

AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR ORTHOPÄDIE
PROF. DR. JOACHIM GRIFKA
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

IMMUNHISTOCHEMISCHE UNTERSUCHUNG DES LIGAMENTUM FLAVUM BEI
PATIENTEN MIT SPINALKANALSTENOSE

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Svenja Sprenger

2020

AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR ORTHOPÄDIE
PROF. DR. JOACHIM GRIFKA
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

IMMUNHISTOCHEMISCHE UNTERSUCHUNG DES LIGAMENTUM FLAVUM BEI
PATIENTEN MIT SPINALKANALSTENOSE

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Svenja Sprenger

2020

Dekan: Prof. Dr. Dirk Hellwig

1. Berichterstatter: PD Dr. Achim Benditz

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Rainer Straub

Tag der mündlichen Prüfung: 23.06.2020

Inhalt

Inhalt	1
1 Einleitung	2
1.1 Spinalkanalstenose	2
1.2 Hypertrophie und Bedeutung des Ligamentum Flavum	2
1.3 Zielsetzung und Hypothese.....	3
2 Material & Methoden.....	4
2.1 Patientenkollektiv, Klinische Datenerhebung, Probengewinnung.....	4
2.2 Magnetresonanztomographie, Bildverarbeitung und Analyse.....	5
2.3 Bestimmung der Nervenfaserdichte und Zelldichte.....	5
2.4 Immunhistologische Färbung der Entzündungsmarker.....	6
2.5 Statistische Analyse.....	6
3 Ergebnisse	6
3.1 Dichte der sensorischen und sympathischen Nervenfasern im Ligamentum Flavum .	7
3.2 Dichte der sensorischen Nervenfasern und klinische Auslesung.....	7
3.3 Dichte der sensorischen Nervenfasern und inflammatorische Auslesung.....	7
3.4 Unterschiede bei Frauen und Männern mit LSS	8
4 Diskussion	8
4.1 Dichte der sensorischen und sympathischen Nervenfasern im Ligamentum Flavum .	9
4.2 Dichte der sensorischen Nervenfasern und klinische Auslesung.....	10
4.3 Dichte der sensorischen Nervenfasern und inflammatorische Auslesung.....	10
4.4 Unterschiede bei Frauen und Männern mit LSS	10
5 Fazit	11
6 Literaturverzeichnis	12
7 Danksagung.....	18

1 Einleitung

1.1 Spinalkanalstenose

Die lumbale Spinalkanalstenose (LSS) ist das häufigste degenerative Krankheitsbild bei älteren Patienten¹⁻³ und ist definiert als eine begrenzte osteoligamentäre Einengung des Spinalkanals. Das Leitsymptom ist die neurogene Claudicatio intermittens, die mit einer abnehmenden Gehstrecke einhergeht.⁴ Außerdem können lumbaler Rücken- und Gesäßschmerz beobachtet werden. Des Weiteren sind neurologische Defizite in Form von Hyp- und Parästhesien, Paresen oder des sehr selten auftretenden Cauda equina Syndroms möglich. Es wird zwischen der primären (kongenital) und der sekundären (degenerativ, posttraumatisch) Form der lumbalen Spinalkanalstenose unterschieden, wobei letztere deutlich häufiger vorkommt.⁵

Der LSS liegt eine Kombination aus degenerativen Veränderungen der Bandscheiben und der Facettengelenke mit Osteophytenbildung zugrunde.^{6,7} Des Weiteren wurde die Hypertrophie des Ligamentum Flavum bereits als wichtiger Entstehungsfaktor der LSS diskutiert.¹⁻³

Diese Prozesse an der lumbalen Wirbelsäule, die zu einer Einengung des Spinalkanals führen können, sind in diesem Zusammenhang häufig für Schmerzen und Funktionsstörungen bei älteren Patienten verantwortlich und beeinflussen die gesundheitsbezogene Lebensqualität deutlich stärker, als vergleichsweise andere Komorbiditäten wie die Osteoarthritis der Hüfte und des Knies, kardiovaskuläre, zerebrovaskuläre oder respiratorische Erkrankungen.⁸ Dies zeigt die deutliche Relevanz dieser Erkrankung und die Notwendigkeit die Therapieoptionen durch gezielte Erforschung der Ursachen weiter zu verbessern.

1.2 Hypertrophie und Bedeutung des Ligamentum Flavum

Die Ligamenta Flava bestehen größtenteils aus elastischen Fasern, die ihnen die gelbe Farbe verleihen. Sie verlaufen als dicke, kräftige Bänder zwischen den Laminae arcus vertebrae benachbarter Wirbelbögen und vervollständigen dorsal der Zwischenwirbellöcher die Wand des Wirbelkanals. Die Ligamenta Flava stehen bei aufrechter Haltung der Wirbelsäule unter Spannung, unterstützen die Rückenmuskeln bei der Stabilisierung in der Sagittalebene und hemmen eine übermäßige Ventralflexion der Wirbelsäule.⁹

Das typische klinische Bild der Spinalkanalstenose ist die Claudicatio spinalis. Nachdem konservative Therapiemöglichkeiten ausgeschöpft sind und Instabilität als Kontraindikation ausgeschlossen wurde, ist die Operation zur Dekompression des Spinalkanals die „state-of-the-

art“ Therapie der Wahl bei Patienten mit LSS. Insbesondere können Beinschmerzen und Claudicatio durch dieses Verfahren gelindert werden.¹⁰

In einigen Studien werden zwar Entstehungsfaktoren erläutert, die mit der Hypertrophie des Ligamentum flavum zusammenhängen, dennoch ist wenig bekannt über dessen Rolle bei LSS.¹¹ Während einige Studien gezeigt haben, dass eine Verdickung des Ligamentum Flavum mit Alter, Bandscheibendegeneration und LSS^{12,13} assoziiert ist, wird jedoch weiterhin diskutiert, ob es sich bei diesem Verdickungsprozess um eine echte Hypertrophie oder lediglich um eine Aufwerfung des Ligaments ohne histologisches Korrelat handelt. Zudem ist nichts darüber bekannt welche Rolle das Ligamentum Flavum in der Stimulation von Schmerzen spielt. Schmerzempfindung oder die Expression nozizeptiver Nervenfasern im Ligamentum Flavum wurden bei Patienten mit LSS bisher nicht untersucht.

