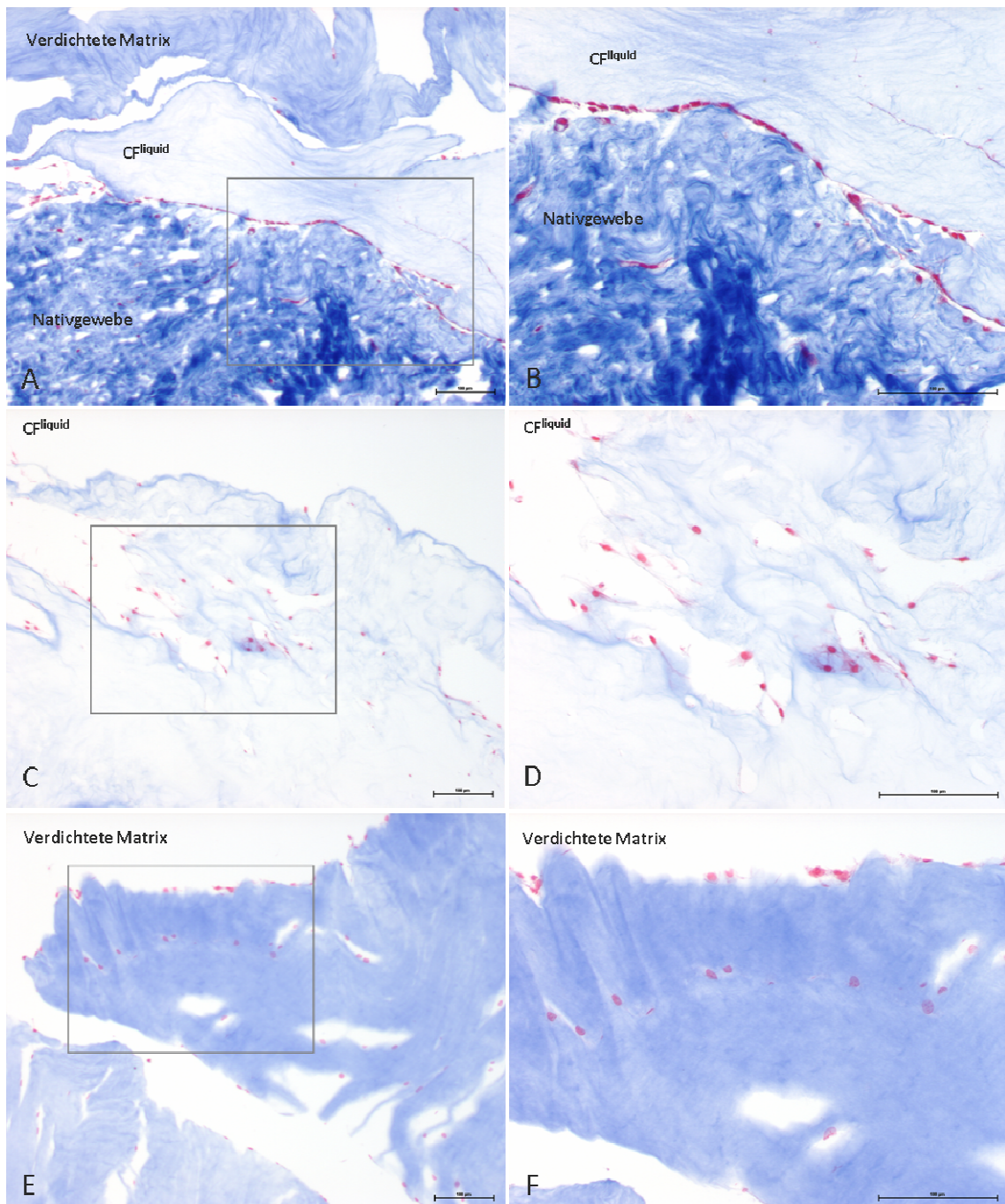


Abbildung 6-33: Ex vivo Ansatz. Organkultivierung boviner Bandscheiben nach einer partiellen Nukleotomie inklusive der implantierten azellulären Matrices (ChondroFiller^{liquid} + verdichtete Matrix). A: Zellschicht an der Randzone des Nativgewebes zu ChondroFiller^{liquid} nach 10 w; B: vergrößerter Ausschnitt von A; C: Besiedelte ChondroFiller^{liquid} Matrix nach 13 w; D: vergrößerter Ausschnitt von C; E: Besiedlung der verdichteten Matrix nach 13 w; F: vergrößerter Ausschnitt von E; Maßstab 100 µm

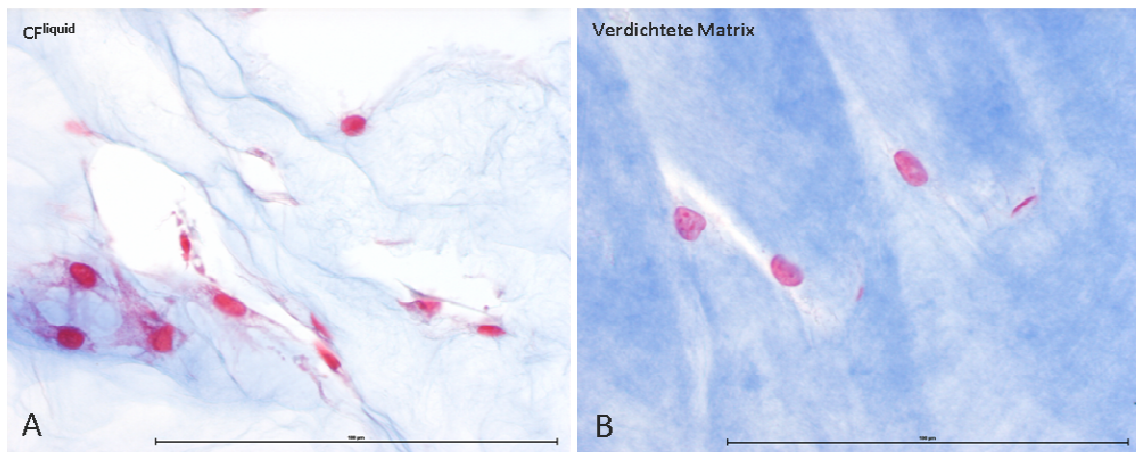


Abbildung 6-34: Ex vivo Ansatz Morphologie der Zellen nach 13 w. A: ChondroFiller^{liquid} Matrix; B: verdichtete Implantatmatrix; Maßstab 100 µm

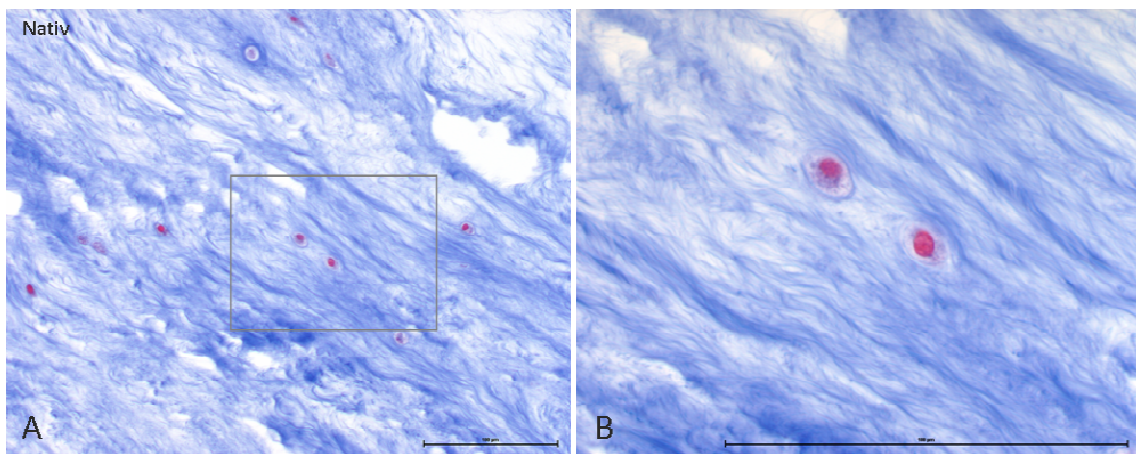


Abbildung 6-35: Ex vivo Ansatz Morphologie der Zellen. A: Verteilung und Dichte der Zellen im nativen Nucleusgewebe nach 1 w; B: vergrößerter Ausschnitt von A; Maßstab 100 µm

6.15 Biomechanische Testung/Zyklische Dauerbelastung

Die durchgeführten biomechanischen Testungen beinhalten Flexibilitäts- und Höhenmessungen sowie eine zyklische Dauerbelastung der lumbalen Segmente in drei unterschiedlichen Zuständen im Verlauf: intakt, nukleotomiert und implantiert. Begründet durch Extrusionen als Folge der zyklischen Dauerbelastung nimmt die Zahl der Präparate von $n = 6$ auf bis zu $n = 1$ ab. 2 von 6 Implantaten extrudieren unterhalb von 10.000 Zyklen, 2 nach 10.000 Zyklen, 1 nach 20.000 Zyklen und 1 nach 40.000 Zyklen. Die Extrusion erfolgt in allen Fällen durch die offene Anulusinzision. Makroskopisch ist mit zunehmender Zyklenzahl eine Austrocknung der extrudierten Matrices zu beobachten.

6.15.1 Höhenmessung

Die Nukleotomie führt mit einem Median von -0,5 mm im Vergleich zum Median des Intaktzustandes von 0 mm zu einem Abfall der Höhe des Bewegungssegmentes. Wie in Abb. 6-36 dargestellt, kann dieser Höhenverlust durch die Implantation des Nukleuser-satzes weitestgehend ausgeglichen werden. Hiermit ist eine wesentliche Anforderung, die Erlangung der ursprünglichen Höhe, erfüllt. Initiiert durch die unmittelbar folgende zyklische Dauerbelastung, sinkt die Segmenthöhe nach 10.000 Zyklen auf Werte ähnlich des Zustandes nach der Nukleotomie. Begründet durch Extrusionen steht für die Messungen von 20.000 und 40.000 Zyklen nur 1 Präparat zur Verfügung. Nach 20.000 Zyklen liegt der Messwert von -0,6 mm ebenfalls im Bereich des nukleotomierten Zustandes. Nach 40.000 Zyklen ist der Wert auf -0,8 mm weiter gesunken.

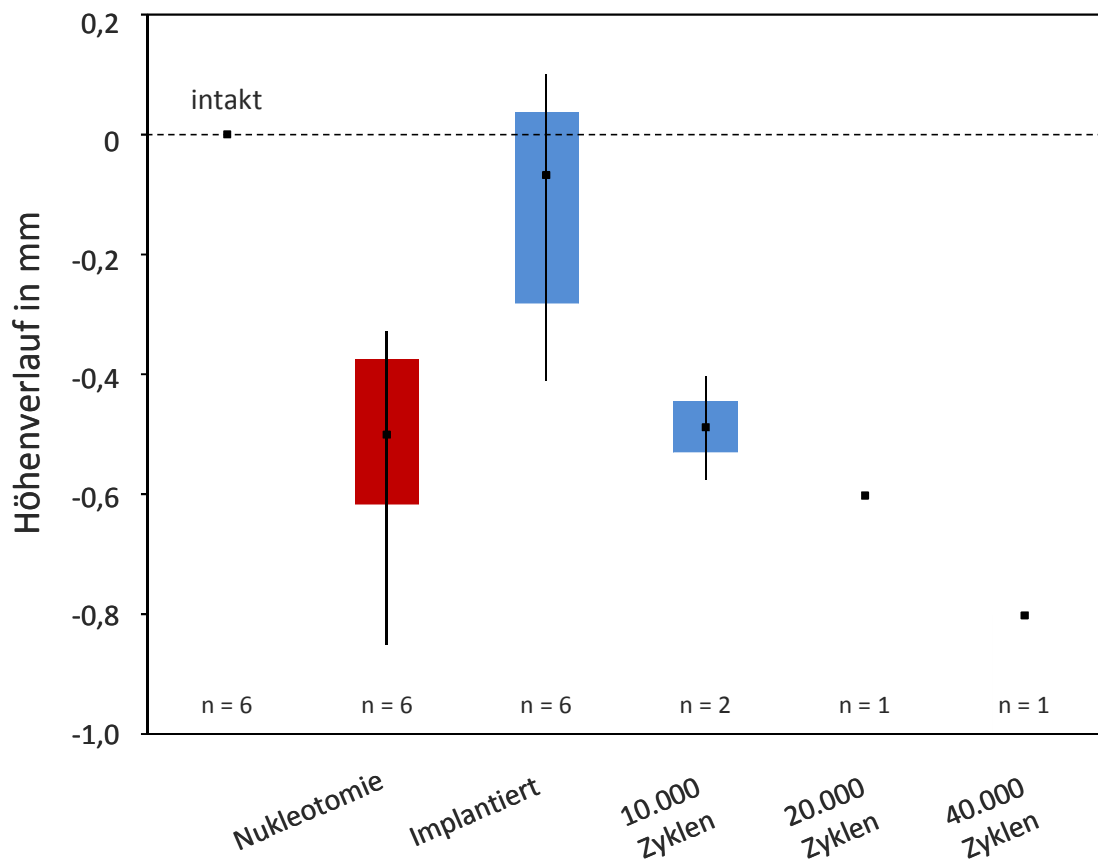


Abbildung 6-36: Boxplot der Höhenmessung in mm (n = 6 Präparate für intakt, nukleotomiert und implantiert)

6.15.2 Flexibilitätssmessung

Verglichen mit dem Intaktzustand der Bewegungssegmente verursacht die Nukleotomie eine Erhöhung des Bewegungsumfanges (*range of motion*, RoM) und somit einen Stabilitätsverlust. Die Implantation des Nukleusersatzmaterials reduziert den Bewegungsumfang, so dass die Messwerte in einem ähnlichen Bereich wie im Intaktzustand liegen. Die Zunahme des RoM nach der Nukleotomie kann also durch die Implantation des Neukleusersatzmaterials reduziert werden und entspricht somit einer Wiederherstellung der Stabilität. Diese Ergebnisse gelten sowohl für den Gesamtbewegungsumfang (Abb. 6-37) als auch für die Bewegungsumfänge nach Untergliederung der Ergebnisse in Flexion/Extension, Seitneigung rechts/links und axiale Rotation rechts/links (Abb. 6-38). Der Messwert zum RoM für Flexion/Extension gesamt beträgt im Intaktzustand 8,70 °, nach der Nukleotomie 10,05 °. Das Segment erleidet somit einen Stabilitätsverlust, welcher durch die Implantation wieder ausgeglichen werden kann. Die zyklische Dauerbelastung führt jedoch nach 10.000 Zyklen zu einer Zunahme des Bewegungsumfanges und damit zu einem erneuten Stabilitätsverlust. So steigt der RoM gesamt nach 10.000 Zyklen von 9,00 ° (implantiert) auf 10,50 °, nach 40.000 Zyklen auf 11,30 °. Analog hierzu erhöht sich im Zuge der Belastung auch der mediane RoM der Seitneigung. Im Mittel beträgt der Messwert des Intaktzustandes 11,50 °. Nach der Nukleotomie steigt der RoM auf 13,00 ° und wird durch die Implantation ähnlich des Intaktzustandes auf 11,35 ° reduziert. Auch hier erfährt das Bewegungssegment einen Stabilitätsgewinn. Nach 10.000 Zyklen erhöht sich die Fähigkeit zur Seitneigung jedoch deutlich auf 14,30 ° und steigt nach 40.000 Zyklen weiter auf 14,70 °. Der RoM der axialen Rotation verändert sich geringfügig. Die Messwerte der intakten Segmente liegen im Mittel bei 5,25 °, steigen nach der Nukleotomie auf 5,50 ° und werden durch die Implantation auf 5,15 ° reduziert. Während der zyklischen Dauerbelastung steigen die Messwerte nach 10.000-40.000 Zyklen jedoch wieder auf durchschnittlich 6,00 ° an. Der Bewegungsumfang der neutralen Zone ist sinkt/steigt stets analog zum RoM.

Insgesamt führt die Implantation zu einer Wiederherstellung der Stabilität in allen Bewegungsrichtungen ähnlich der intakten Ausgangspräparate. Die unmittelbar folgende zyklische Dauerbelastung führt jedoch ab 10.000 Zyklen zur einer Reduktion der Stabilität, die sich mit zunehmender Zyklenzahl verschlechtert.