1.3 Zielsetzung und Hypothese

Das Ziel war die Analyse schmerzsensibler Nervenfasern im Ligamentum Flavum von Patienten mit LSS. Diese wurde mit Gewebeproben von Patienten, die sich einer operativen Therapie mit Flavektomie unterzogen, durchgeführt.

In den vergangenen Jahren wurde vermehrt das Auftreten einsprießender nozizeptiver Nervenfasern, sensorische Hyperinnervation genannt, erforscht. Sensorische Hyperinnervation konnte in unterschiedlichen Erkrankungen mit und ohne entzündliche Ursache, wie Rheumatoide Arthritis,¹⁴ Morbus Crohn,¹⁵ Achillessehnenentzündung,¹⁶ Dupuytren Kontraktur,¹⁷ chronischer Charcot-Fuß,¹⁸ und vordere Knieschmerzen,¹⁹ nachgewiesen werden. Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass sensorische Hyperinnervation mit Substanz P-positiven Nervenfasern häufig in muskuloskelettalen Erkrankungen auftritt.

Nach Stimulation einer Schmerznerve durch unterschiedliche Reize, wird ein Aktionspotenzial generiert und gleichzeitig Substanz P, sowie Calcitonin gene-related Peptid (CGRP) lokal ausgeschüttet.^{20,21} Die Ausschüttung von Substanz P ins umliegende Gewebe ist ein proinflammatorischer Reiz, der zu einer chronischen Entzündung beiträgt.^{22,23} Substanz P ist ein starker Stimulator von Zellwachstum- und Funktion des Bindegewebes²⁴ und hat außerdem einen ausgeprägten Effekt auf die Aktivierung von Fibroblasten und extrazelluläre Substanzvermehrung, welche zu vermehrter Narbenbildung führen.^{25,26} Andere demonstrierten die pro-proliferative Wirkung von Substanz P -Injektionen auf Fibroblasten in rupturierten Sehnen.²⁷ Die Stimulation von Substanz P führte zu einer erhöhten Rate an kollagenem Umbau, der über dessen Neurokinin-1 Rezeptor vermittelt wird.²⁸

Vor diesem Hintergrund und mit der Erkenntnis, dass das Ligamentum Flavum bei LSS verdickt ist, stellten wir die Hypothese auf, dass dieses Ligament eine sensible Hyperinnervation mit Substanz P -positiven Nervenfasern aufweist. Ferner vermuteten wir, dass das Ligamentum Flavum Entzündungszeichen mit Leukozyteninfiltration, Gefäßneubildungen und Fibroblastenaktivierung zeigt.

2 Material & Methoden

2.1 Patientenkollektiv, Klinische Datenerhebung, Probengewinnung

Die Studie wurde durch das Ethik Komitee der Universität Regensburg (12. April 2013, Referenznr. 13-101-0071) genehmigt. Eine schriftliche Einverständniserklärung lag von allen Studienteilnehmern vor.

Prospektiv wurden insgesamt 28 Proben von 28 Patienten mit LSS und eindeutiger Indikation für eine dekomprimierende Operation gesammelt. Einschlusskriterien der Patienten waren die folgenden: (A) Neurogene Claudicatio, (B) Beinschmerzen, die mit mehr als 4 Punkten auf der numerischen Beurteilungsskala bewertet sind (NRS, 0-10), (C) Schmerzen für mehr als 6 Monate, (D) überwiegender Beinschmerz, (E) definitive Verdickung des Ligamentum Flavum in magnetresonanztomographischer Bildgebung. Die Kontrollgruppe bestand aus acht Patienten mit akutem Bandscheibenvorfall und akutem Beinschmerz für weniger als zwei Wochen ohne vorher bestehende lumbale Rückenschmerzen.

In die Kontrollgruppe wurden Patienten mit akutem Bandscheibenvorfall eingeschlossen, da dieses Krankheitsbild vor allem bei jüngeren Menschen ohne degenerative Veränderungen der Wirbelsäule und somit auch ohne anhaltende untere Rückenschmerzen auftritt. Im Gegensatz zur LSS, welche sich über viele Jahre infolge degenerativer Veränderungen entwickelt. In beiden Gruppen wurde eine totale Flavektomie durchgeführt. Eine Patientengruppe mit akutem Bandscheibenvorfall hat sich bereits in anderen Studien als ideale Kontrollgruppe für Untersuchungen der LSS etabliert.¹³

Vor dem operativen Eingriff wurden verschiedene Parameter, wie Bein- und Rückenschmerz anhand der NRS (0-10), das Vorliegen einer Claudicatio, die deutsche Version des Oswestry Disability Index (ODI),²⁹ das Roland Morris Questionnaire,³⁰ sowie die deutsche Version der Depression-Angst-Stress-Skala (DASS-21-G)³¹, bestimmt.

In beiden Gruppen wurde operativ eine totale Flavektomie en-bloc durchgeführt. Die Proben des Ligamentum Flavum wurden umgehend in einer 3,7%igen Formaldehyd- haltigen PBS-Lösung für 24 Stunden fixiert. Anschließend wurde das Gewebe mit 20% Sucrose für weitere 12-24 Stunden inkubiert und in Tissue-Tek (Sakura Finetek, Leiden, Niederlande) bei -80°C aufbewahrt.

2.2 Magnetresonanztomographie, Bildverarbeitung und Analyse

Magnetresonanztomographische Bilddaten wurden mittels 1,5 T Intera Scanner (Philips Medical Systems, Eindhoven, Niederlande) gewonnen. Für alle MRT- Untersuchungen wurden T1-gewichtete axiale und sagittale Bilder mit <3 mm Schnittdicke, 0,9 mm intersection gap, 30 cm Messfeld, >3 Echo train length (ETL) und 448×314 Matrix angefertigt.

Die Messungen wurden wie bei Kim et al³ beschrieben, durchgeführt. Die betroffene Ebene wurde auf der operierten Seite in T1 gewichteter, axialer MR-Bildgebung auf Höhe der Facettengelenke, unter Verwendung eines Bildarchivierungs- und Kommunikationssystems, vermessen. Alle Messungen wurden durch zwei erfahrene Wirbelsäulen Chirurgen durchgeführt und jeweils der ermittelte Durchschnittswert für die Analyse der Dicke des Ligamentum Flavum verwendet.

2.3 Bestimmung der Nervenfaserdichte und Zelldichte

Die Gewebeproben wurden mit dem primären Antikörper gegen Substanz P (cat. sc-21715, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany) oder Tyrosinhydroxylase (cat. AB152, Millipore, Darmstadt, Germany) inkubiert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper (Alexa Fluor 546, Invitrogen, Darmstadt, Germany). Zur Kontrolle der positiven Nervenfaserfärbungen wurden zusätzlich jeweils Gewebeproben mit dem entsprechenden Serumantikörper als Negativkontrolle behandelt. Zellkerne wurden mittels 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) angefärbt. Zuletzt wurden die Proben mit Dako fluorescent mounting medium (Dako/Agilent, Santa Clara, CA) präpariert.

Wie auch in einer früheren Studie wurde die Anzahl der sympathischen und Substanz P-positiven sensorischen Nervenfasern pro mm^2 durch Mittelung der ausgezählten angefärbten Nervenfasern aus 17 zufällig ausgewählten hochauflösenden Gesichtsfeldern ($\times 400$) bestimmt. In gleicher Weise wurde die Zelldichte des Gewebes durch Auszählung der DAPI-gefärbten Zellkerne ermittelt.

2.4 Immunhistologische Färbung der Entzündungsmarker

Das Einfärben von Makrophagen wurde folgendermaßen durchgeführt. Nach dem Blocken wurden die Schnitte mit dem primären Antikörper (monoclonal anti-CD163 human IgG/mouse, cat. K01473, MBL, Nagoya, Japan) inkubiert, gefolgt von einem polyklonalen Link Antikörper (cat. D0486, Dako, Santa Clara, CA) und abschließend mit dem APAAP System behandelt (cat. D0651, Dako).

Das Einfärben der Kollagen produzierenden Fibroblasten wurde mit einem Antikörper gegen Prolyl-4-Hydroxylase (cat. PA5-55353, ThermoFisher, Waltham, MA) durchgeführt. Nichtspezifische Bindungsstellen wurden mit Bestandteilen des UltraVision LP Detection System (cat. TL-015-HA, ThermoFisher) geblockt. Die Schnitte wurden nach dem UltraVision LP Detection Protokoll (cat. TL-015-HA, ThermoFisher) behandelt.

Gefäße wurden mit dem primären Antikörper gegen Kollagen Typ IV ((Clone CIV 22, cat. M0785, Dako) und dem Dako REAL Detection System (cat. K5003) eingefärbt. Makrophagendichte und Vaskularisierung der Gewebeschnitte wurden ebenfalls durch Auszählen angefärbter Zellen und Gefäßstrukturen in 17 zufällig ausgewählten Gesichtsfeldern (x 400) bestimmt.

2.5 Statistische Analyse

Alle Daten werden als Mittelwert +/- Standardabweichung angegeben. Box plots zeigen die 10., 25., 50. (Median), 75., und 90. Perzentile an. Die Gruppenmediane wurden mittels nicht-parametrischem Mann-Whitney U Test (IBM SPSS Statistics, version 22; IBM, Chicago) verglichen. Korrelationsanalysen wurden mit *Spearman rank correlation analysis* ausgeführt und lineare Regressionsgeraden sind in den Abbildungen dargestellt. Die multilineare Regression wurde mithilfe von SPSS durchgeführt. Der Vergleich von Häufigkeiten wurde anhand des Fishers Exact Test bestimmt. Als Signifikanzniveau wurde ein p-Wert kleiner 0,05 festgelegt.

3 Ergebnisse

Obwohl das Ligamentum Flavum aus zwei Schichten, einer dorsalen und einer duralen Schicht, besteht, zeigten sich die Ergebnisse diffus über das gesamte Ligamentum Flavum verteilt und nicht auf eine der beiden Schichten begrenzt.

3.1 Dichte der sensorischen und sympathischen Nervenfasern im Ligamentum Flavum

Sensorische oder nozizeptive, Substanz P-positive Nervenfasern sind die wichtigsten Nervenfasern für die Übermittlung von Schmerzreizen ins ZNS. Zudem kann Substanz P proinflammatorische Effekte zeigen, womit Substanz P-positive Nervenfasern einen maßgeblichen Beitrag zur klinischen Problematik der LSS leisten könnte.

Die Studie zeigt, dass die Dichte der nozizeptiven Nervenfasern bei LSS, verglichen mit den Bandscheibenvorfällen der Kontrollgruppe (Abb. 1A), höher ist. Um die Spezifität dieses Ergebnisses für sensorische Nervenfasern zu prüfen, wurden zusätzlich sympathische Nervenfasern angefärbt. Im Gegensatz zu den sensorischen Nervenfasern, zeigten die sympathischen Nervenfasern in beiden Gruppen eine ähnliche Dichte (Abb. 1B).