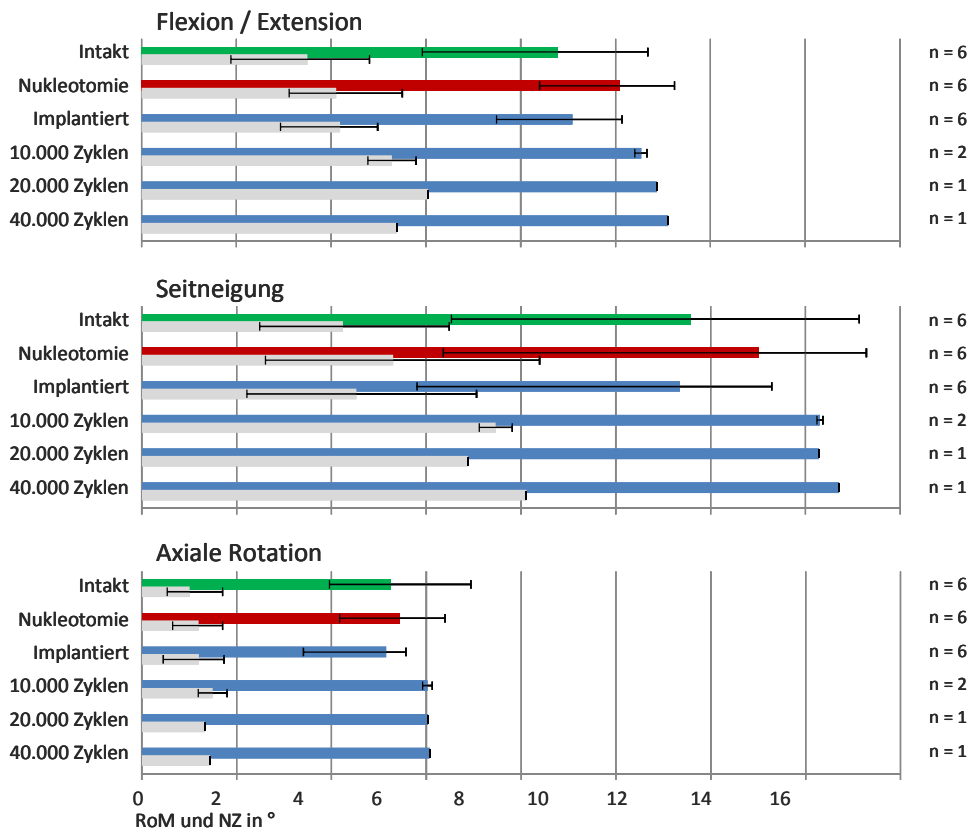


Abbildung 6-37: Gesamtbewegungsumfang (RoM, farbig) und Neutrale Zone gesamt (NZ, grau) der Bewegungssegmente in den unterschiedlichen Präparatzuständen: intakt (grün), nukleotomiert (rot) und implantiert (blau). Die abnehmende Zahl der Präparate ab 10.000 Zyklen ist auf die auftretende Implantatextrusion zurückzuführen.

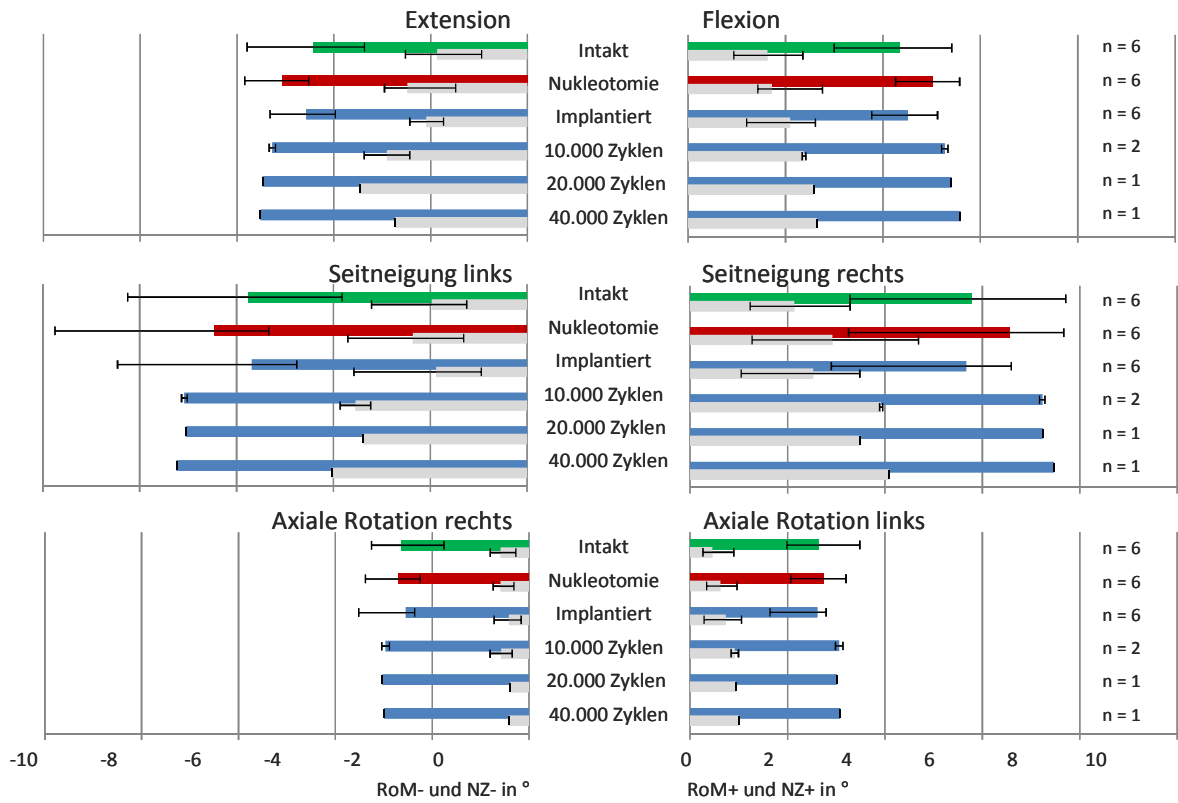


Abbildung 6-38: Bewegungsumfang (RoM) und neutrale Zone (NZ) aufgeteilt in die Bewegungsrichtungen Flexion/Extension, Seitneigung links/rechts und die axiale Rotation rechts/links.

7 Diskussion

Bandscheibenassoziierte Erkrankungen und Beschwerden sind in Deutschland oder vergleichbar industrialisierten Nationen weit verbreitet. Sie gehören zu den häufigsten Beschwerden, auf Grund derer eine vertragsärztliche Behandlung in Anspruch genommen wird (AWMF Leitlinie 074/001). Die derzeitigen operativen Behandlungsstrategien wie die Nukleotomie, die Implantation einer artifiziellen Prothese oder die Fusion von Wirbelkörpern können den ursprünglichen Zustand des Bewegungssegments nicht wieder herstellen. Regenerative Behandlungsverfahren stehen daher im aktuellen Fokus der Wissenschaft. Die vorliegende Arbeit setzt sich mit der Entwicklung zweier regenerativer Implantatmatrices auf der Basis von Kollagen Typ I auseinander. Zur Herstellung der verdichteten Implantatmatrix wird ein Reaktor entwickelt, der alle Kriterien eines CE-Konformitätsbewertungsverfahrens erfüllt. Die zellbiologische Prüfung der Implantatmatrices erfolgt anhand verschiedener *in vitro* Versuche. Zudem werden über ein etabliertes bovines Modellsystem biomechanische Parameter analysiert sowie das operative Handling an einem Humanpräparat getestet.

7.1 Reaktordesign

Die Herausforderungen in der Medizintechnik werden komplexer. Insbesondere der neue Markt für biologische Implantate ist mit hohen technologischen und gesetzlichen Anforderungen nach der Verschärfung des Medizinproduktegesetzes im Jahr 2010 verbunden. Die plastische Verdichtung von Kollagengelen kleiner Volumina für *in vitro* Untersuchungen über mechanischen Druck ist aus der Literatur bekannt und in der Abteilung für Forschung und Entwicklung der Amedrix GmbH etabliert (Levis et al., 2010; Levis et al., 2012, Engelhardt et al., 2010, Mueller-Rath et al., 2010). Die Realisierung der Entwicklung eines Reaktors zur Herstellung eines biologischen Medizinprodukts erfordert jedoch eine Vielzahl bisher vernachlässigter Faktoren. Insbesondere die Eigenschaften und Qualität jeder einzelnen Materialkomponente müssen den Anforderungen innerhalb des notwendigen CE-Konformitätsbewertungsverfahrens zum Inverkehrbringen eines Medizinprodukts der Klasse III genügen. Der hier entwickelte Reak-

tor besteht aus massivem Polytetrafluorethylen (PTFE) in Kombination mit porösen Edelstahleinheiten, die eine schaumähnliche Struktur aufweisen. Der Hochleistungskunststoff PTFE, der als Hauptkomponente zur Herstellung des Reaktors dient, wird über ein spezielles Press- und Sinterverfahren hergestellt. Maßgebliche Eigenschaften von PTFE zur Verwendung als produktberührender Werkstoff zum Bau eines Reaktors, nach den Angaben der Broschüre *Innovation aus Hochleistungs-Kunststoffen für die Medizintechnik* der Firma ElringKlinger Kunststofftechnik GmbH, sind:

- Ein äußerst breiter thermischer Anwendungsbereich von -260 °C bis +260 °C
- Nahezu universelle chemische Beständigkeit/Inertheit
- Licht- und Witterungsbeständigkeit
- Beständigkeit gegen Heißwasserdampf
- Hervorragende Gleiteigenschaften
- hohe Verschleißfestigkeit
- Antiadhäsives Verhalten
- Nicht brennbar
- Hydrophobe Eigenschaften
- Biokompatibilität (Lebensmittelzulassung, FDA-konform)

Nicht nur Eigenschaften wie die mechanische Festigkeit, die Biokompatibilität und die chemische Inertheit machen PTFE zu einem idealen Baustoff dieses Reaktors. Das Polymer zeichnet sich im Vergleich zu vielen anderen Kunststoffen insbesondere durch seine herausragenden Gleiteigenschaften aus. Der niedrige Reibungskoeffizient macht einen so genannten „Stick-Slip-Effekt“ nahezu unmöglich. Eine Verkantung des Stempels und ein damit zusammenhängender Materialabrieb innerhalb des Zylinders werden dadurch praktisch ausgeschlossen, was eine Grundvoraussetzung für den Verdichtungsvorgang der Kollagenmatrix und die Reinheit des Endprodukts darstellt.

Wie aus der Medizintechnik bekannt, ist Edelstahl als Alternative zu Titan ein weit verbreitetes Implantatmaterial. So werden beispielsweise kardiovaskuläre Stents im Fachbereich der Kardiologie oder künstliche Hüftgelenke in der Endoprothetik aus Edelstahl hergestellt und verbleiben lebenslang im Körper. Der poröse Edelstahl, der am Fraunhofer Institut für keramische Technologien und Systeme entwickelt wird, soll zukünftig in der Herstellung verschiedener Implantate zur Behandlung ossärer Defekte eingesetzt werden. Der Reinheitsgrad des dafür verarbeiteten Edelstahls entspricht den An-

forderungen zur Herstellung eines Medizinprodukts in vollem Maße und kann daher ohne Bedenken als Bauteil des Reaktors Verwendung finden. Auch PTFE wird zur Herstellung verschiedener Implantate verwendet. So vertreibt unter anderem die Firma GORE Medical aus PTFE gewobene Netze zum Verschluss von Hernien, Fäden zum Wundverschluss und Stents zur Behandlung von Gefäßverengungen.

Ein weiterer maßgeblicher Parameter, ist der Kostenfaktor der verwendeten Materialien und Bauteile nach deren Fertigung. So besteht generell im Rahmen einer Serienproduktion die Möglichkeit, verschleißarme bzw. wieder verwendbare Materialien einzusetzen oder alternativ verhältnismäßig günstige Einwegprodukte. PTFE ist auf Grund seiner chemischen Inertheit, thermischen Stabilität und hohen Verschleißfestigkeit leicht zu reinigen, wieder verwendbar und resterilisierbar. Der geschäumte Edelstahl hingegen ist wegen der feinporigen Struktur, aus der Rückstände des Kollagens nicht vollständig entfernt werden können und auf Grund der moderaten Kosten pro Quadratmeter, als Einwegprodukt verwendbar. Auf Grund dessen ist der Reaktor auch im Rahmen einer Serienproduktion nicht nur technologisch sondern auch wirtschaftlich kosteneffizient einsetzbar.

Die Partnerschaft mit der Firma ElringKlinger GmbH ermöglicht eine präzise Fertigung der einzelnen Bauteile. Vor allem die Einhaltung kleinster Toleranzmaße von weniger als 0,1 mm von Zylinder und Stempel können zur Vermeidung einer inhomogenen Verdichtung der Implantatmatrix technisch umgesetzt werden. Die Wand- bzw. Materialstärke ist abhängig vom ermittelten Belastungsgewicht zur Verdichtung in jedem Maß konstruiert werden. Wie PTFE ist auch der Edelstahlschaum per Laser präzise zuschneidbar. Der Bau eines größeren Reaktors ist auf Grund des geringen Kostenfaktors und den möglichen Materialbearbeitungsverfahren realisierbar.

Innerhalb dieser Arbeit ist es gelungen, einen Reaktor aus zwei Materialkomponenten zu fertigen. Sowohl das verwendete PTFE als auch der poröse Edelstahl werden bereits heute zur Herstellung diverser Implantate bzw. Medizinprodukte der Klasse III eingesetzt. Der Reaktor zur Herstellung eines Medizinprodukts besteht folglich selbst aus Medizinprodukt-Material. Der Reinheitsgrad und die Verarbeitungsmöglichkeiten sowie die Möglichkeit zur vollständigen Reinigung und Sterilisation entsprechen sowohl den Rohmaterialien, als auch nach deren Verarbeitung allen Anforderungen, die innerhalb eines CE-Konformitätsbewertungsverfahrens relevant sind. Sowohl PTFE als auch

der poröse Edelstahl lassen eine präzise Verarbeitung mit geringen Toleranzmaßen zu. Des Weiteren sind die Materialien und die Fertigung kosteneffizient umsetzbar, so dass eine Serienproduktion aus wirtschaftlicher Sicht ohne weiteres möglich ist. Gleichzeitig gilt zu berücksichtigen, dass eine Serienproduktion in der Regel mit einer teilweisen oder vollständigen Automatisierung der Prozesse einhergeht. In diesem Fall ist eine Änderung manuell ausgeführter Prozesse in Richtung einer elektronischen Steuerung empfehlenswert bzw. notwendig. Beispielsweise könnte die homogene Mischung des Kollagens mit der Gelneutralisationslösung über einen automatischen Mischer ausgeführt werden. Definitionen einzelner Parameter wie Mischzeit, Rührgeschwindigkeit etc. wären gezielt möglich und würden in der Konsequenz zu einer gleich bleibenden Qualität der gemischten Lösung führen. Im Rahmen des Projekts *Automated Tissue Engineering on Demand – Skin from the factory* des Fraunhofer Instituts für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik in Zusammenarbeit mit dem Fraunhofer Institut für Produktionstechnik und Automatisierung wurde bereits ein Roboter zur homogenen Mischung kleiner Volumina viskoser Kollagenlösung mit wässriger Neutralisationslösung zum Einsatz gebracht. Diese Technologie würde sich nach einem Upscaling eventuell auch für größere Volumina eignen (www.tissue-factory.com). Ein weiterer automatisierungsbedürftiger Schritt ist die elektronisch gesteuerte Verdichtung. So findet die Komprimierung im Prototyp des Reaktors über das manuelle Auflegen aufsteigender Gewichte von 3-25 kg über einen Zeitraum von 72 h statt. Auch hierfür entwickelt das Fraunhofer Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik eine automatisierte Alternative. So wird im Rahmen der Bachelorthesis von Rütschle 2012 – *Entwicklung einer vaskularisierten Trägerstruktur für das Tissue Engineering mittels plastischer Kompression eines Hydrogels* – eine motorgesteuerte Verdichtung kleinvolumiger Kollagengele getestet. Die Anlage wurde auch zur Ermittlung der Spannungs-Kompressions-Kurven in Kapitel 5.8 verwendet. An Stelle einer manuellen Gewichtszugabe wird die Kraft über einen Linearmotor übertragen. Dieser ist an einen PC gekoppelt und wird über das Programm LabVIEW gesteuert. Wichtige Prozessparameter wie die Vorschubgeschwindigkeit und die Endposition können programmiert werden. Plastische Stopper, die die Endhöhe der verdichteten Matrix definieren, sind hierbei nicht erforderlich. Diese Technologie wäre nach einem Upscaling ebenfalls zur Verdichtung

größerer Volumina, für den in dieser Arbeit entwickelten Reaktor, geeignet und würde die derzeitige Verdichtungsdauer von 72 h voraussichtlich deutlich reduzieren.

7.2 Implantatdesign und operatives Handling

Reicht die konservative Behandlung eines Bandscheibenvorfalles nicht aus, ist der Gold-Standard die mikrochirurgische Entfernung des Gewebes in Kombination mit einer anschließenden Nukleotomie. Hierbei wird ein Großteil des verbliebenen Nukleusgewebes entfernt, um einem Rezidivvorfall vorzubeugen, der in etwa 5-11 % der Fälle auftritt (Leitlinie DGNC, 2005). Der daraus resultierende Gewebeverlust wird vom Körper nicht kompensiert und kann langfristig zu weiteren degenerativen Veränderungen wie Facettengelenksarthrose, Segmentinstabilität mit einhergehenden Schmerzen führen. Derzeit gibt es keine etablierte Therapie, die einer weiteren degenerativen Veränderung entgegenwirkt und eine Regeneration bewirkt. Auch künstliche Nukleusprothesen aus Metall oder Kunststoff stellen auf Grund schlechter Gewebeintegration oder Delokalisationen keinen adäquaten Ersatz dar. Wie in Abb. 7-1 dargestellt existieren nach Maidhof et al., 2012 derzeit drei biologische Ansätze zur therapeutischen Behandlung degenerativer Bandscheibenerkrankungen und damit assoziierter Schmerzen in Abhängigkeit vom Stadium: 1. Biomolekulare Therapien in einem frühen Krankheitsstadium um die Balance anaboler und kataboler Prozesse zu regulieren, 2. Zellbasierte Therapien in einem mittlerem Stadium zur Verbesserung der Zellqualität, Erhöhung der Zellzahl und Steigerung des Wassergehalts und 3. Tissue Engineering zur Regeneration der geschädigten Strukturen und Wiederherstellung der Biomechanik.

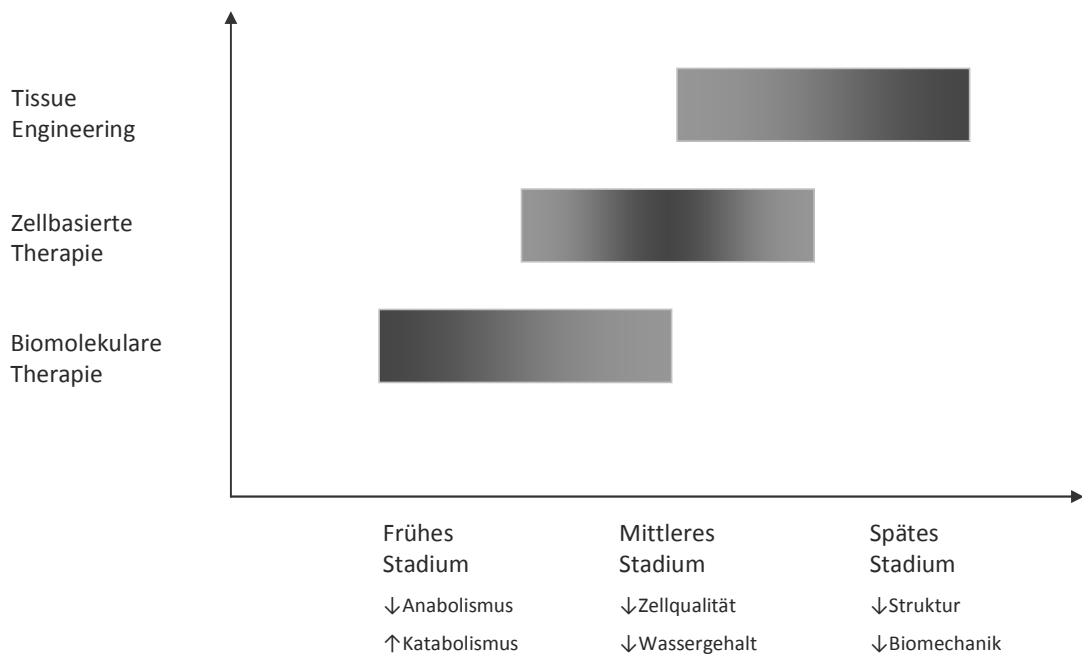


Abbildung 7-1: Drei biologische Therapieansätze zur Behandlung degenerativer Bandscheibenerkrankungen in Abhängigkeit vom Stadium (verändert nach Maidhof et al., 2012).

Das Hauptziel eines idealen biologischen Nukleusimplantats ist die Wiederherstellung der Bandscheibenhöhe zur Vermeidung weiterer degenerativer Veränderungen und der Erhalt der biologischen und biomechanischen Funktionalität des betroffenen Segments. Das Implantat sollte dabei über folgende Eigenschaften verfügen:

- biomechanische Parameter zur Erhaltung der biomechanischen Funktion/Stabilität wie Potential zur Druckabsorption, Ausgleich des Höhenverlustes, Wiederherstellung des nativen Bewegungsumfanges
- Physiologische Parameter wie Quellpotential, Diffusion, Biokompatibilität
- Eignung für Zellbesiedlung-/Proliferation zur Regeneration des Gewebes
- vollständige Integration in das verbliebene Bandscheibengewebe
- Möglichkeit zur kombinierten Implantation mit Zellen, Wachstumsfaktoren oder anderen aktiven Substanzen
- Keine Delokalisations- oder Extrusionsgefahr
- Minimalinvasive/endoskopische Implantationsmöglichkeit

7.2.1 Die verdichtete Kollagenmatrix und die modifizierte ChondroFiller^{liquid} Matrix

Zur Regeneration des Bewegungssegments, das nach einem Bandscheibenvorfall zwangsläufig mit einem deutlichen Gewebeverlust auf Grund der Entfernung des prolabierte Gewebes und gegebenenfalls einer Nukleotomie assoziiert ist, wird eine verdichtete Kollagenmatrix entwickelt. Die Matrix soll den entstandenen Höhenverlust ausgleichen und von körpereigenen Zellen besiedelt werden, um langfristig eine Regeneration des Nukleusgewebes zu erreichen. Um eine endoskopisch applizierbares Implantat zu erhalten, entsteht die Idee zur Herstellung einer dünnen verdichteten Kollagenmatrix, die über eine Führungshülse mit geringem Durchmesser implantiert werden kann. Unmittelbar nach der Implantation soll die Matrix ihre Form und ihr Volumen verändern, um das Risiko einer Extrusion zu reduzieren oder gar zu verhindern. Als Faktor zur Steigerung des Quellpotentials wird das Polysaccharid Hyaluronsäure als Zusatzkomponente eingesetzt.

Zur Herstellung einer verdichteten Kollagenmatrix wird der in Kapitel 6.1 und 6.2 beschriebene Reaktor mit einer Lösung aus Kollagen, Hyaluronsäure und Gelneutralisationslösung (GNL) befüllt. Nach der Gelierung werden der Verdichtungsstempel und die Abdeckhaube aufgelegt. Über die porösen Einheiten wird die Matrix auf Grund der stetigen Belastungssteigerung verdichtet. Entweichende Flüssigkeit wird in die Aufschale abgeleitet. Der Verdichtungsprozess benötigt über dieses manuelle System 72 h. Als Resultat entsteht eine homogene, randlose und stabile Kollagenmatrix mit einer Stärke von ca. 1 mm. Als Verpackungshülse wird ein Innendurchmesser von 2,6 mm angestrebt. Um das Verhältnis von Hülse zu Matrixvolumen optimal nutzen zu können, wird die Stärke durch eine anschließende Gefriertrocknung auf ca. 0,6 mm reduziert. Dies hat begründet durch den kompletten Feuchtigkeitsentzug zur Folge, dass die Matrix starr und spröde wird. Zur Wiedererlangung der Flexibilität erfolgt eine leichte Anfeuchtung in PBS+. Die Matrix kann nun in beliebige Maße zerschnitten werden. Im Rahmen dieser Arbeit wird in der Regel ein Implantatmaß von 1x6 cm hergestellt. Das Implantat wird manuell eingerollt, bis eine kompakte Form entsteht. Über eine Vakuumpumpe wird das Implantat anschließend in der Verpackungshülse platziert. Die Implantation über diese Hülse bietet sich insbesondere für endoskopische Eingriffe an. Im Rahmen der 1. Interkorporellen Fusionstage des Diakonie Klinikum

Stuttgart und der Firma Ulrich Medical wird die verdichtete Matrix transforaminal in die Lendenwirbelsäule eines humanen Präparats implantiert, um die operative Applikation zu testen. Die Präparation erfolgt nicht endoskopisch. Nach der Foraminotomie und der Nukleotomie wird die Hülse bis in den zentralen Bereich des ausgeräumten Nukleus geschoben. Die Implantation der Matrix erfolgt unter der Verwendung des passgenauen Führungsstabes. Die Applikation über die Hülse und den Führungsstab ist laut Beurteilung der anwesenden Wirbelsäulenchirurgen auch bei einem rein endoskopischen Eingriff ohne weiteres machbar. Das Außenmaß der Hülse ist mit 3 mm ausreichend, so dass der Zugang des Foramen intervertebralis und des Bandscheibenfachs problemlos passiert werden kann. Der Zusatz von Röntgenkontrastmittel wie z. B. Isovue-M 200 führt bei Anuluszellen zu einer Senkung der Proliferationsrate und einer erhöhten Apoptose (Gruber et al., 2013). Die Matrix grenzt sich im Röntgen zum nativen Gewebe jedoch leicht ab. Insbesondere die Implantation kann durch den röntgenpositiven Führungsstab und die Hülse kontrolliert werden.

Bei der modifizierten ChondroFiller^{liquid} Matrix handelt es sich um eine Zweikammerspritze, die eine zunächst flüssige Applikation der Implantatmatrix ermöglicht. Die hochviskose Lösung wird über eine Kanüle appliziert. Kleinste Hohlräume können hierdurch aufgefüllt werden. Das hierbei entstehende Hydrogel kann, wie in der Zellkultur gezeigt, als Brücke zwischen nativem Nukleusgewebe und der verdichteten Implantatmatrix fungieren. Auf Grund der deutlich geringeren biomechanischen Festigkeit im Vergleich zur verdichteten Matrix sollte dieses Hydrogel lediglich als Zusatzfüllmaterial verwendet werden. Da sich dieses System auch optional für die Applikation von Zellen eignet, wurde ermittelt, wie lange diese mit verschiedenen unphysiologischen Gelneutralisationslösungen in Kontakt bleiben können, ohne Schaden zu nehmen. Aus den Versuchen kann abgeleitet werden, dass sowohl Stamm- als auch Bandscheibenzellen maximal 5 min in den hyperosmolaren Lösungen inkubiert werden sollten. Eine Verlängerung der Inkubationsdauer führt bereits nach 10 min zu einer Reduktion der Zellzahl durch deren Absterben. Die technische Umsetzung zur Aufnahme einer Zellsuspension und einer darauf folgenden Applikation der zunächst flüssigen Kollagenmatrix durch den Mischadapter ist aber in einem Zeitfenster von unter 5 min sehr gut ausführbar.

7.2.2 In vitro und in vivo Untersuchungen potentieller Nukleusersatzmaterialien

Insgesamt wurden in den vergangenen 15 Jahren verschiedenste Biomatrices häufig in Kombination mit Zellen zur Regeneration von Nukleusgewebe untersucht. Viele Arbeiten fanden jedoch lediglich unter in vitro Bedingungen statt. So existiert eine Vielzahl wissenschaftlicher Arbeiten zu in vitro Untersuchungen, eine deutlich geringere Zahl zu präklinischen Studien am Tier und sehr wenig zu ersten klinischen Studien am Mensch. Es gibt Veröffentlichungen zu injizierbaren Materialien (biologisch und synthetisch), die in vivo entweder flüssig bleiben oder zu festeren Zuständen polymerisieren oder auch Materialien mit festgelegter Form. Zu den synthetischen Materialien gehören unter anderem Polyisopropylacrylamid, welches in Kombination mit Polyethylenglykol im Körper auf Grund der Temperatur zu einer stabilen bioadhäsiven Matrix polymerisiert (Vernengo et al., 2010; Fussell et al., 2010). Bevorzugt werden in der Forschung jedoch Biopolymere aus Chitosan, Kollagen, Alginat, Gelatine, Elastin, Fibrin, Hyaluronsäure oder Seidenprotein, die als Beads, Schwämme, Formkörper, Hydrogel oder primär flüssig appliziert werden (Allen et al., 2004, Heuer et al., 2005, Meakin 2001, Wilke et al., 2004, Sebastine and Williams 2007, Gruber et al., 2006). Diese können singular oder in Kombination Verwendung finden. Der Vorteil dieser natürlichen Substanzen liegt in der hohen Biokompatibilität. Matrices aus Atelokollagen, welches unter anderem auch als Knorpelersatzmaterial etabliert ist, eignen sich hervorragend zur Kultivierung von hMSC. Atelokollagen zeigte in verschiedenen Untersuchungen ideale Bedingungen für deren chondrogene Differenzierung zu bandscheibenähnlichen Zellen, zur Proliferation und Synthese extrazellulärer Matrixproteine wie Kollagen II und Aggrekan. Insbesondere im Kaninchenmodell fanden intensive Untersuchungen zum Regenerationspotential atelokollagener Scaffolds in Kombination mit MSC statt (Sakai et al., 2005; Sakai et al., 2006; Lee et al., 2012). Scaffolds aus einer Kombination von Chitosan und Gelatine verfügen über ideale Bedingungen zur Kultivierung von Bandscheibenzellen isoliert aus Kaninchen (Cheng et al., 2010). Alginat, das aus Braunalgen gewonnen wird, ist ebenfalls eine ideale Matrix zur Kultivierung von Bandscheibenzellen. In vivo wurden bovine Nukleuszellen in eine quervernetzte Alginatmatrix eingebracht und unter der Haut von Nacktmäusen kultiviert. Die Zellen synthetisierten typische extrazelluläre Matrixproteine wie Kollagen Typ II und Proteoglykane und bauten den Scaffold in nukleusähnliches Gewebe um (Chou et al., 2009). Allerdings existiert zudem eine Veröffentli-

chung, deren Ergebnisse darauf hinweisen, dass Alginat langfristig über eine unzureichende Stabilität verfügt, auch wenn diese zuvor über Cross-linking vernetzt wurde (Baer et al., 2001). Matrices aus Hyaluronsäure teilweise in Kombination mit z. B. Kollagen oder Gelatine, die einen natürlichen Bestandteil der extrazellulären Matrix des Nucleusgewebes darstellt, wurden sowohl in vitro als auch in vivo verwendet, um Nucleuszellen zu kultivieren und Nucleuskavitäten zu füllen (Omlor et al., 2012; Malhotra et al., 2012; Collin et al., 2011). Es gibt zudem Hinweise darauf, dass Hyaluronsäure degenerative Prozesse der Bandscheibe bis zu einem gewissen Grad aufhält. So erhielten 20 Primaten nach einer Nucleotomie Injektionen mit hochmolekularer Hyaluronsäure Hylan G-F20. Die behandelten Segmente schnitten in der Follow-Up Phase deutlich besser ab, als die lediglich nukleotomierten Kontrollen, in welchen hierdurch eine fortschreitende Degeneration initiiert wurde (Pfeiffer et al., 2003). Wie aus der Literatur bekannt, können selbst kleine Läsionen des Anulus die Degeneration einer gesunden Bandscheibe auslösen. Die im Jahr 2009 veröffentlichte Studie von Carragee et al. befasste sich mit der Degeneration humaner lumbaler Bandscheiben nach einer Punktion im Rahmen einer Discographie. Alle 50 punktierten Segmente zeigten in der Follow-Up Phase ausgeprägtere Degenerationen im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Publikation wurde von der *The International Society for the Study of the lumbar Spine* ausgezeichnet. So lassen sich mittlerweile Degenerationsmodelle gezielt herstellen. Im Maus-Modell kann eine Degeneration durch die Punktion der Bandscheibe mit einer 26 G Kanüle verursacht werden. Innerhalb von 8 Wochen reduziert sich die Segmenthöhe um 37 %, der Glykosaminoglykgehalt sinkt um 41 % ab und der Kollagengehalt erhöht sich um 45 %. Auch im Ratten-Modell und Kaninchen-Modell löst eine Punktion denselben degenerativen Prozess aus. Issy et al. führten eine 20 G Kanüle für 30 Sekunden in den Nucleus ein. Nach 7 und 30 Tagen wurde der Zustand per MRT und final anhand histologischer Analysen beurteilt. Auch hier degenerierten die behandelten Segmente (Osti et al., 1990; Korecki et al., 2008; Martin et al., 2013; Issy et al., 2013). Xi et al. führte einen ähnlichen Versuch an Rhesusaffen durch. Auch hier verursachten 15 und 20 G Kanülen eine Bandscheibendegeneration. Nicht nur das Segment verlor an Höhe auch die Zellzahl nahm im Verlauf von 8 Wochen deutlich ab (Xi et al., 2013).