3.2 Dichte der sensorischen Nervenfasern und klinische Auslesung

Bei Patienten mit LSS korrelierte die Dichte der sensorischen Nervenfasern mit dem Ergebnis des Roland-Morris Score (Abb. 2). In ähnlicher Weise korrelierte die Dichte der sensorischen Nervenfasern mit dem Ergebnis des Oswestry Disability Index (Abb. 3) und dem Depression Subscore der DASS-G (Rank = 0.541, $p = 0.021$). Während diese Ergebnisse für einen direkten Einfluss der lokalen Nervenfaserausprägung auf Schmerzwahrnehmung und funktionelle Einschränkung sprechen, stand die Dichte der sensorischen Nervenfasern in keinem Zusammenhang mit dem Ausmaß an Bein- und Rückenschmerz, der Gehstrecke oder dem Finger-Boden-Abstand.

3.3 Dichte der sensorischen Nervenfasern und inflammatorische Auslesung

Substanz P ist ein proinflammatorischer Faktor in neurogenen Entzündungsprozessen. Folglich könnte man ein erhöhtes Maß an Entzündung im Ligamentum Flavum bei LSS vermuten.

Um eine derartige Assoziation bei LSS-Patienten zu untersuchen, teilten wir die gesamte LSS-Gruppe in zwei Untergruppen nach dem Median der Dichte der sensorischen Nervenfasern ein (Median=0.58 Nervenfasern/mm², 25. Perzentile=0.19, 75. Perzentile=1.31). Diese beiden Gruppen wurden in Hinblick auf einige ausgewählte Entzündungsparameter verglichen. Jedoch zeigten die beiden Untergruppen keinen Unterschied bezüglich der Dichte von aktivierten Fibroblasten (LSS low: 11,2 +/- 5.7 vs. LSS high: 8.4 +/- 4.0/mm²), der Dichte von Makrophagen (überhaupt nicht detektierbar in beiden Gruppen), der Gesamtzelldichte (217.1 +/- 24,8 vs. 239.0 +/- 19.5/mm²) und Gefäßdichte als Zeichen einer verstärkten Neovaskularisierung (2.6 +/- 0.6 vs. 4.4 +/- 0.9/mm²).

In einem direkten Vergleich der Patienten mit LSS und der Patienten mit Bandscheibenvorfall fanden wir keinen Unterschied hinsichtlich histologischer Entzündungszeichen (Tabelle 2). Die Differenz der Zelldichte leitet sich hauptsächlich von den nicht-aktivierten Fibroblasten ab, welche Prolyl-4-Hydroxylase-negativ sind (Tabelle 2).

Zusätzlich wurde eine multilineare Regressionsanalyse mit der Dicke des Ligamentum Flavum als abhängige Variable von Alter, Geschlecht, Körpergewicht- und Größe, Prolyl-4-hydroxylase-positiver Fibroblastendichte, Gesamtzelldichte und Gefäßdichte durchgeführt. Es zeigte sich hierbei kein signifikanter Einfluss der histologischen Parameter auf die Dicke des Ligamentum Flavum.

Diese Daten sprechen gegen eine aktive Entzündung in der LSS Gruppe, trotz verdickter Ligamenta Flava und einer höheren Dichte sensorischer Nervenfasern.

3.4 Unterschiede bei Frauen und Männern mit LSS

Da Frauen normalerweise ein höheres Ergebnis in Schmerz- und Depressionsfragebögen erzielen als Männer, bringt der Vergleich beider Gruppen möglicherweise weitere Erkenntnisse über relevante Einflussfaktoren bei LSS.

Frauen mit LSS zeigten einen höheren Grad an Beinschmerz, an Depression in der DASS-G und einen leicht höheren Roland-Morris-Score als Männer mit LSS, allerdings bei ähnlicher Dicke des Ligamentum Flavum (Tabelle 3). Der direkte Vergleich der Dichte sensorischer Nervenfasern ergab ebenfalls einen höheren Wert für Frauen mit LSS (Abb. 4).

4 Diskussion

In den meisten Untersuchungen wird angenommen, dass die Hypertrophie des Ligamentum Flavum eine entscheidende Rolle bei LSS spielt. Eine verstärkte Proliferation von Kollagen Typ II führt zu fibrocartilaginösen Veränderungen mit Verknöcherung des Ligaments und Einbau von Kalziumkristallen.³² Die degenerativen Veränderungen vermindern die Elastizität des Ligamentum Flavum und führen zu einem Anstieg von Kollagenfasern.³³

Es wurden einige relevante Wachstumsfaktoren im hypertrophierten Ligamentum Flavum identifiziert, wie unter anderem der Transforming growth factor beta 1 (TGF β 1).^{13,34} TGF β 1 spielt eine Rolle in der Kollagenproduktion durch Zellen, die aus dem Ligamentum Flavum stammen.³⁵ Angiopoietin-like Protein 2 ist möglicherweise ein Faktor, der TGF β 1 induziert.³⁶ Mit zunehmender Hypertrophie nimmt die TGF β 1 Expression wieder ab und es scheint, als

habe TGF β 1 nur Einfluss zu Anbeginn des degenerativen Prozesses.³⁷ Ein weiterer Wachstumsfaktor, der Connective tissue growth factor (CTGF), zeigte einen Zusammenhang mit der Dicke des Ligamentum Flavum.³⁸ Andere fanden eine gesteigerte Expression des Basic fibroblast growth factor³⁹ und des Platelet-derived growth factor BB.⁴⁰

4.1 Dichte der sensorischen und sympathischen Nervenfasern im Ligamentum Flavum

Zu diesem Zeitpunkt wurden keine Wachstumsfaktoren, sondern hauptsächlich aktivierte Prolyl-4-Hydroxylase-positive Fibroblasten als Ersatzmarker untersucht. Dieser Marker zeigte keinen Unterschied zwischen lumbaler Spinalkanalstenose und akutem Bandscheibenvorfall. Folglich mag es eventuell kein geeigneter Marker für Hypertrophie oder die Hypertrophie an sich nicht relevant für die Pathogenese sein.