Generell sind die Veröffentlichungen in der Fachliteratur bezogen auf Hydrogele als Nucleusersatzmaterial sehr widersprüchlich. Reitmaier et al. zeigte 2012 in einer in

in vitro Studie am Schafsmodell, dass verschiedene Hydrogele allein nicht dazu in der Lage sind, die ursprüngliche Segmenthöhe langfristig wiederherzustellen und aus biomechanischer Sicht kein Nukleusäquivalent darstellen. Chan und Gantenbein-Ritter resümieren in ihrer Veröffentlichung im Jahr 2012, dass alle biologischen Behandlungsmethoden derzeit mehr Fiktion als Realität sind und die mechanischen Eigenschaften von Hydrogelen zu schlecht für einen Nukleusersatz zu sein scheinen. Verschiedene präklinische Studien an Göttinger Minipigs von Omlor führten zu nicht zufrieden stellenden Ergebnissen. In seiner Veröffentlichung von 2009 wird die Implantation einer mit porcinen MSC beladenen Fibringelmatrix bei 6 Göttinger Minipigs beschrieben. Nach einer Standzeit von nur 3 d verbleiben lediglich 10 % der Implantatmatrix im Nukleus. Im Jahr 2012 wurden weitere 12 Tiere nach einer Teil-Nukleotomie mit einer azellulären Biomatrix aus porcinem Kollagen und chemisch modifizierter Hyaluronsäure an mehreren Segmenten operativ versorgt. Die Polymerisierung zum Hydrogel wurde durch eine Bestrahlung mit UV-Licht initiiert. Nach einer Standzeit von 24 Wochen zeigten sich eine verminderte Höhe der Bewegungssegmente sowie entzündliche Prozesse im Anulusgewebe. Im Dezember 2013 referierte Omlor bei der 8. Jahrestagung der Deutschen Wirbelsäulengesellschaft in Frankfurt am Main über die Implantation eines neuartigen Albuminhydrogels in Kombination mit porcinen MSC. Nach einer Teil-Nukleotomie von 10 % durch eine 16 G Biopsiekanüle an 12 Göttinger Minipigs erfolgte die Implantation der zellulären Albuminmatrix. Über die Zugabe von Aluminiumoxid konnte der Implantatverbleib im Micro-CT visualisiert werden. Nach einer Standzeit von 3 d waren lediglich 61 % der Matrix detektierbar. Auf der anderen Seite existieren ebenso wissenschaftliche Veröffentlichungen, die den erfolgreichen Einsatz verschiedener Hydrogele bestätigen. Benz et al., 2012 isolierte Bandscheibenzellen aus Schafen und brachten diese in eine zunächst flüssige Matrix aus Albumin und Hyaluronsäure ein, die der Albuminmatrix von Omlor bis auf den HA-Zusatz entspricht. Diese zelluläre Matrix wurde anschließend in die Nukleuskavität implantiert und polymerisierte in vivo aus. Nach 6 Monaten konnte eine Ausheilung der zuvor geschädigten Bandscheiben beobachtet werden. Die Veröffentlichung von Berlemann und Schwarzenbach aus dem Jahr 2009 beinhaltet die 2 Jahresergebnisse einer monozentrischen klinischen Studie am Mensch nach dem Einsatz des Nukleusersatzmaterials NuCore. NuCore besteht aus Seidenprotein und Elastin. Es härtet in vivo innerhalb von 5 min

aus. 14 Patienten zwischen 18 und 60 Jahren, die unter ausstrahlenden Schmerzen der Lendenwirbelsäule ins Bein litten und einen Prolaps in den Segmenten L1 bis S1 vorwiesen, wurde in die Studie eingeschlossen. Zur Ermittlung des benötigten Implantatvolumens fand eine Gewichtsbestimmung der entfernten Nukleusmasse statt. Anschließend wurde die Kavität mit einer durchschnittlichen Menge von 1,2 ml NuCore gefüllt. Postoperativ wurde die Bewegung der Patienten 6 Wochen lang durch ein Korsett eingeschränkt. Die Follow-Up Untersuchungen im MRT und Röntgen fanden nach 48 Stunden, 6 und 12 Wochen sowie nach 12 und 24 Monaten statt. Das Resultat dieser Pilotstudie ist die erfolgreiche Regeneration humaner lumbaler Bandscheiben nach einer Teil-Nukleotomie durch ein biologisches Hydrogel. Bei allen Patienten traten keinerlei Komplikationen auf. Die NuCore-Matrix dislozierte nicht. Es konnte keine Implantatextrusion beobachtet werden. Auch Rezidivvorfälle fanden in der Follow-Up Phase von 24 Monaten nicht statt. Die Segmenthöhe erreichte zwar nicht die angestrebte Höhe einer völlig gesunden Bandscheibe, aber im Schnitt einen deutlich höheren Wert im Vergleich zu einer Teil-Nukleotomie ohne NuCore Füllung.

7.3 Zellbiologische Parameter

Zur Analyse inwieweit der Hyaluronsäurezusatz und die Sterilisation der Implantatmatrices durch γ -Strahlen die Biokompatibilität beeinflusst, erfolgen verschiedene in vitro Versuche, in denen die Zellproliferation, Viabilität, Genexpression und Synthese von Glykosaminoglykanen untersucht wird.

In Anlehnung an die Norm DIN ISO 10993 erfolgt eine Zytotoxizitätsprüfung an Monolayerkulturen boviner und humaner Bandscheibenzellen. Wie aus der Erfahrung der Abteilung für Forschung und Entwicklung der Amedrix GmbH und den Veröffentlichungen von Di Cicco et al., 2005; Ardjomandi, 2008 und Reich et al., 2013 bekannt, kann insbesondere der Zusatz von Sacchariden zu zytotoxischen Veränderungen in Folge der γ -Bestrahlung führen. Ardjomandi stellte fest, dass bereits eine Konzentration von 22 mM Glukose in einer kollagenen Matrix die Zellproliferation und Viabilität nach der Endsterilisation mit 25 kGy negativ beeinflusst. Im Rahmen dieser Arbeit werden Extrakte der bestrahlten Matrices hergestellt und als Zellkulturmedium verwendet. Die Zellproliferation liegt nach einer Inkubationsdauer von 72 h bei allen Versuchsansätzen

über 80 % im Vergleich zur Positivkontrolle. Ein zytotoxischer Effekt, verursacht durch die γ -Strahlen, kann nicht beobachtet werden. Auch die Lebend-/ Totfärbung mittels FDA und PI unterstützt dieses Ergebnis. Hierbei werden bBSZ, hBSZ und hMSC auf γ -bestrahlten Matrices +/- HA-Zusatz über einen Zeitraum von 7 d kultiviert. Die Fluoreszenzfärbung zeigt eine homogene Besiedlung der verdichteten Implantatmatrix mit einer Konfluenz von 80-95 % nach 7 d. Die Zellen fluoreszieren fast ausschließlich grün, was für eine hohe Vitalität spricht. Lediglich ein geringer Zellanteil der hMSC fluoresziert nach 1 d und 7 d rot und ist somit abgestorben. Auch die Morphologie erscheint nicht dedifferenziert, wobei die Zellen auf den Matrices -HA-Zusatz einen etwas ausgeprägteren chondrozytären Phänotyp aufweisen. Die Ermittlung der Zellzahl und Viabilität über eine 28 d andauernde Kultivierung der drei Zelltypen verdeutlicht langfristig und quantitativ deren konstante Proliferation und hohe Viabilität. Beispielsweise steigert sich die Zellzahl der hBSZ auf der HA-haltigen Matrix von anfänglich 1×10^4 auf $2,52 \times 10^5$. Die Viabilität liegt stets bei über 88 %. Die Zellen proliferieren auf den HA-haltigen Matrices stärker im Vergleich zu den HA-freien. Dieses Ergebnis deckt sich mit der Veröffentlichung von Nesti et al., 2008 dessen Arbeitsgruppe eine gesteigerte Proliferation humaner Stammzellen in einem Scaffold aus Hyaluronsäure beobachtete. Hyaluronsäure beeinflusst z. B. in der Haut, als Hauptbestandteil der extrazellulären Matrix über die Bindung an spezifische Rezeptoren wie CD44 und RHAMM, wesentliche Prozesse der Wundheilung. Die Wirkung erstreckt sich auf alle Phasen der Wundregeneration: Steuerung von inflammatorischen Prozessen, Förderung der Zellmigration und Proliferation, Neoangiogenese sowie Epithelisierung. Ausschlaggebend ist die dreidimensionale Struktur der HA. Sie eignet sich hervorragend zur Zelladhäsion und fördert deren Migration (Chen und Abatangelo 1999; Gall 2010; Prosdociami und Bevilacqua 2012; Solis et al., 2012). HA beeinflusst zudem die Differenzierung von Zellen. Wu et al. zeigt in seiner Veröffentlichung im Jahr 2010, dass HA die Synthese chondrogener Matrixproteine wie Kollagen Typ II und Aggrecan erheblich steigert. Wie bereits erwähnt, sind Stammzellen der bevorzugte Zelltyp zur Regeneration degenerativer Bandscheibenerkrankungen in der aktuellen Forschung. Eine Matrix, die die chondrogene Differenzierung ohne die Zugabe von Wachstumsfaktoren unterstützt, ist somit sehr vorteilhaft, um eine Implantatmatrix mit regenerativem Potential zur Behandlung degenerierter Bandscheibenkerne zu entwickeln. Unabhängig von der Verwendung

von HA konnte die Arbeitsgruppe von Strassburg et al., 2010 zeigen, dass alleinig die Co-Kultivierung von hMSC mit Nucleuszellen die chondrogene Differenzierung *in vitro* initiiert. Die hMSC exprimieren auch hier typische extrazelluläre Matrixproteine und entwickeln im Verlauf der Co-Kultur einen chondrozytären Phänotyp. Bemerkenswert ist hierbei, dass die Anwesenheit der hMSC die Genexpression bei bereits degenerierten Nucleuszellen erheblich stimuliert und somit regenerative Prozesse zu unterstützen scheint.

Die histologischen Untersuchungen mittels Azanfärbung dokumentieren nicht nur die Migration und Proliferation der bBSZ, hBSZ und hMSC in der verdichteten Matrix und der ChondroFiller^{liquid} Matrix, sondern geben auch Aufschluss über die optisch sichtbaren strukturellen Effekte durch die HA-Zugabe. So ist die Struktur der verdichteten Matrix +HA deutlich aufgelockert. Die Implantatmatrix -HA ist im Vergleich dazu um einiges kompakter. Diese lockere Struktur der Matrix +HA ermöglicht vermutlich eine erhöhte Diffusion und damit verbunden eine bessere Versorgung der Zellen mit Nährstoffen bzw. den Abtransport schädlicher Stoffwechselprodukte. Die Randbereiche der Matrices sind auf Grund dessen stets am stärksten mit Zellen besiedelt. Tiefe Schichten werden bei den HA-haltigen Matrices früher von Zellen besiedelt. Auch die höhere Proliferationsrate ist optisch sichtbar. Diese positiven Einflüsse der HA führten dazu, dass in einer Vielzahl der nachfolgenden Versuche ausschließlich Matrices +HA-Zusatz verwendet wurden.

Mitunter ausschlaggebend für den Erfolg einer zunächst zellfreien Implantatmatrix ist deren Besiedlung mit Zellen *in vivo*. Um diesen Prozess *in vitro* zu simulieren, wird ein verdichtetes azelluläres Implantatstück mit zellulärem Hydrogel (entspricht der modifizierten ChondroFiller^{liquid} Matrix) umhüllt und 10 w inkubiert. Die Zellen besiedeln die azelluläre Matrix in den Randregionen bereits nach 1 w. Nach weiteren 9 w befinden sich in die verdichtete Matrix hinein migrierte Zellen, die vereinzelt tiefe Schichten erreicht haben. Auch wenn in der Literatur angegeben wird, dass Gewebe *in vitro* mit einer Schichtstärke > 0,2 mm nur noch schwer durch Diffusion versorgt werden kann (Wallis et al., 2003), erfolgt ein weiterer Migrationsversuch unter der Verwendung kompletter boviner Bandscheiben. Dieser Versuch soll Aufschluss darüber geben, ob die ChondroFiller^{liquid} Matrix als Konektiv zwischen Nativgewebe und verdichteter Implantatmatrix fungieren kann. Frisch isolierte bovine Bandscheiben werden hierzu ei-

ner Teil-Nukleotomie unterzogen. In die so entstandene Nukleuskavität wird die azelluläre verdichtete Matrix implantiert und mit der zunächst flüssigen und ebenfalls zellfreien ChondroFiller^{liquid} Matrix lückenlos umhüllt. Die Kultivierung erfolgt über einen Zeitraum von 13 w. In regelmäßigen Abständen wird die Zellmigration durch histologische Auswertungen dokumentiert. Trotz der denkbar schlechten Versorgungsverhältnisse auf Grund der Gewebestärke von weit über 1,5 cm und der langen rein statischen Kultivierung findet eine Besiedlung beider Matrices statt. Der Idee entsprechend wird in den ersten 10 w vorwiegend die ChondroFiller^{liquid} Matrix von Nukleuszellen des Nativgewebes besiedelt. Innerhalb von 10 bis 13 Wochen kommt es zu einer starken Proliferation und parallel zu einer Migration in die verdichtete Implantatmatrix. Am Ende der Kultivierung ist in beiden Matrices eine Vielzahl homogen verteilter Zellen detektierbar, die in ihrer Dichte und Verteilung der des nativen Nukleusgewebes weitgehend entsprechen. Morphologisch betrachtet haben insbesondere die Zellen in der verdichteten Matrix ein chondrozytäres Erscheinungsbild, so dass hier keine optisch sichtbaren Hinweise für eine Dedifferenzierung erkennbar sind.