Außerdem stellten einige Studien einen Zusammenhang zwischen Hypertrophie und Entzündungsfaktoren wie der Expression der Cyclooxygenase (COX)-2,⁴¹ oder des chemotaktischen Faktors Fractalkine (CX3CL1)⁴² her. Nur eine Studie beschrieb eine Infiltration mit Makrophagen, verstreuten T-Lymphozyten und Neovaskularisation.⁴³ Selbst nach Verwendung zweier unterschiedlicher Antikörper zur Detektion humaner Makrophagen, war es jedoch nicht möglich diese in den untersuchten Gewebeproben nachzuweisen. Außerdem waren die Zellzahl, als auch die Gefäßdichte bei LSS, verglichen mit akutem Bandscheibenvorfall, ohne Unterschiede, was gegen einen Entzündungsprozess spricht. Die Gründe für die unterschiedlichen Ergebnisse bleiben unklar.

Im Unterschied zu vorherigen Untersuchungen des Ligamentum Flavum, stand hier die sensorische Hyperinnervation mit nozizeptiven Substanz P-positiven Nervenfasern im Vordergrund. Die Studie zeigt eindeutig eine höhere Dichte der sensorischen Fasern bei Patienten mit LSS, als bei Patienten mit akutem Bandscheibenvorfall. Patienten mit Bandscheibenvorfall waren deutlich jünger, was möglicherweise Auswirkungen auf die Ergebnisse haben könnte. Allerdings bleibt die Nervenfaserdichte während des Alterns entweder konstant⁴⁴⁻⁴⁶ oder nimmt ab,^{47,48} es gibt jedoch keine Daten, die eine ansteigende Dichte der Nervenfasern mit dem Alter nachweisen. Von diesem Standpunkt aus hätten die älteren LSS-Patienten im Vergleich zu den jüngeren Kontrollen eine ähnliche oder geringere Nervenfaserdichte haben müssen, indes fand sich das Gegenteil. Ferner könnte das Alter ebenfalls einen Einfluss auf die Dichte der sympathischen Nervenfasern haben. Allerdings spricht dagegen, dass beide Gruppen hier vergleichbare Werte zeigten.

4.2 Dichte der sensorischen Nervenfasern und klinische Auslesung

Wesentlich ist, dass klinische Messungen von Schmerz und funktioneller Beeinträchtigung in Beziehung zur Dichte der sensorischen Nervenfasern bei LSS-Patienten standen. Obwohl die Anzahl der LSS-Patienten relativ klein ist, bestärken diese Ergebnisse die Bedeutung der sensorischen Nervenfaserdichte. Es wird ein weiterer Grund für den multifaktoriell bedingten, lumbalen Rückenschmerz aufgezeigt und könnte teilweise einen Rückgang der Beschwerden im unteren Rücken, für zumindest eine gewisse Zeitspanne nach der Operation, bis zum widerkehrenden Einsproßen sensorischer Nervenfasern, erklären.

4.3 Dichte der sensorischen Nervenfasern und inflammatorische Auslesung

Trotz der höheren sensorischen Nervenfaserdichte, wurde keine bezeichnende Entzündung im Ligamentum Flavum bei LSS festgestellt. Makrophagen als potente Entzündungsmarker, waren nicht vorhanden und auch die Vaskularisierung, sowie die Prolyl-4-Hydroxylase positiven Fibroblasten ergaben keinen Unterschied zwischen LSS und Kontrollgruppe.

Darüber hinaus stand die Dichte der sensorischen Nervenfasern in keiner Beziehung zu einer erhöhten Anzahl aktivierter, Prolyl-4-Hydroxylase-positiver Fibroblasten. Dies spricht bei fehlender Entzündungsreaktion gegen den pro-proliferativen Einfluss von Substanz P auf die Aktivität von Fibroblasten. In vorherigen Studien wurde argumentiert, dass Substanz P und sensorische Hyperinnervation starke pro-proliferative Faktoren sind,^{15,18,19,49} doch scheint dies nur für Krankheiten mit einer entzündlichen Komponente relevant zu sein. Möglicherweise stellt Substanz P nur einen Faktor dar und aber andere, zusätzliche Einflüsse, wie durch Tumornekrosefaktor stimulierte Wachstumsfaktoren, sind für die Proliferation notwendig.

Angesichts dieser Ergebnisse könnte man spekulieren, dass die MRI-gemessene Dicke des Ligamentum Flavum von Proliferation oder Entzündung abhängig ist. Ähnlich zu anderen Studien⁸ bleibt es jedoch fragwürdig, ob die Verdickung des Ligamentum Flavum eine echte Hypertrophie darstellt. Es erscheint eher die Folge einer Stauchung ohne vielseitige histologische Veränderungen zu sein. Die Verdickung könnte somit auch durch eine Ausbeulung oder Fältelung des Ligamentum Flavum aufgrund einer Höhenminderung eines Bewegungssegments entstehen.

4.4 Unterschiede bei Frauen und Männern mit LSS

Die Studie verdeutlichte außerdem die bekannten Unterschiede zwischen den Geschlechtern, mit einer höheren Schmerzwahrnehmung und erhöhten Werten in den Depressions-Scores bei

Frauen (siehe Review ⁵⁰). Wichtig ist, dass dieses Phänomen mit einer höheren Dichte der sensorischen Nervenfasern im Ligamentum Flavum bei Frauen, im Vergleich zu Männern mit LSS, vergesellschaftet ist. Bei Frauen fand sich zudem ebenfalls in der Epidermis eine vergleichbar erhöhte Dichte sensorischer Nervenfasern.⁴⁷ In unserer Untersuchung zeigten die Entzündungsmarker keinerlei Unterschiede zwischen Männern und Frauen. Da Schmerz ein entscheidendes Element in der Entstehung von Depression ist, vor allem bei chronischen Erkrankungen,⁵¹ kann sensorische Hyperinnervation ein wichtiger Vorläufer von depressiven Symptomen bei diesen Patienten sein.