Zur Genexpressionsanalyse wurde eine qualitative PCR durchgeführt, die eine Momentaufnahme der Expression von Aggrekan, Kollagen Typ I, Kollagen Typ II und MMP-2 darstellt. Die hier gewonnenen Resultate deuten ebenfalls nicht auf eine Dedifferenzierung der Zellen hin, unabhängig davon ob bBSZ, hBSZ oder hMSC in der verdichteten Matrix oder der ChondroFiller^{liquid} Matrix kultiviert werden. Es erfolgt zu allen Analysezeitpunkten eine durchgängige Expression der hier untersuchten extrazellulären Matrixproteine. Die Kollagen Typ II Expression der hMSC setzt ab einer Kultivierung von 14 d ein und dient als Indiz für eine erfolgreiche Differenzierung in Folge der Verwendung des chondrogenen Differenzierungsmediums. Lediglich in der verdichteten Matrix ist die Kollagen Typ II Expression der hBSZ ab einer Kultivierungsdauer von > 14 d keine spezifische Bande zu erkennen. Dies deutet auf eine Dedifferenzierung hin, auch wenn die histologischen Analysen makroskopisch keine Dedifferenzierung anhand der morphologischen Erscheinung erkennen lassen. Wie aus der Literatur bekannt, kann die Kultivierung von Zellen im Monolayer, die in der Regel eine unnatürliche Umgebung ohne Struktur darstellt, den Zellmetabolismus verändern und eine Dedifferenzierung initiieren. Wie in verschiedenen Arbeiten gezeigt, stellen Nukleuszellen die Kollagen Typ II, Kollagen Typ X und Aggrekan Synthese ohne eine 3-dimensionale Kultivierung

ein (Kluba et al., 2005; Preradovic et al., 2005; Ning et al., 2013). Darüber hinaus müssen viele Zelltypen gewebetypische Reize erfahren, um ihr charakteristisches Genexpressionsprofil beizubehalten. Wie auch Knorpelgewebe nimmt der Nukleus der Bandscheibe zyklische axiale Druckbelastungen auf (Würtz et al., 2007). Dieser mechanische Reiz fehlt in der hier vollzogenen statischen Kultivierung völlig und wäre nur über einen geeigneten Bioreaktor zuführbar. Die Arbeitsgruppe von Neidlinger-Wilke et al., 2006 zeigt an bBSZ und hBSZ, dass die Genexpression anaboler Matrixfaktoren bei einer geringen Druckamplitude zunimmt und hydrostatischer Druck zu einer erhöhten Expression kataboler Matrixfaktoren führt. Zu berücksichtigen ist außerdem, dass in einer Bandscheibe unter in vivo Bedingungen ein niedriger Sauerstoffgehalt herrscht. Ein hypoxisches Milieu, das der in vivo Situation entspricht, konnte im hier verwendeten Inkubator nicht simuliert werden. Feng et al., 2013 kultivierte degenerierte Nukleuszellen in einem 3-dimensionalen Scaffold unter hypoxischen Bedingungen und stimulierte dadurch die sulfatierte Glykosaminoglykan- und Kollagen Typ II Synthese. Neidlinger-Wilke et al., 2012 konnte hingegen unter hypoxischen Kultivierungsbedingungen nur eine geringe Beeinflussung des Zellmetabolismus erzielen. Dagegen gelang es im Rahmen der Dissertation von Rinkler im Jahr 2009, ausgeprägte Veränderungen durch die Variation des pH-Wertes und der Glukosekonzentration hervorzurufen, die auch durch degenerative Prozesse erniedrigt sind. Eine Erniedrigung des pH-Werts auf 6,5 führt bei bBSZ, kultiviert in Alginatebeads, zu einer Herunterregulation anaboler Matrixgene. Katabole Matrixgene wie MMP-2 blieben davon unbeeinflusst. Auch die Herkunft der Zellen für die hier getätigten Versuche darf nicht außer Acht gelassen werden. So stammen die bBSZ von jungen gesunden Rindern und die hBSZ von bereits degenerativ veränderten Bandscheiben, bei denen der Degenerationsgrad unbekannt ist. Dies könnte auch erklären, weshalb 2 von 3 Spenderzellen der hBSZ, unabhängig von der stets gegebenen Spendervarianz, nur sehr wenig sulfatierte Glykosaminoglykane (sGAG) im Verlauf der in vitro Kultivierung in der ChondroFiller^{liquid} Matrix synthetisieren. Nach Kitano et al., 1993 setzen sich die sGAG einer gesunden Bandscheibe zu 72.3 % aus Chondroitinsulfat und zu 18.1 % aus Keratansulfat zusammen. Der Blyscan Assay zeigt quantitativ durch den Anstieg des sGAG-Gehalts, dass während der Kultivierung, wie in vivo gewünscht, eine sGAG-Synthese und somit ein Umbau der Matrix erfolgt.

7.4 Biomechanische Parameter

Biomechanische Testungen an Kalbswirbelsäulenpräparaten gelten als etablierte Alternative zu Testungen an humanen Wirbelsäulen und sind international anerkannt (Cotterill et al., 1986; Wilke et al., 1998). Über die in dieser Arbeit vorgenommenen Testungen können Rückschlüsse über biomechanische Parameter wie dem Bewegungsumfang (RoM) oder der Höhenänderung im intakten, nukleotomierten und implantierten Bewegungssegment gezogen werden. Aus den gewonnenen Ergebnissen lassen sich etwaige Problematiken erkennen, die in einer präklinischen Studie am Tiermodell auftreten könnten. Da sich das hier verwendete Modellsystem für die Testung von Hydrogelen als ungeeignet herausgestellt hat, wird ausschließlich die verdichtete Implantatmatrix verwendet. Diese verdichtete Matrix, bestehend aus Kollagen und Hyaluronsäure, soll auf dieselbe Art und Weise wie das Knorpelimplantat ChondroFiller der Firma Amedrix GmbH zellfrei implantiert, von autologen Zellen besiedelt und final durch körpereigene extrazelluläre Matrix ersetzt werden. Bei diesem etablierten Verfahren zur Therapie von Gelenkknorpelschäden findet das Tissue Engineering in vivo statt. Die in dieser Arbeit vorgenommenen in vitro Versuche haben ergeben, dass die verdichtete Kollagenmatrix sowohl von Nukleuszellen als auch von Stammzellen hervorragend besiedelt und die charakteristische Genexpression beibehalten wird. Die rheologischen Messungen sowie die Versuche zum Quellpotential und die Spannungs-Kompressionsmessungen zeigen, dass die Zugabe von langkettiger Hyaluronsäure keine negativen Auswirkungen auf die viskoelastischen Eigenschaften der Matrices ausüben, sondern die Fähigkeit zur Aufnahme von Flüssigkeit erheblich steigert bzw. die mechanische Stabilität verbessert. Die am Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik durchgeführten Spannungs-Kompressions-Messungen ergeben, dass eine doppelte Schubspannung von 5.881 Pa aufgewendet werden muss, um die HA-haltige Matrix im Vergleich zur HA-freien um 50 % zu deformieren. Die Analysen zum Quellpotential der Matrix mit 29 mg/ml HA resultieren in einer Steigerung um den Faktor 4,3 im Vergleich zur HA-freien verdichteten Matrix. Auch wenn die eingebrachte Hyaluronsäure unter in vitro Bedingungen innerhalb von 11 Tagen verloren geht, kann sich dieser Prozess in vivo anders darstellen. So stellt der Nukleus ein beinahe geschlossenes System im Vergleich zu einer Zellkultur dar, indem lediglich durch Diffusion ein Austausch von Nähr- und Abfallstoffen stattfindet. Zudem existieren stabilisierte Hyalu-

ronsäuren wie DUROLANE, deren generelle Verweildauer im Vergleich zur hier verwendeten Substanz mit über 6 Monaten angegeben wird (Smith & Nephew; Larsen et al., 2007). Grundsätzlich ist die zukünftige Verwendung bzw. die Kooperation mit einem Hersteller einer solchen stabilisierten Hyaluronsäure zur Matrixherstellung zu empfehlen.

Die hier entwickelte verdichtete Matrix weist ähnliche Eigenschaften vergleichbar mit nativem Nukleusgewebe auf, so dass sie alle Grundvoraussetzungen für einen Nukleusersatz erfüllt wie z. B. die hohe Stabilität und Elastizität, die Fähigkeit zur Aufnahme von Flüssigkeit und deren Abgabe unter Druckbelastung sowie die Möglichkeit zur endoskopischen Implantation.

7.4.1 Biomechanische Testung am bovinen Modellsystem

Die Nukleotomie an den bovinen Präparaten erfolgt durch eine standardisierte Inzision des Anulus. Die Menge der entnommenen Gewebemasse wird über eine Waage erfasst, so dass dieselbe Masse an Implantatmatrix appliziert werden kann. Jede Inzision des Anulus führt zwangsläufig zu einer Abnahme der Stabilität bzw. der Segmentsteifigkeit (Natarajan et al., 2002). In Folge der Nukleotomie nimmt diese Abnahme noch weiter zu, was bei allen verwendeten Präparaten zutrifft. Die Flexibilitätsmessungen im Wirbelsäulensimulator zeigen eine starke Zunahme in alle Bewegungsrichtungen (Flexion/Extension, Seitneigung rechts/links und axiale Rotation links/rechts). Nach der Implantation wird nicht nur der entstandene Höhenverlust beinahe vollständig ausgeglichen sondern auch der RoM in Richtung Intaktzustand deutlich reduziert. Es kann also festgehalten werden, dass die verdichtete Implantatmatrix in Ruhe den Höhenverlust des bovinen Bewegungssegments ausgleichen kann sowie dieses stabilisiert. In Folge der zyklischen Dauerbelastung treten allerdings Extrusionen auf. 2 von 6 Implantaten extrudieren bereits nach weniger als 10.000 Zyklen. 2 Matrices halten einer Zyklenzahl von 10.000 stand, 1 Matrix 20.000 und 1 Matrix 40.000 Zyklen. Die Extrusion erfolgt stets über die Anulusinzision. Wilke et al. veröffentlichte 2006 ähnliche Testergebnisse einer kollagenen Matrix namens NuRes. Die Matrix konnte der zyklischen Belastung der Materialprüfmaschine ebenfalls nicht standhalten. Der darauf folgende Tierversuch von Bron et al., 2010 fand daher unter Verwendung eines neuartigen Anulusverschlußsystems im Ziegenmodell statt. NuRes konnte den Höhenverlust in

vivo nach vorangegangener Nukleotomie ausgleichen. Nach einer Standzeit von 6 Wochen zeigten sich im MRT jedoch Schäden an den knöchernen Endplatten sowie Dislokationen und Verformungen des Verschlußsystems. Eine Extrusion von NuRes wurde jedoch nicht beobachtet. Histologische Untersuchungen des Nukleusersatzmaterials fanden nicht statt. Somit ist unklar, inwieweit das Implantat mit dem nativen Gewebe durch Zellbesiedlung und Matrixumbau integriert wurde und damit eine feste Verbindung entstand, die trotz der biomechanischen Lasten der agilen Ziegen hielt.

Das bovine Prüfpräparat ist in Abb. 7-2 dargestellt. Trotz der regelmäßigen Befeuchtung dehydriert es im Laufe der Testung zunehmend. Negativ zu beurteilen ist, dass das mehrere Stunden dauernde Testprotokoll nicht unter physiologischen Bedingungen statt findet bzw. statt finden kann. Die Verwendung eines Wasserbads mit Natriumchloridlösung verursachte in früheren Versuchen eine zu starke Quellung des hydrophilen Bandscheibengewebes, was zu unnatürlichen biomechanischen Messdaten führte. Auch die Tatsache, dass das tote Gewebe des Präparats zu keinerlei Regeneration der Anulusinzision oder des Nukleus in der Lage ist, wirkt sich sicherlich negativ auf die hier erhaltenen Ergebnisse aus bzw. begründet die frühen Extrusionen.

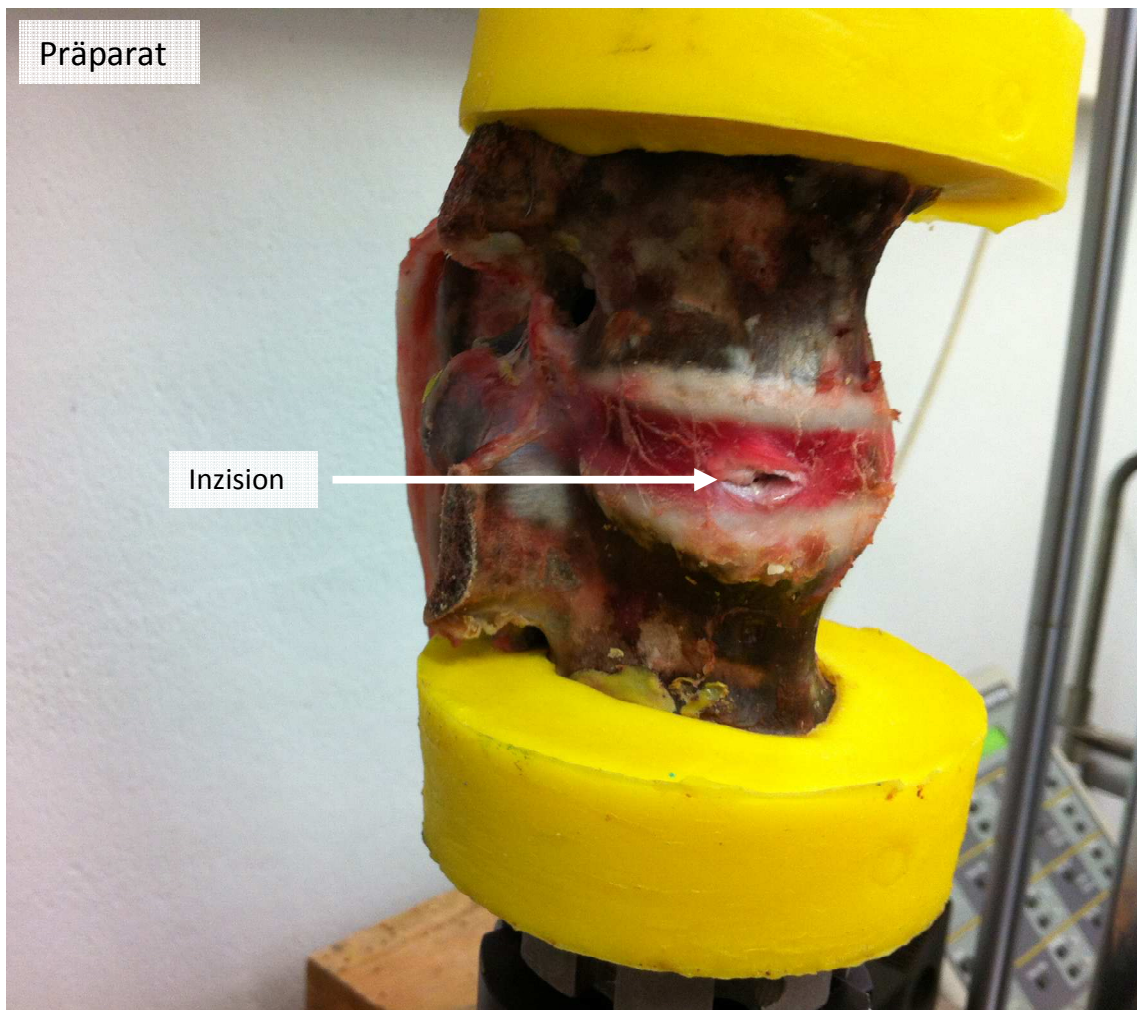


Abbildung 7-2: Bovines Biomechanikmodell. Austrocknendes Präparat der Lendenwirbelsäule mit Anulusinzision während der zyklischen Dauerbelastung in der Materialprüfmaschine

Die zyklische Dauerbelastung findet unmittelbar nach der Implantation statt. Unter in vivo Bedingungen würde der Patient erst nach einigen Wochen oder Monaten die volle Beweglichkeit wieder erlangen und bis dahin die Rumpfregeion schonen. Zudem sollte sich unter in vivo Bedingungen die Integration des Implantats im Laufe der Zeit erhöhen, da die Matrix von körpereigenen Zellen umgebaut wird und quasi einwächst. Wie bereits aufgeführt, zeigt die Pilotstudie von Berlemann und Schwarzenbach 2009 die erfolgreiche Implantation und Regeneration humaner lumabler Bandscheiben durch das Hydrogel NuCore. Die zunehmende Integration ist typisch für biologische Implantatmatrices. So kann z. B. in der Arbeit von Schneider et al., 2011, Gavenis 2012 und 2013 gezeigt werden, dass das zellfreie ChondroFiller Knorpelimplantat von autologen Chondrozyten besiedelt und fest im Defekt integriert wird. Hydrogele wie die modifizierte ChondroFiller^{liquid} Matrix eignen sich nicht für eine Testung im bovinen Biome-

chanikmodell, da jede bisher getestete Implantatmasse über die Anulusinzision während der Belastung extrudiert (persönliche Mitteilung von Reitmaier). Das Modell liefert somit ab dem Zeitpunkt der zyklischen Dauerbelastung vermutlich negativere Ergebnisse als unter in vivo Bedingungen, eignet sich aber stattdessen ideal zur Testung artifizieller Prothesen. Grundsätzlich sind Implantatmigrationen und Extrusionen unerwünscht, da sie in der Regel einen erneuten operativen Eingriff erforderlich machen. Ein zukünftiger Tierversuch sollte daher an einer Tiergruppe in Kombination mit einem geeigneten Anulusverschlußsystem wie der Barricaid-Prothese (Abb. 7.3), die seit 2009 in Europa zugelassen ist und sich derzeit im klinischen Einsatz etabliert, vorgenommen werden. Der Titananker des Anulus-Teilersatzes wird im knöchernen Teil des Wirbelkörpers fixiert. Ein festes Netzgewebe aus nicht-resorbierbaren Polymerfasern verschließt dabei größere Anulusdefekte, um einem Rezidivvorfall vorzubeugen bzw. den Austritt von Masse zu verhindern. In der Theorie sollte die verdichtete Kollagenmatrix ggf. in Kombination mit der modifizierten ChondroFiller^{liquid} Matrix die Barricaid-Prothese hervorragend ergänzen (Parker et al., 2013; Wilke et al., 2013). So könnte nicht nur ein Rezidivvorfall verhindert werden, sondern auch der entstandene Höhenverlust ausgeglichen werden. Spätfolgen wie eine Facettengelenksarthrose könnten so weiter reduziert werden.



Abbildung 7-3: Barricaid-Prothese (Intrinsic Therapeutics) bestehend aus einem Polymernetz, welches den Anulusdefekt verschließt und einem Titananker, der im Wirbelkörper fixiert wird (www.in-thera.de).

8 Ausblick

Degenerative Bandscheibenerkrankungen sind weit verbreitet. Sie verursachen nicht nur chronische Schmerzen, sondern führen parallel zu Arbeitsausfällen und damit verbunden zu hohen Kosten für Arbeitgeber und Gesundheitswesen. Begründet durch die zunehmende Durchschnittslebenserwartung in Kombination mit einer durch den medizinischen Fortschritt gestiegene Lebensqualität besteht ein großer Bedarf aller Altersklassen, langfristig mobil und aktiv zu bleiben. Regenerative Therapien, die vor allem die Beweglichkeit des betroffenen Segments erhalten, zu Schmerzfreiheit führen und benachbarte Anschlussdegenerationen verlangsamen oder gar völlig verhindern, sind daher als idealer Therapieansatz zu bewerten. Eine optimale regenerative Therapie zur Behandlung degenerativer Bandscheibenerkrankungen ist bisher jedoch nicht etabliert. Vielmehr befinden sich regenerative Verfahren/Matrices in der präklinischen oder klinischen Erprobungsphase. Insbesondere zellbasierte Verfahren, bei denen Stammzellen zu einer erfolgreichen Regeneration des Gewebes beitragen sollen, stehen jedoch vor enormen regulativen Herausforderungen im Rahmen des Zulassungsprozesses oder bei der Durchführung klinischer Studien, seit diese den strengen Regularien der *Advanced Therapy Medicinal Products (ATMPs)* unterworfen wurden. Ein azelluläres Implantat, welches durch die Besiedlung körpereigener Zellen und deren extrazellulärer Matrixsynthese das Gewebe neu aufbaut, ist durch dessen Klassifizierung als Medizinprodukt der Klasse III gegenüber jenen als vorteilhaft anzusehen. Die enormen biomechanischen Kräfte, denen die Bandscheiben ausgesetzt sind, stellen jedoch eine nur schwer zu überwindende Herausforderung für das biologische Implantatdesign dar. Ob die im Rahmen dieser Arbeit entwickelten und geprüften Matrices – die verdichtete Kollagen Typ I Matrix mit Hyaluronsäure sowie die Hydrogelmatrix ChondroFiller^{liquid} – diesen Belastungen ohne die Verwendung eines Anulusverschlußsystems unter in vivo Bedingungen standhalten, kann nur über entsprechende Folgestudien am Tier und darauffolgend in einer klinischen Studie am Mensch final evaluiert werden. Auch inwiefern die Regenerationszeit durch die Zugabe von z. B. Stammzellen positiv beeinflusst werden kann, ist nur über in vivo Studien ermittelbar. Die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse und die aktuelle Fachliteratur zeigen, dass biologische Verfahren/Matrices durchaus über das Potential verfügen, um degeneriertes Bandscheibengewebe zu regenerieren. Zukünftige Untersuchungen sollten jedoch nicht nur auf die Regeneration des Nukleusgewebes fokussieren, sondern auch auf Strategien zur Schließung von Läsionen des Anulus fibrosus. Die Komplexität der Band-

scheibe wird forschende Mediziner, Ingenieure, Biotechnologen und andere Wissenschaftler sicher noch einige Jahre herausfordern, während die Nachfrage nach biologischen Regenerationsverfahren durch den demographischen Wandel weiter zunimmt (Samantha und Gantenbein-Ritter, 2012).

Literaturverzeichnis

Allen MJ, Schoonmaker JE, Bauer TW, Williams PF, Higham PA, Yuan HA: Preclinical evaluation of a poly(vinyl alcohol)hydrogel implant as a replacement for the nucleus pulposus. *Spine* 29: 515-523 (2004)

Ardjomandi N, Einfluss der Gamma-Bestrahlung in Kombination mit Glucose auf die Stabilität und Zellvitalität eines Liagamentersatzes, aus einer mit Fibroblasten besiedelten Kollagen-Typ-I Trägermatrix, Diplomarbeit Universität Hohenheim, März 2008

AWMF Leitlinie 074/001 Sozialmedizinische Beurteilung der Leistungsfähigkeit bei Bandscheiben- und bandscheibenassoziierten Erkrankungen, Stand 09/2009

Baer AE, Wang JY, Kraus VB, Setton LA. Collagen gene expression and mechanical properties of intervertebral disc cell-alginate cultures. *J Orthop Res.* 2001 Jan;19(1):2-10.

Battié MC, Videman T, Kaprio J, Gibbons LE, Gill K, Manninen H, Saarela J, Peltonen L. The Twin Spine Study: contributions to a changing view of disc degeneration. *Spine J.* 2009 Jan-Feb; 9(1): 47-59.

Benz K, Stippich C, Fischer L, Möhl K, Weber K, Lang J, Steffen F, Beintner B, Gaissmaier C, Mollenhauer JA. Intervertebral disc cell- and hydrogel-supported and spontaneous intervertebraldisc repair in nucleotomized sheep. *Eur Spine J.* 2012 Sep;21(9):1758-68. Epub 2012 Jul 29.

Berlemann U, Schwarzenbach O. *Eur Spine J.* An injectable nucleus replacement as an adjunct to microdiscectomy: 2 year follow-up in a pilot clinical study. 2009 Nov;18(11):1706-12. doi: 10.1007/s00586-009-1136-0. Epub 2009 Aug 18.

Börm W, Meyer F, *Spinale Neurochirurgie* (2009), Schattauer Verlag; S. 3-440

Bron JL, van der Veen AJ, Helder MN, van Royen BJ, Smit TH; Skeletal Tissue Engineering Group Amsterdam; Research Institute MOVE. *Eur Spine J.* Biomechanical and in

vivo evaluation of experimental closure devices of the annulus fibrosus designed for a goat nucleus replacement model. 2010 Aug;19(8):1347-55. doi: 10.1007/s00586-010-1384-z. Epub 2010 Apr 17.

Carragee EJ, Don AS, Hurwitz EL, Cuellar JM, Carrino JA, Herzog R. Does discography cause accelerated progression of degeneration changes in the lumbar disc: a ten-year matched cohort study. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2009 Oct 1;34(21):2338-45. doi: 10.1097/BRS.0b013e3181ab5432.

Chen WY, Abatangelo G. Functions of hyaluronan in wound repair. *Wound Repair Regen*. 1999 Mar-Apr;7(2):79-89.

Cheng YH, Yang SH, Su WY, Chen YC, Yang KC, Cheng WT, Wu SC, Lin FH. Thermosensitive chitosan-gelatin-glycerol phosphate hydrogels as a cell carrier for nucleus pulposus regeneration: an in vitro study. *Tissue Eng Part A*. 2010 Feb;16(2):695-703. doi: 10.1089/ten.TEA.2009.0229.

Chou AI, Akintoye SO, Nicoll SB. Osteoarthritis Cartilage. Photo-crosslinked alginate hydrogels support enhanced matrix accumulation by nucleus pulposus cells in vivo. 2009 Oct;17(10):1377-84. doi: 10.1016/j.joca.2009.04.012. Epub 2009 May 4.

Collin EC, Grad S, Zeugolis DI, Vinatier CS, Clouet JR, Guicheux JJ, Weiss P, Alini M, Pandit AS. *Biomaterials*. An injectable vehicle for nucleus pulposus cell-based therapy 2011 Apr;32(11):2862-70. doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.01.018. Epub 2011 Jan 28.

Cotterill PC, Kostuik JP, D'Angelo G, Fernie GR, Maki BE: An anatomical comparison of the human and bovine thoracolumbar spine. *J Orthop Res* 4: 298-303 (1986)

DiCicco M, Compton R, Duong T, Jansen-Varnum SA. Electron paramagnetic resonance analyses of surface radical chemistries of gamma-sterilized orthopedic materials: implications pointing to cytotoxicity via wear debris-induced inflammation. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2005 Oct;75(1):6-17.

ElringKlinger Kunststofftechnik GmbH, Etzelstr. 10, 74321 Bietigheim-Bissingen
www.elringklinger-kunststoff.de – Broschüre: Innovation aus Hochleistungs-
Kunststoffen für die Medizintechnik (2012)

Feng G, Li L, Liu H, Song Y, Huang F, Tu C, Shen B, Gong Q, Li T, Liu L, Zeng J, Kong Q, Yi M, Gupte M, Ma PX, Pei F. Hypoxia differentially regulates human nucleus pulposus and annulus fibrosus cell extracellular matrix production in 3D scaffolds. *Osteoarthritis Cartilage*. 2013 Apr;21(4):582-8. doi: 10.1016/j.joca.2013.01.001. Epub 2013 Jan 8.

Fernstrom U: Arthroplasty with intercorporal endoprosthesis in herniated disc and in painful disc. *Acta Chir Scand Suppl* 357: 154-159 (1966)

Fraunhofer Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik. Projekt Tissue Engineering on Demand – Skin from the factory. www.tissue-factory.com

Friess W, Collagen – biomaterial for drug delivery. *Eur J Pharm Biopharm*. 1998 Mar;45(2):113-36.

Gall Y. Hyaluronic acid: structure, metabolism and implication in cicatrisation. *Ann Dermatol Venereol*. 2010 Apr;137 Suppl 1:S30-9. doi: 10.1016/S0151-9638(10)70007-7

Gavenis K, Heussen N, Hofman M, Andereya S, Schneider U, Schmidt-Rohlfing B. Cell-free repair of small cartilage defects in the Goettinger minipig: The effects of BMP-7 continuously released by poly(lactic-co-glycolid acid) microspheres. *J Biomater Appl*. 2013 Jun 13.

Gavenis K, Schneider U, Maus U, Mumme T, Muller-Rath R, Schmidt-Rohlfing B, Andereya S. Cell-free repair of small cartilage defects in the Goettinger minipig: which defect size is possible? *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. 2012 Nov;20(11):2307-14. doi: 10.1007/s00167-011-1847-8. Epub 2011 Dec 28.

Ghiselli G, Wang JC, Bhatia NN, Hsu WK, Dawson EG. Adjacent segment degeneration in the lumbar spine. *J Bone Joint Surg Am*. 2004 Jul; 86-A (7): 1497-503.

Gotfried Y., D.S. Bradford DS, Oegema TR: Facet Joint Changes after Chemonucleolysis-induced disc space narrowing. *Spine*11: 944-950 (1986)

Gruber HE, Hanley EN, Jr. Human disc cells in monolayer vs 3D culture: cell shape, division and matrix formation. *BMC Musculoskelet Disord*. 2000 Oct 23; 1:1. Epub 2000 Oct 23

Gruber HE, Ingram JA, Leslie K, Norton HJ, Hanley EN, Jr. Cell shape and gene expression in human intervertebral disc cells: in vitro tissue engineering studies. *Biotech Histochem*. 2003 Apr; 78(2): 109-17.

Gruber HE, Rhyne AL 3rd, Hansen KJ, Phillips RC, Hoelscher GL, Ingram JA, Norton HJ, Hanley EN Jr. Deleterious effects of discography radiocontrast solution on human annulus cell in vitro: changes in cell viability, proliferation, and apoptosis in exposed cells. *Spine J*. 2012 Apr;12(4):329-35. doi: 10.1016/j.spinee.2012.02.003. Epub 2012 Mar 16.

Gruber Helen E., Gretchen L. Hoelscher, Kelly Leslie, Jane A. Ingram, Edward N. Hanley Jr. Three-dimensional culture of human disc cells within agarose or a collagen sponge: assessment of proteoglycan production. *Biomaterials*. 2006 Jan; 27(3): 371-6. Epub 2005 Aug 11.

Hannouche D, Terai H, Fuchs JR, Terada S, Zand S, Nasser BA, Petite H, Sedel L, Vacanti JP. Engineering of Implantable Cartilaginous Structures from Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Tissue Eng*. 2007 Jan; 13(1): 87-99.

Issy AC, Castania V, Castania M, Salmon CE, Nogueira-Barbosa MH, Bel ED, Defino HL. Experimental model of intervertebral disc degeneration by needle puncture in Wistar rats. *Braz J Med Biol Res*. 2013 Mar 15;46(3):235-44. Epub 2013 Mar 15.

James J. Yue, Rudolf Bertagnoli, Paul C. McAfee and Howard S. An Motion Preservation Surgery of the Spine p. 760-3 (2008)

Johnson W. E., Andrew Wootton, Alicia El Haj, Stephen M. Eisenstein, Adam S. Curtis, Sally Roberts. Topographical guidance of intervertebral disc cell growth in vitro: towards the development of tissue repair strategies for the annulus fibrosus. *Eur Spine J*. 2006 Aug;15 Suppl 3: S389-96. Epub 2006 May 11.

Kalson N.S., Richardson S.M. and Hoyland J.A., Strategies for regeneration of the intervertebral disc. *Regen Med.* 2008 Sep; 3(5): 717-29.

Kitano Tatsuro, M. D., Joseph E. Zerwekh, PhD., Yasuo Usui, M. D., Martin L. Edwards, M. S., Paul L. Flicker, M. D., and Vert Mooney, M. D.; Biochemical Changes associated with the symptomatic human intervertebral disc. *Clinical Orthopaedics and related research: Number 293*, pp. 372-377. 1993

Kluba T, Niemeyer T, Gaissmaier C, Gründer T. Human annulus fibrosus and nucleus pulposus cells of the intervertebral disc: effect of degeneration and culture system on cell phenotype. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2005 Dec 15;30(24):2743-8.

Korecki CL, Costi JJ, Iatridis JC. Needle puncture injury affects intervertebral disc mechanics and biology in an organ culture model. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2008 Feb 1;33(3):235-41.

Kraemer J (2009) *Intervertebral Disc Diseases, Causes, Diagnosis, Treatment, and Prophylaxis* p.55-3, Thieme Verlag

Krämer R, Herdmann J, Krämer J: *Mikrochirurgie der Wirbelsäule*; Thieme Verlag (2005) S.1-134

Larsen NE, Dursema HD, Pollak CT, Skrabut EM. Clearance kinetics of a hylan-based viscosupplement after intra-articular and intravenous administration in animal models. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2011 Nov 21.

Lee KI, Moon SH, Kim H, Kwon UH, Kim HJ, Park SN, Suh H, Lee HM, Kim HS, Chun HJ, Kwon IK, Jang JW. Tissue engineering of the intervertebral disc with cultured nucleus pulposus cells using atelocollagen scaffold and growth factors. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2012 Mar 15;37(6):452-8. doi: 10.1097/BRS.0b013e31823c8603.

Leitlinie DGNC Deutsche Gesellschaft für Neurochirurgie: Lumbaler Bandscheibenvorfall. W. Börm, H. Steiger, L.Papavero, J. Herdmann, C. Ohmann und K. Schwerdtfeger. Version 2005

Leung Victor Y. L. Danny Chan, and Kenneth M.C. Cheung. Regeneration of intervertebral disc by mesenchymal stem cells: potentials, limitations, and future direction. *Eur Spine J*. 2006 Aug; 15 Suppl 3: S406-13. Epub 2006 Jul 15.

Levis HJ, Brown RA, Daniels JT. Plastic compressed collagen as a biomimetic substrate for human limbal epithelial cell culture. *Biomaterials*. 2010 Oct;31(30):7726-37.

Levis HJ, Peh GS, Toh KP, Poh R, Shortt AJ, Drake RA, Mehta JS, Daniels JT. Plastic compressed collagen as a novel carrier for expanded human corneal endothelial cells for transplantation. *PLoS One*. 2012;7(11):e50993. doi: 10.1371/journal.pone.0050993. Epub 2012 Nov 30.

Maidhof R, Alipui DO, Rafiuddin A, Levine M, Grande DA, Chahine NO. Emerging trends in biological therapy for intervertebral disc degeneration. *Discov Med*. 2012 Dec;14(79):401-11.

Malhotra NR, Han WM, Beckstein J, Cloyd J, Chen W, Elliott DM. *Spine (Phila Pa 1976)*. An injectable nucleus pulposus implant restores compressive range of motion in the ovine disc. 2012 Aug 15;37(18):E1099-105. doi: 10.1097/BRS.0b013e31825cdfb7.

Martin JT, Gorth DJ, Beattie EE, Harfe BD, Smith LJ, Elliott DM. Needle Puncture Injury Causes Acute and Long-Term Mechanical Deficiency in a Mouse Model of Intervertebral Disc Degeneration. *J Orthop Res*. 2013 Apr 1:0. doi: 10.1002/jor.22355.

May TB, Chakrabarty AM: Isolation and Assay of *Pseudomonas aeruginosa* Alginate, *Methods Enzymol*. 1994; 235: 295-304.