Einige Einschränkungen müssen angeführt werden. In der LSS Gruppe konnten andere Schmerz verursachende Faktoren, wie Modic Zeichen der Deck- und Bodenplatten der Wirbelsäule oder Degeneration der Facettengelenke nicht verglichen werden. Eine weitere Einschränkung stellt der Unterschied der Probengröße (Verhältnis 1:3) zwischen den zwei untersuchten Gruppen dar. Gleichwohl kann die Probengröße mit anderen Studien des Ligamentum Flavum verglichen werden.

5 Fazit

Zusammenfassend zeigt das Ligamentum Flavum bei LSS Zeichen einer sensorischen Hyperinnervation, jedoch ohne Anhalt für eine Entzündungsreaktion oder Zellproliferation. Im klinischen Alltag könnten diese Ergebnisse teilweise den Rückgang der unteren Rückenschmerzen nach operativer Dekompression und Flavektomie ohne Wirbelkörperversteifung und lediglich durch Reduktion des nozizeptiven Outputs des Ligamentum Flavum, erklären. Frauen sind stärker betroffen als Männer und zeigen eher klinische Beeinträchtigung und Schmerzen. Zukünftige Studien müssen sich mit möglichen Wachstumsfaktoren der Nervenfasern auseinandersetzen, die möglicherweise nur durch kontinuierliche Scherkräfte und Stresseinwirkung stimuliert und durch lokal ansässige Zellen, wie Fibroblasten, produziert werden. Wachstumsfaktoren der Nervenzellen könnten zudem eine Zielgruppe für interventionelle Behandlungsansätze sein.

6 Literaturverzeichnis

1. Kim, Y. U. *et al.* Clinical symptoms of lumbar spinal stenosis associated with morphological parameters on magnetic resonance images. *European spine journal : official publication of the European Spine Society, the European Spinal Deformity Society, and the European Section of the Cervical Spine Research Society* **24**, 2236–2243; 10.1007/s00586-015-4197-2 (2015).
2. Yoshiiwa, T., Miyazaki, M., Kawano, M., Ikeda, S. & Tsumura, H. Analysis of the Relationship between Hypertrophy of the Ligamentum Flavum and Lumbar Segmental Motion with Aging Process. *Asian spine journal* **10**, 528–535; 10.4184/asj.2016.10.3.528 (2016).
3. Kim, Y. U. *et al.* The Role of the Ligamentum Flavum Area as a Morphological Parameter of Lumbar Central Spinal Stenosis. *Pain physician* **20**, E419-E424 (2017).
4. Ogikubo, O., Forsberg, L. & Hansson, T. The relationship between the cross-sectional area of the cauda equina and the preoperative symptoms in central lumbar spinal stenosis. *Spine* **32**, 1423-8; discussion 1429; 10.1097/BRS.0b013e318060a5f5 (2007).
5. Thome, C., Borm, W. & Meyer, F. Degenerative lumbar spinal stenosis: current strategies in diagnosis and treatment. *Deutsches Arzteblatt international* **105**, 373–379; 10.3238/arztebl.2008.0373 (2008).
6. Park, C. H., Lee, S. H. & Jung, J. Y. Dural sac cross-sectional area does not correlate with efficacy of percutaneous adhesiolysis in single level lumbar spinal stenosis. *Pain physician* **14**, 377–382 (2011).
7. Benditz, A., Grifka, J. & Matussek, J. Lumbale Spinalkanalstenose. Von der Diagnose bis zur richtigen Therapie. *Zeitschrift für Rheumatologie* **74**, 215-24; quiz 225; 10.1007/s00393-014-1500-2 (2015).
8. Covaro, A. *et al.* Management of degenerative lumbar spinal stenosis. An evidence-based review. *EFORT open reviews* **1**, 267–274; 10.1302/2058-5241.1.000030 (2016).

9. Schünke, M., Schulte, E., Schumacher, U., Voll, M. & Wesker, K. *Allgemeine Anatomie und Bewegungssystem. 182 Tabellen.* 3rd ed. (Thieme, Stuttgart, 2011).
10. Joaquim, A. F., Milano, J. B., Ghizoni, E. & Patel, A. A. Is There a Role for Decompression Alone for Treating Symptomatic Degenerative Lumbar Spondylolisthesis? A Systematic Review. *Clinical spine surgery* **29**, 191–202; 10.1097/BSD.0000000000000357 (2016).
11. Yabe, Y. *et al.* Chondrogenic and fibrotic process in the ligamentum flavum of patients with lumbar spinal canal stenosis. *Spine* **40**, 429–435; 10.1097/BRS.0000000000000795 (2015).
12. Park, J.-B., Lee, J.-K., Park, S.-J. & Riew, K. D. Hypertrophy of ligamentum flavum in lumbar spinal stenosis associated with increased proteinase inhibitor concentration. *The Journal of bone and joint surgery. American volume* **87**, 2750–2757; 10.2106/JBJS.E.00251 (2005).
13. Park, J. B., Chang, H. & Lee, J. K. Quantitative analysis of transforming growth factor-beta 1 in ligamentum flavum of lumbar spinal stenosis and disc herniation. *Spine* **26**, E492-5; 10.1097/00007632-200111010-00007 (2001).
14. Weidler, C. *et al.* Low density of sympathetic nerve fibres and increased density of brain derived neurotrophic factor positive cells in RA synovium. *Annals of the rheumatic diseases* **64**, 13–20; 10.1136/ard.2003.016154 (2005).
15. Straub, R. H. *et al.* Anti-inflammatory role of sympathetic nerves in chronic intestinal inflammation. *Gut* **57**, 911–921; 10.1136/gut.2007.125401 (2008).
16. Schubert, T. E. O., Weidler, C., Lerch, K., Hofstädter, F. & Straub, R. H. Achilles tendinosis is associated with sprouting of substance P positive nerve fibres. *Annals of the rheumatic diseases* **64**, 1083–1086; 10.1136/ard.2004.029876 (2005).
17. Schubert, T. E. O. *et al.* Dupuytren's contracture is associated with sprouting of substance P positive nerve fibres and infiltration by mast cells. *Annals of the rheumatic diseases* **65**, 414–415; 10.1136/ard.2005.044016 (2006).
18. Koeck, F.-X. *et al.* Marked loss of sympathetic nerve fibers in chronic Charcot foot of diabetic origin compared to ankle joint osteoarthritis. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* **27**, 736–741; 10.1002/jor.20807 (2009).
19. Lehner, B. *et al.* Preponderance of sensory versus sympathetic nerve fibers and increased cellularity in the infrapatellar fat pad in anterior knee pain patients after primary