Meakin JR: Replacing the nucleus pulposus of the intervertebral disk: prediction of suitable properties of a replacement material using finite element analysis. *J Mater Sci Mater Med* 12: 207-213 (2001)

Medizinprodukterecht, BVMed – Bundesverband Medizintechnologie e. V., November 2012

Meisel HJ, Siodla V, Ganey T, Minkus Y, Hutton WC, Alasevic OJ. Clinical experience in cell-based therapeutics: disc chondrocyte transplantation. A treatment for degener-

ated or damaged intervertebral disc. *Biomol Eng.* 2007 Feb;24(1):5-21. Epub 2006 Jul 21.

Moore RJ, Crotti TN, Osti, OL, Fraser RD, Vernon-Roberts B: Osteoarthritis of the facet joints resulting from annular rim lesions in sheep lumbar discs. *Spine* 24: 519-525 (1999)

Mueller-Rath R, Gavénis K, Andereya S, Mumme T, Albrand M, Stoffel M, Weichert D, Schneider U. Condensed cellular seeded collagen gel as an improved biomaterial for tissue engineering of articular cartilage. *Biomed Mater Eng.* 2010;20(6):317-28. doi: 10.3233/BME-2010-0645.

Mulisch Maria, Welsch Ulrich: *Romeis Mikroskopische Technik*, 18. Auflage, Springer Akademischer Verlag, Heidelberg, 2010

Natarajan RN, Andersson GB, Patwardhan AG, Verma S. Effect of annular incision type on the change in biomechanical properties in a herniated lumbar intervertebral disc. *J Biomech Eng.* 2002 Apr;124(2):229-36.

Neidlinger-Wilke C, Mietsch A, Rinkler C, Wilke HJ, Ignatius A, Urban J. Interactions of environmental conditions and mechanical loads have influence on matrix turnover by nucleus pulposus cells. *J Orthop Res.* 2012 Jan;30(1):112-21. doi: 10.1002/jor.21481. Epub 2011 Jun 14.

Neidlinger-Wilke C, Würtz K, Liedert A, Schmidt C, Börm W, Ignatius A, Wilke HJ, Claes L. A three-dimensional collagen matrix as a suitable culture system for the comparison of cyclic strain and hydrostatic pressure effects on intervertebral disc cells. Institute of Orthopaedic Research and Biomechanics, University of Ulm, Germany. *J Neurosurg Spine.* 2005 Apr; 2(4): 457-65

Neidlinger-Wilke C, Würtz K, Urban JP, Börm W, Arand M, Ignatius A, Wilke HJ, Claes LE. Regulation of gene expression in intervertebral disc cells by low and high hydrostatic pressure. *Eur Spine J.* 2006 Aug;15 Suppl 3:S372-8. Epub 2006 May 6.

Ning B, Liu HF, Gong WM, Zhao K, DU HX, Liu Y, Wang DC, Hu YG. [The changes of extracellular matrix in adult degenerative nucleus pulposus cells with string microcarrier culture system in vitro]. *Zhonghua Wai Ke Za Zhi*. 2013 May 1;51(5):432-6.

Nöth U, Rackwitz L, Heymer A, Weber M, Baumann B, Steinert A, Schütze N, Jakob F, Eulert J. Chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells in collagen type I hydrogels. University of Würzburg, Orthopedic Center for Musculoskeletal Research, König-Ludwig-Haus, Brettreichstr. 11, 97070 Würzburg. *J Biomed Mater Res A*. 2007 Dec 1; 83(3): 626-35

Oldenkott Professor Dr. Med. Paul Theo. (2005) Bandscheiben-Leiden was tun? S. 61-103

Omlor G, Fischer J, Kleinschmidt K, Benz K, Holschbach J, Brohm K, Anton M, Gühring T, Richter K. Disc cell therapy with a novel albumin hydrogel in a porcine nucleotomy model: in vivo and in vitro measurements of metabolic cell activity and implant persistence. *European Spine Journal*, Volume 22, number 11, November 2013; präsentiert bei der 8. Jahrestagung der Deutschen Wirbelsäulengesellschaft in Frankfurt am Main im Dezember 2013.

Omlor G, Nerlich AG, Wilke HJ, Pfeiffer M, Lorenz H, Schaaf-Keim M, Bertram H, Richter W, Carstens C, Guehring T. A new porcine in vivo animal model of disc degeneration: response of annulus fibrosus cells, chondrocyte-like nucleus pulposus cells, and notochordal nucleus pulposus cells to partial nucleotomy. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2009 Dec 1;34(25):2730-9. doi: 10.1097/BRS.0b013e3181b723c9.

Omlor GW, Nerlich AG, Lorenz H, Bruckner T, Richter W, Pfeiffer M, Gühring T. Injection of a polymerized hyaluronic acid/collagen hydrogel matrix in an in vivo porcine disc degeneration model. *Eur Spine J*. 2012 Sep;21(9):1700-8. Epub 2012 Apr 25.

Orozco L, Soler R, Morera C, Alberca M, Sánchez A, García-Sancho J. Intervertebral disc repair by autologous mesenchymal bone marrow cells: a pilot study. *Transplantation*. 2011 Oct 15;92(7):822-8. doi: 10.1097/TP.0b013e3182298a15.

Osti OL, Vernon-Roberts B, Fraser RD: 1990 Volvo Award in experimental studies. Anulus tears and intervertebral disc degeneration. An experimental study using an animal model. *Spine* 15(8), 762-767 (1990)

Paesold Günther, Andreas G. Nerlich, and Norbert Boos. Biological treatment strategies for disc degeneration: potentials and shortcomings. *Eur Spine J.* 2007 Apr; 16(4): 447-68. Epub 2006 Sep 16.

Pahl, M. H., Laun, H. M., Gleißle, W. 1991. *Praktische Rheologie der Kunststoffe und Elastomere*. VDI-Verlag GmbH, Düsseldorf

Panjabi MM, Oxland TR, Yamamoto I, Crisco JJ: Mechanical behavior of the human lumbar and lumbosacral spine as shown by three dimensional load-displacement curves. *J Bone Joint Surg (Am)* 76, 413-424 (1994)

Park P, Garton HJ, Gala VC, Hoff JT, McGillicuddy JE. Adjacent segment disease after lumbar or lumbosacral fusion: review of the literature. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2004 Sep 1; 29(17): 1938-44. Philadelphia: S. 86-117 (1990)

Parker SL, Grahovac G, Vukas D, Vilendecic M, Ledic D, McGirt MJ, Carragee EJ. Effect of An Annular Closure Device (Barricaid) on Same Level Recurrent Disc Herniation and Disc Height Loss After Primary Lumbar Discectomy: Two-Year Results of a Multi-Center Prospective Cohort Study. *J Spinal Disord Tech.* 2013 Nov 5.

Pfeiffer M, Boudriot U, Pfeiffer D, Ishaque N, Goetz W, Wilke A. Intradiscal application of hyaluronic acid in the non-human primate lumbar spine radiological results. *Eur Spine J.* 2003 Feb;12(1):76-83. Epub 2002 Nov 22.

Postacchini F. Results of surgery compared with conservative management for lumbar disc herniations. *Spine (Phila Pa 1976)*. 1996 Jun 1;21(11):1383-7.

Preradovic A, Kleinpeter G, Feichtinger H, Balaun E, Krugluger W. Quantitation of collagen I, collagen II and aggrecan mRNA and expression of the corresponding proteins in human nucleus pulposus cells in monolayer cultures. *Cell Tissue Res.* 2005 Sep;321(3):459-64. Epub 2005 Jul 7.

Prosdocimi M, Bevilacqua C. Exogenous hyaluronic acid and wound healing: an updated vision. *Panminerva Med.* 2012 Jun;54(2):129-35.

Reich MS, Kishore V, Iglesias R, Akkus O. Genipin as a sporicidal agent for the treatment of cortical bone allografts. *J Biomater Appl.* 2013 Oct 15. [Epub ahead of print]

Reitmaier S, Shirazi-Adl A, Bashkuev M, Wilke HJ, Gloria A, Schmidt H. In vitro and in silico investigations of disc nucleus replacement. *J R Soc Interface.* 2012 Aug 7;9(73):1869-79. doi: 10.1098/rsif.2012.0016. Epub 2012 Feb 15.

Reitmaier S, Wolfram U, Ignatius A, Wilke HJ, Gloria A, Martín-Martínez JM, Silva-Correia J, Miguel Oliveira J, Luís Reis R, Schmidt H. Hydrogels for nucleus replacement-facing the biomechanical challenge. *J Mech Behav Biomed Mater.* 2012 Oct;14

Richardson S. M., A. Mobasher, A. J. Freemont and J. A. Hoyland, Invertebral disc biology, degeneration and novel tissue engineering and regenerative medicine therapies. *Histol Histopathol* (2007) 22: 1033-1041

Richardson S. M., And Hoyland Judith A. Stem Cell Regeneration of Degenerated Invertebral Discs: Current Status. *Curr Pain Headache Rep.* 2008 Apr; 12(2):83-8.

Rothoerl RD, Woertgen C, Brawanski A. When should conservative treatment for lumbar disc herniation be ceased and surgery considered? *Neurosurg Rev.* 2002 Jun;25(3):162-5.

Rütschle, Isabel. Bachelorthesis 2012 – Entwicklung einer vaskularisierten Trägerstruktur für das Tissue Engineering mittels plastischer Kompression eines Hydrogels; Seite 1-65; Hochschule Ulm

Sakai D, Mochida J, Iwashina T, Hiyama A, Omi H, Imai M, Nakai T, Ando K, Hotta T. Biomaterials. Regenerative effects of transplanting mesenchymal stem cells embedded in atelocollagen to the degenerated intervertebral disc. 2006 Jan;27(3):335-45. Epub 2005 Aug 19.

Sakai D, Mochida J, Iwashina T, Watanabe T, Nakai T, Ando K, Hotta T. Differentiation of mesenchymal stem cells transplanted to a rabbit degenerative disc model: potential

and limitations for stem cell therapy in disc regeneration. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2005 Nov 1;30(21):2379-87.

Schneider U, Schmidt-Rohlfing B, Gavenis K, Maus U, Mueller-Rath R, Andereya S. A comparative study of 3 different cartilage repair techniques. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. 2011 Dec;19(12):2145-52. doi: 10.1007/s00167-011-1460-x. Epub 2011 Mar 16.

Sebastine Immanuel M., Williams David J. Current developments in Tissue Engineering of Nucleus Pulposus for Treatment of Invertebral Disc Degeneration. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc*. 2007; 2007: 6401-6.

Silva Wilson et al., The Profile of Gene Expression of Human Marrow Mesenchymal Stem Cells. Center for Cell Therapy and Regional Blood Center, Department of Clinical Medicine, Faculty of Medicine, Ribeirão Preto, Brazil. *Stem Cells* 2003; 21: 661-669

Silver F.H., Christiansen, D.L. (2000) Wundheilung im Knorpel. In: Sames k. (Hrsg) Medizinische Regeneration und Tissue Engineering. Landsberg am Lech: Ecomed Verlagsgesellschaft AG & Co. KG S. 1-10

Smith & Nephew – Hilfreich bei Arthrose. Intraartikuläre Injektionstherapie der Gon- und Koxarthrose mit NASHA-Gel

Solis MA, Chen YH, Wong TY, Bittencourt VZ, Lin YC, Huang LL. Hyaluronan regulates cell behavior: a potential niche matrix for stem cells. *Biochem Res Int*. 2012;2012:346972. doi: 10.1155/2012/346972. Epub 2012 Feb 12.

Strassburg S, Richardson SM, Freemont AJ, Hoyland JA. Co-culture induces mesenchymal stem cell differentiation and modulation of the degenerate human nucleus pulposus cell phenotype. *Regen Med*. 2010 Sep;5(5):701-11. doi: 10.2217/rme.10.59.

Suk KS, Jeon CH, Park MS, Moon SH, Kim NH, Lee HM. Comparison between posterolateral fusion with pedicle screw fixation and anterior interbody fusion with pedicle screw fixation in adult spondylolytic spondylolisthesis. *Yonsei Med J*. 2001 Jun;42(3):316-23.

Thomas JD, Fussell G, Sarkar S, Lowman AM, Marcolongo M. Synthesis and recovery characteristics of branched and grafted PNIPAAm-PEG hydrogels for the development of an injectable load-bearing nucleus pulposus replacement. *Acta Biomater.* 2010 Apr;6(4):1319-28. doi: 10.1016/j.actbio.2009.10.024. Epub 2009 Oct 31.

Thompson RE, Pearcy MJ, Downing KJ, Manthey BA, Parkinson I, Fazzalari NL: Disc lesions and the mechanics of the intervertebral joint complex. *Spine* 25: 3026-35 (2000)

Urban Jill and Roberts Sally, Degeneration of the Invertebral disc. *Arthritis Res Ther.* 2003; 5(3): 120-30. Epub 2003 Mar 11.

Vadalà G, Studer RK, Sowa G, Spiezia F, Iucu C, Denaro V, Gilbertson LG, Kang JD. Co-culture of bone marrow mesenchymal stem cells and nucleus pulposus cells modulate gene expression profile without cell fusion. *Spine.* 2008 Apr 15; 33(8): 870-6

Vernengo J, Fussell GW, Smith NG, Lowman AM. Synthesis and characterization of injectable bioadhesive hydrogels for nucleus pulposus replacement and repair of the damaged intervertebral disc. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2010 May;93(2):309-17. doi: 10.1002/jbm.b.31547.

Walles T, Herden T, Haverich A, Mertsching H. Influence of scaffold thickness and scaffold composition on bioartificial graft survival. *Biomaterials.* 2003 Mar;24(7):1233-9.

White A, Panjabi MM: *Clinical Biomechanics of the Spine.* 2nd edition J.B. Lippincott

Wilke H-J et al., Intradiscal pressure together with anthropometric data – a data set for the validation of models. *CLIN BIOMECH:* 2001, 16 Supplement, pp S111-S126

Wilke H-J et al., New In Vivo Measurements of Pressure in the Intervertebral Disc in Daily Life. *SPINE:* 1999, Volume 24, Number 8, pp. 755-762

Wilke HJ, Heuer F, Neidlinger-Wilke C, Claes L. Is a collagen scaffold for a tissue engineered nucleus replacement capable of restoring disc height and stability in an animal model? *Eur Spine J.* 2006 Aug; 15 Suppl 3: S433-8. Epub 2006 Jul 26

Wilke H-J, Kavanagh S, Neller S, Claes L: Effekt eines künstlichen Nukleusersatzimplantats auf die Beweglichkeit und Bandscheibenhöhe an einem L4/5-Segment nach Nucleotomie. *Orthopäde* 31: 434-440 (2002)

Wilke H-J, Wenger K, Claes L: Testing criteria for spinal implants: recommendations for the standardization of in vitro stability testing of spinal implants. *Eur Spine J* 7: 148-154 (1998)

Wohlrab W, Neubert R, Wohlrab J, Hyaluronsäure und Haut; Volume 3; Trends in Clinical and Experimental Dermatology; Shaker Verlag Aachen 2004

Wu SC, Chang JK, Wang CK, Wang GJ, Ho ML. Enhancement of chondrogenesis of human adipose derived stem cells in a hyaluronan-enriched microenvironment. *Biomaterials*. 2010 Feb;31(4):631-40. doi: 10.1016/j.biomaterials.2009.09.089. Epub 2009 Oct 12.

Wuertz K, Urban JP, Klasen J, Ignatius A, Wilke HJ, Claes L, Neidlinger-Wilke C. Influence of extracellular osmolarity and mechanical stimulation on gene expression of intervertebral disc cells. *J Orthop Res*. 2007 Nov;25(11):1513-22.

www.fotolia.de

www.in-thera.de

www.tissue-factory.com

Xi Y, Kong J, Liu Y, Wang Z, Ren S, Diao Z, Hu Y. Minimally invasive induction of an early lumbar disc degeneration model in rhesus monkeys. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2013 May 1;38(10):E579-86. doi: 10.1097/BRS.0b013e31828b695b.