- arthroplasty. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* **26**, 342–350; 10.1002/jor.20498 (2008).
20. Mantyh, P. W. Neurobiology of substance P and the NK1 receptor. *The Journal of clinical psychiatry* **63 Suppl 11**, 6–10 (2002).
21. Basbaum, A. I., Bautista, D. M., Scherrer, G. & Julius, D. Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell* **139**, 267–284; 10.1016/j.cell.2009.09.028 (2009).
22. O'Connor, T. M. *et al.* The role of substance P in inflammatory disease. *Journal of cellular physiology* **201**, 167–180; 10.1002/jcp.20061 (2004).
23. Levine, J. D. *et al.* Intraneuronal substance P contributes to the severity of experimental arthritis. *Science (New York, N.Y.)* **226**, 547–549; 10.1126/science.6208609 (1984).
24. Nilsson, J., Euler, A. M. von & Dalsgaard, C. J. Stimulation of connective tissue cell growth by substance P and substance K. *Nature* **315**, 61–63; 10.1038/315061a0 (1985).
25. Burssens, P. *et al.* Exogenously administered substance P and neutral endopeptidase inhibitors stimulate fibroblast proliferation, angiogenesis and collagen organization during Achilles tendon healing. *Foot & ankle international* **26**, 832–839; 10.1177/107110070502601008 (2005).
26. Steyaert, A., Burssens, P., Forsyth, R. & Vanderstraeten, G. Qualitative analysis of substance P, NK1-receptor and nerve ingrowth in substance P-treated ruptured rat Achilles tendon. *Acta orthopaedica Belgica* **76**, 387–395 (2010).
27. Carlsson, O., Schizas, N., Li, J. & Ackermann, P. W. Substance P injections enhance tissue proliferation and regulate sensory nerve ingrowth in rat tendon repair. *Scandinavian journal of medicine & science in sports* **21**, 562–569; 10.1111/j.1600-0838.2009.01080.x (2011).
28. Fong, G. *et al.* Substance P enhances collagen remodeling and MMP-3 expression by human tenocytes. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* **31**, 91–98; 10.1002/jor.22191 (2013).
29. Mannion, A. F., Junge, A., Grob, D., Dvorak, J. & Fairbank, J. C. T. Development of a German version of the Oswestry Disability Index. Part 2. Sensitivity to change after spinal surgery. *European spine journal : official publication of the European Spine Society, the European Spinal Deformity Society, and the European Section of the Cervical Spine Research Society* **15**, 66–73; 10.1007/s00586-004-0816-z (2006).

30. Macedo, L. G. *et al.* Responsiveness of the 24-, 18- and 11-item versions of the Roland Morris Disability Questionnaire. *European spine journal : official publication of the European Spine Society, the European Spinal Deformity Society, and the European Section of the Cervical Spine Research Society* **20**, 458–463; 10.1007/s00586-010-1608-2 (2011).
31. Nilges, P. & Essau, C. Die Depressions-Angst-Stress-Skalen. Der DASS--ein Screeningverfahren nicht nur für Schmerzpatienten. *Schmerz (Berlin, Germany)* **29**, 649–657; 10.1007/s00482-015-0019-z (2015).
32. Yoshida, M., Shima, K., Taniguchi, Y., Tamaki, T. & Tanaka, T. Hypertrophied ligamentum flavum in lumbar spinal canal stenosis. Pathogenesis and morphologic and immunohistochemical observation. *Spine* **17**, 1353–1360; 10.1097/00007632-199211000-00015 (1992).
33. Kosaka, H. *et al.* Pathomechanism of loss of elasticity and hypertrophy of lumbar ligamentum flavum in elderly patients with lumbar spinal canal stenosis. *Spine* **32**, 2805–2811; 10.1097/BRS.0b013e31815b650f (2007).
34. Rispoli, R., Mastrostefano, R. & Brunelli, F. Morphology and TGF-beta1 Concentration Analysis of Ligamentum Flavum in Patients with Lumbar Canal Stenosis and Lumbar Disc Herniation. *The neuroradiology journal* **23**, 347–353; 10.1177/197140091002300316 (2010).
35. Nakatani, T. *et al.* Mechanical stretching force promotes collagen synthesis by cultured cells from human ligamentum flavum via transforming growth factor- β 1. *J. Orthop. Res.* **20**, 1380–1386; 10.1016/S0736-0266(02)00046-3 (2002).
36. Nakamura, T. *et al.* Angiopoietin-like protein 2 induced by mechanical stress accelerates degeneration and hypertrophy of the ligamentum flavum in lumbar spinal canal stenosis. *PloS one* **9**, e85542; 10.1371/journal.pone.0085542 (2014).
37. Sairyo, K. *et al.* Pathomechanism of ligamentum flavum hypertrophy. A multidisciplinary investigation based on clinical, biomechanical, histologic, and biologic assessments. *Spine* **30**, 2649–2656; 10.1097/01.brs.0000188117.77657.ee (2005).
38. Zhong, Z.-M. *et al.* Hypertrophy of ligamentum flavum in lumbar spine stenosis associated with the increased expression of connective tissue growth factor. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* **29**, 1592–1597; 10.1002/jor.21431 (2011).