Zhao F, Pollintine P, Hole BD, Dolan P, Adams MA: Discogenic Origins of Spinal Instability. *Spine* 30: 2621-2630 (2005)

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2-1: Anatomie humane Wirbelsäule - Ansicht lateral und ventral: Rote schematische Darstellung der Zwischenwirbelsegmente von der Hals-, Brust- und Lendenwirbelsäule sowie Kreuz- und Steißbein mit den jeweiligen Lordosen und Kyphosen (verändert nach Fotolia).	8
Abbildung 2-2: Anatomischer Aufbau einer bovinen Bandscheibe – Querschnitt. Nucleus pulposus aus gallertartiger hydrophiler Substanz, Anulus fibrosus mit Lamellenstruktur.....	9
Abbildung 5-1: Zweikammerspritze ChondroFiller ^{liquid} der Amedrix GmbH zu regenerativen Behandlung artikulärer Knorpeldefekte.	33
Abbildung 5-2: Anlagenaufbau zur Spannungs-Kompressions-Messung der verdichteten Implantatmatrix am Fraunhofer IGB – Aufbau von Waage und Linearmotor, Benutzeroberfläche für PC und Netzteil zur Steuerung des Servo Controllers.....	36
Abbildung 5-3: Isolation boviner Bandscheiben. A, B + C Schneiden des gehäuteten Rinderschwanzes entlang der Endplatten zur Isolation einzelner Bandscheiben mit einem Skalpell; D Teilbereiche der Bandscheibe: Anulus, Übergangszone und Nukleus	37
Abbildung 5-4: Ex vivo Ansatz. A: Bovine teil-nukleotomierte Bandscheiben mit implantierter verdichteter Implantatmatrix; B: Füllung der Hohlräume mit ChondroFiller ^{liquid}	43
Abbildung 5-5: Links: Wirbelsäulensimulator mit eingespanntem Präparat. Mit Hilfe von 3 Schrittmotoren werden reine Momente eingeleitet und das Präparat in den 3 Hauptebenen in Flexion/Extension, Seitneigung und axialer Rotation belastet. Rechts: Servohydraulische Materialprüfmaschine mit Aufbau für die zyklische Dauerbelastung.....	51
Abbildung 6-1: Entwurf Reaktor - A Einzelkomponenten: Zylinder mit Stoppfern zur Einstellung der Implantatendhöhe, Verdichtungsstempel, poröse Einheiten zum Abfluss von Flüssigkeit, Auffangschale und Abdeckhaube; B Gesamtansicht.....	56
Abbildung 6-2: Reaktor - Technische Zeichnung und Prototyp aus PTFE.....	57
Abbildung 6-3: Implantatverpackung. A: Implantat 1x6 cm; B: Implantat gerollt mit einem Innendurchmesser < 2,6 mm; C: Überführung in Metallhülse durch Unterdruck; D: Entnahme mittels Führungsstab.....	59
Abbildung 6-4: Implantation der verdichteten Implantatmatrix in ein humanes Präparat. A: Nukleotomie nach Foraminotomie mittels Rongeur; B:	

Transforaminale Implantation in die Segmente L 2/3 und L 3/4 mittels Applikationshülse und Führungsstab.....	60
Abbildung 6-5: Verlust der HA [mg] unter Kultivierungsbedingungen. Zeitpunkt 1 (75 min), 2 (6 h), 3 (1 d), 4 (2 d), 5 (3 d), 6 (4 d), 7 (7 d) und 8 (11 d)	62
Abbildung 6-6: Quellpotential verdichteter Matrices mit und ohne HA-Zusatz	63
Abbildung 6-7: Oszillationsmessung von Frequenzsweep. ChondroFiller ^{liquid} mit und ohne HA-Zusatz; zwei Kollagenchargen. Darstellung des elastischen Moduls in Abhängigkeit von der Frequenz.....	65
Abbildung 6-8: Spannungs-Kompressions-Kurven der verdichteten Implantatmatrix +/- HA-Zusatz; bis zu einer Deformation von 100 %.	66
Abbildung 6-9: Spannungs-Kompressions-Kurven der verdichteten Implantatmatrix +/- HA-Zusatz; gemittelt; bis zu einer Deformation < 60 %.	67
Abbildung 6-10: Zytotoxizitätstest bBSZ. Zellproliferation [%] nach 72 h Extraktinkubation.....	68
Abbildung 6-11: Zytotoxizitätstest hBSZ. Zellproliferation [%] nach 72 h Extraktinkubation.....	69
Abbildung 6-12: Zellzahl in Abhängigkeit zur Inkubationsdauer bBSZ in 10GNL-MP und 5GNL-MP	70
Abbildung 6-13: Zellzahl in Abhängigkeit zur Inkubationsdauer hBSZ in 10GNL-MP und 5GNL-MP	71
Abbildung 6-14: Zellzahl in Abhängigkeit zur Inkubationsdauer hMSC in 10GNL-MP und 5GNL-MP	71
Abbildung 6-15: Fluoreszenzfärbung bBSZ auf der verdichteten Matrix +/-HA-Zusatz, Maßstab 100 µm. A: -HA, nach 1 d; B: -HA, nach 7 d; C: +HA, nach 1 d; D: +HA nach 7 d.....	73
Abbildung 6-16: Fluoreszenzfärbung hBSZ auf der verdichteten Matrix +/-HA-Zusatz, Maßstab 100 µm. A: -HA, nach 1 d; B: -HA, nach 7 d; C: +HA, nach 1 d; D: +HA nach 7 d.....	74
Abbildung 6-17: Fluoreszenzfärbung hMSC auf der verdichteten Matrix +HA-Zusatz, Maßstab 100 µm. A: nach 1 d; B: nach 7 d	74
Abbildung 6-18: Proliferation bBSZ über 28 d in der verdichteten Implantatmatrix +/- HA-Zusatz	75
Abbildung 6-19: Proliferation hBSZ über 28 d in der verdichteten Implantatmatrix +/- HA-Zusatz	76
Abbildung 6-20: Besiedlung und Proliferation bBSZ in der verdichteten Matrix. A: Kultivierungsdauer 1 w -HA-Zusatz; B: Kultivierungsdauer 5 w -HA-Zusatz; C:	

Kultivierungsdauer 1 w +HA-Zusatz; D: Kultivierungsdauer 5 w +HA-Zusatz; Maßstab 100 µm.....	78
Abbildung 6-21: Besiedlung und Proliferation hBSZ in der verdichteten Matrix. A: Kultivierungsdauer 1 w -HA-Zusatz; B: Kultivierungsdauer 5 w -HA-Zusatz; C: Kultivierungsdauer 9 w -HA-Zusatz; D: Kultivierungsdauer 1 w +HA-Zusatz; E: Kultivierungsdauer 5 w +HA-Zusatz; F: Kultivierungsdauer 9 w +HA-Zusatz; Maßstab 100 µm.....	79
Abbildung 6-22: Proliferation bBSZ in der ChondroFiller ^{liquid} Implantatmatrix +/-HA- Zusatz.....	81
Abbildung 6-23: Proliferation hBSZ in der ChondroFiller ^{liquid} Implantatmatrix +/-HA- Zusatz.....	81
Abbildung 6-24: Proliferation hMSC in der ChondroFiller ^{liquid} Implantatmatrix +/-HA- Zusatz.....	82
Abbildung 6-25: Besiedlung und Proliferation bBSZ, hBSZ und hMSC in der ChondroFiller ^{liquid} Matrix +HA-Zusatz. A: Kultivierungsdauer 1 w bBSZ; B: Kultivierungsdauer 4 w bBSZ; C: Kultivierungsdauer 1 w hBSZ; D: Kultivierungsdauer 4 w hBSZ; E: Kultivierungsdauer 1 w hMSC; F: Kultivierungsdauer 4 w hMSC; Maßstab 100 µm	83
Abbildung 6-26: Synthese sulfatierter Glykosaminoglykane nach einer Kultivierungsdauer von 21 d in der ChondroFiller ^{liquid} Matrix +HA-Zusatz; 3 x hMSC, 3 x hBSZ und 1 x bBSZ.....	84
Abbildung 6-27: Genexpression Aggrekan. Verdichtete Matrix: bBSZ und hBSZ; ChondroFiller ^{liquid} Matrix: bBSZ, hBSZ und hMSC; nach 1, 14 und 28 d	86
Abbildung 6-28: Genexpression Kollagen Typ I. Verdichtete Matrix: bBSZ und hBSZ; ChondroFiller ^{liquid} Matrix: bBSZ, hBSZ und hMSC; nach 1, 14 und 28 d	86
Abbildung 6-29: Genexpression Kollagen Typ II. Verdichtete Matrix: bBSZ und hBSZ; ChondroFiller ^{liquid} Matrix: bBSZ, hBSZ und hMSC; nach 1, 14 und 28 d	86
Abbildung 6-30: Genexpression MMP-2. Verdichtete Matrix: bBSZ und hBSZ; ChondroFiller ^{liquid} Matrix: bBSZ, hBSZ und hMSC; nach 1, 14 und 28 d	87
Abbildung 6-31: In vitro Kultursystem - Migration bBSZ aus der ChondroFiller ^{liquid} Matrix in die verdichtete Implantatmatrix. A: Kultivierungsdauer 1 w; B: Kultivierungsdauer 10 w; Maßstab 100 µm	88
Abbildung 6-32: In vitro Kultursystem - Migration hBSZ aus der ChondroFiller ^{liquid} Matrix in die verdichtete Implantatmatrix. A: Kultivierungsdauer 1 w; B: Kultivierungsdauer 10 w; Maßstab 100 µm	88
Abbildung 6-33: Ex vivo Ansatz. Organkultivierung boviner Bandscheiben nach einer partiellen Nukleotomie inklusive der implantierten azellulären Matrices	

(ChondroFiller ^{liquid} + verdichtete Matrix). A: Zellschicht an der Randzone des Nativgewebes zu ChondroFiller ^{liquid} nach 10 w; B: vergrößerter Ausschnitt von A; C: Besiedelte ChondroFiller ^{liquid} Matrix nach 13 w; D: vergrößerter Ausschnitt von C; E: Besiedlung der verdichteten Matrix nach 13 w; F: vergrößerter Ausschnitt von E; Maßstab 100 µm	90
Abbildung 6-34: Ex vivo Ansatz Morphologie der Zellen nach 13 w. A: ChondroFiller ^{liquid} Matrix; B: verdichtete Implantatmatrix; Maßstab 100 µm	91
Abbildung 6-35: Ex vivo Ansatz Morphologie der Zellen. A: Verteilung und Dichte der Zellen im nativen Nucleusgewebe nach 1 w; B: vergrößerter Ausschnitt von A; Maßstab 100 µm	91
Abbildung 6-36: Boxplot der Höhenmessung in mm (n = 6 Präparate für intakt, nukleotomiert und implantiert).....	92
Abbildung 6-37: Gesamtbewegungsumfang (RoM, farbig) und Neutrale Zone gesamt (NZ, grau) der Bewegungssegmente in den unterschiedlichen Präparatzuständen: intakt (grün), nukleotomiert (rot) und implantiert (blau). Die abnehmende Zahl der Präparate ab 10.000 Zyklen ist auf die auftretende Implantatextrusion zurückzuführen.	94
Abbildung 6-38: Bewegungsumfang (RoM) und neutrale Zone (NZ) aufgeteilt in die Bewegungsrichtungen Flexion/Extension, Seitneigung links/rechts und die axiale Rotation rechts/links.....	95
Abbildung 7-1: Drei biologische Therapieansätze zur Behandlung degenerativer Bandscheibenerkrankungen in Abhängigkeit vom Stadium (verändert nach Maidhof et al., 2012).	101
Abbildung 7-2: Bovines Biomechanikmodell. Austrocknendes Präparat der Lendenwirbelsäule mit Anulusinzision während der zyklischen Dauerbelastung in der Materialprüfmaschine	115
Abbildung 7-3: Barricaid-Prothese (Intrinsic Therapeutics) bestehend aus einem Polymernetz, welches den Anulusdefekt verschließt und einem Titananker, der im Wirbelkörper fixiert wird (www.in-thera.de).	116

Tabellenverzeichnis

Tabelle 4-1: Zusammenstellung der Oligonukleotide der PCR (hBSZ und hMSC).....	26
Tabelle 4-2: Zusammenstellung der Oligonukleotide der PCR (bBSZ).....	27
Tabelle 4-3: Verwendete Geräte	28
Tabelle 5-1: Übersicht über die Parametereinstellungen des Frequenzsweeps.....	35
Tabelle 5-2: Schritte der Paraffinierung	45
Tabelle 5-3: Schritte der Entparaffinierung und Azanfärbung	46
Tabelle 5-4: Schritte der cDNA-Synthese.....	47
Tabelle 5-5: Programm PCR	48
Tabelle 5-6: Parameter einer Wirbelsäulenbelastungssimulator-Messung.....	52
Tabelle 5-7: Parameter der servohydraulischen Materialprüfmaschine	53
Tabelle 5-8: Versuchsprotokoll der biomechanischen Testung	54
Tabelle 6-1: Werte der einzelnen Implantatmatrices	61

Abkürzungsverzeichnis

°, ° C	Grad, Grad Celsius
µg, mg, g, kg	Mikrogramm, Miligramm, Gramm, Kilogramm
µl, ml, l	Mikroliter, Mililiter, Liter
3D	dreidimensional
Azan	Azokarmin G und Anillinblau-Goldorange
bBSZ/hBSZ	bovine Bandscheibenzellen/humane Bandscheibenzellen
bp	base pair
cDNA	complementary deoxiribonucleic acid
CF ^{liquid}	ChondroFiller ^{liquid}
d	Tag
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP's	desoxy-Nukleotidtriphosphate
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzym linked Immunosorbent Assay
et al.	et alii
EtOH	Ethanol
EWG	Europäische Wirtschaftsgemeinschaft
FBS	Foetal Bovine Serum
FDA	Food and Drug Administration
G	Gauge
GNL	Gelneutralisationslösung
h	Stunde
HA	Hyaluronsäure

hMSC	humane mesenchymale Stammzellen
Hz	Hertz
LAF	Laminar Air Flow
min	Minute
MMP-2	Matrix Metalloproteinase 2
MPG	Medizinproduktegesetz
mRNA	Messenger ribonucleic acid (Boten-Ribonukleinsäure)
N	Newton
nm	Nanometer
∅	Durchmesser
Pa	Pascal
PBS	Phosphate buffered saline (phosphatgepufferte Kochsalzlösung)
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerase Kettenreaktion)
pH	potentia hydrogenii (dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration)
PTFE	Polytetrafluorethylen
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute
s	Sekunde
sGAG	sulfatierte Glykosaminoglykane
STABW	Standardabweichung
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TLIF	Transforaminal interbody fusion
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
U	Unit
UV	Ultraviolett
v/v	volume per volume
VE	Vollentsalzt

verd.	verdichtet
w	Woche
w/v	weight per volume

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema:

Die Entwicklung regenerativer Implantatmatrices auf der Basis von Kollagen Typ I zur Anwendung bei degenerativen Bandscheibenerkrankungen

vollkommen selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Ich erkläre weiterhin, dass diese Dissertation weder in gleicher noch ähnlicher Form in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Ich habe zuvor keinen Doktorgrad erworben oder zu erwerben versucht.

Würzburg, 19. Februar 2014

Alice Krüger

Danksagung

Mein Dank gilt Allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Prof. Heike Walles für die Aufnahme als Doktorandin und Betreuung der Arbeit sowie für die Übernahme des Erstgutachtens;

Prof. Thomas Dandekar für die Übernahme des Zweitgutachtens;

Dr. Thomas Graeve und der Amedrix GmbH für die Durchführung der Versuchsdurchführungen in der Abteilung für Forschung & Entwicklung sowie für die fachliche Betreuung und Finanzierung der Arbeit;

Wolfgang Gumbert, Mariya Cholakova und Verena Rein für ihre Hilfsbereitschaft und großartige Unterstützung im Labor;

Edeltraud Isenmann, Diana Baumann, Julia Maierle und Katharina Kieper für deren Unterstützung, Korrektur und Kuchen;

Dr. Jan Hansmann und Isabel Rutschle vom Fraunhofer Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik für die Nutzung des Reaktors zur Erstellung der Spannungs-Kompressions-Messungen;

Dr. Farzam Vazifehdan für die Hospitationen am Wirbelsäulenzentrum des Diakonieklinikums Stuttgart sowie für die positive interdisziplinäre Zusammenarbeit;

Der Firma Ulrich Medical und dem Diakonie Klinikum Stuttgart für die Teilnahme an den Interkorporellen Fusionstagen 2013 in Tübingen;

Der ElingKlinger AG für die Erstellung der technischen Zeichnungen und die Anfertigung des Reaktor-Prototyps;

Dr. Sandra Reitmaier und Prof. Hans-Joachim Wilke für die Ermöglichung der biomechanischen Versuche am Institut für Unfallchirurgie und Biomechanik in Ulm;

Meiner Familie, meinem Freund und meinen Freunden, die mich in den letzten Jahren immer unterstützt haben.