39. Honsawek, S. *et al.* Hypertrophy of the ligamentum flavum in lumbar spinal canal stenosis is associated with increased bFGF expression. *International orthopaedics* **37**, 1387–1392; 10.1007/s00264-013-1864-y (2013).
40. Zhang, Y., Chen, J., Zhong, Z.-M., Yang, D. & Zhu, Q. Is platelet-derived growth factor-BB expression proportional to fibrosis in the hypertrophied lumbar ligamentum flavum? *Spine* **35**, E1479-86; 10.1097/BRS.0b013e3181f3d2df (2010).
41. Sairyo, K. *et al.* Lumbar ligamentum flavum hypertrophy is due to accumulation of inflammation-related scar tissue. *Spine* **32**, E340-7; 10.1097/01.brs.0000263407.25009.6e (2007).
42. Oh, I.-S., Suh, D.-W. & Ha, K.-Y. Hypertrophy of the ligament flavum in degenerative lumbar stenosis associated with the increased expression of fractalkine (CX3CL1)/CX3CR1 chemokine. *Connective tissue research* **54**, 380–385; 10.3109/03008207.2013.848199 (2013).
43. Löhr, M. *et al.* Hypertrophy of the lumbar ligamentum flavum is associated with inflammation-related TGF- β expression. *Acta neurochirurgica* **153**, 134–141; 10.1007/s00701-010-0839-7 (2011).
44. Tanaka, K. & Webster, H. D. Myelinated fiber regeneration after crush injury is retarded in sciatic nerves of aging mice. *The Journal of comparative neurology* **308**, 180–187; 10.1002/cne.903080205 (1991).
45. Jimenez-Andrade, J. M. *et al.* The effect of aging on the density of the sensory nerve fiber innervation of bone and acute skeletal pain. *Neurobiology of aging* **33**, 921–932; 10.1016/j.neurobiolaging.2010.08.008 (2012).
46. Liu, Y., Fan, X., Wei, Y., Piao, Z. & Jiang, X. Intraepidermal nerve fiber density of healthy human. *Neurological research* **36**, 911–914; 10.1179/1743132814Y.0000000377 (2014).
47. Gøransson, L. G., Mellgren, S. I., Lindal, S. & Omdal, R. The effect of age and gender on epidermal nerve fiber density. *Neurology* **62**, 774–777; 10.1212/01.wnl.0000113732.41127.8f (2004).
48. Perez, S. D. *et al.* Sympathetic innervation of the spleen in male Brown Norway rats. A longitudinal aging study. *Brain research* **1302**, 106–117; 10.1016/j.brainres.2009.09.012 (2009).

49. Koeck, F. X. *et al.* Predominance of synovial sensory nerve fibers in arthrofibrosis following total knee arthroplasty compared to osteoarthritis of the knee. *Journal of orthopaedic surgery and research* **11**, 25; 10.1186/s13018-016-0359-0 (2016).
50. Bartley, E. J. & Fillingim, R. B. Sex differences in pain. A brief review of clinical and experimental findings. *British journal of anaesthesia* **111**, 52–58; 10.1093/bja/aet127 (2013).
51. Buller, L. T., Best, M. J., Klika, A. K. & Barsoum, W. K. The influence of psychiatric comorbidity on perioperative outcomes following primary total hip and knee arthroplasty; a 17-year analysis of the National Hospital Discharge Survey database. *The Journal of arthroplasty* **30**, 165–170; 10.1016/j.arth.2014.08.034 (2015).

7 Danksagung


An dieser Stelle möchte ich allen meinen größten Dank aussprechen, die mich von der Entstehung bis zur Fertigstellung meiner Doktorarbeit unterstützt haben.

Im Besonderen möchte ich Achim Benditz und Rainer Straub für die ausgezeichnete Betreuung und Anleitung bei der Durchführung der gesamten Arbeit danken. Außerdem möchte ich Luise Rauch Danke sagen, für die zuverlässige Einarbeitung, sowie wertvollen Ratschlag und Diskussion im Laboralltag.

Bei dieser Gelegenheit muss ich mich zudem bei Maresa Watzlowik bedanken, die nicht nur meine Arbeit an dieser Studie durch ihre Unterstützung und wertvollen Beiträge und Gedanken beeinflusst hat.

Auch meinen Eltern, Geschwistern und Freunden danke ich für ihre nicht nachlassende Geduld und ständigen Zusprüche während des Studiums und der Arbeit an dieser Dissertation.

Increased Pain and Sensory Hyperinnervation of the Ligamentum Flavum in Patients With Lumbar Spinal Stenosis

Achim Benditz ¹ Svenja Sprenger,^{1,2} Luise Rauch,² Markus Weber,¹ Joachim Grifka,¹ Rainer H. Straub²

¹Department of Orthopedic Surgery, University Hospital Regensburg, Asklepios Clinic Bad Abbach, Kaiser Karl V. Allee 3, 93077 Bad Abbach, Germany, ²Laboratory of Experimental Rheumatology and Neuroendocrine Immunology, Department of Internal Medicine, University Hospital Regensburg, Regensburg, Bayern, Germany

Received 19 January 2019; accepted 5 February 2019

Published online in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com). DOI 10.1002/jor.24251

ABSTRACT: Nociceptive sensory nerve fibers have never been investigated in the ligamentum flavum (LF) of patients with LSS. The aim was to analyze nociceptive sensory nerve fibers in the ligamentum flavum (LF) of patients with LSS. A prospective study in patients with lumbar spinal stenosis (LSS) undergoing invasive surgical treatment for lumbar spinal stenosis (LSS) with flavectomy was performed. Patients with LSS were subjected to flavectomy and density of sensory and sympathetic nerve fibers, macrophages, vessels, activated fibroblasts, and cells were investigated by immunostaining techniques. A group of patients with acute disc herniation served as control group. We found a higher density of sensory nerve fibers in LSS patients versus controls. These findings support the role of LF in associated low back pain. Density of sensory nerve fibers in LSS, was positively correlated with typical markers of clinical pain and functional disability, but not with LF density of activated fibroblasts. Inflammation as estimated by macrophage infiltration and higher vascularity does not play a marked role in LF in our LSS patients. In the present study, compared to men with LSS, women with LSS demonstrate more pain and depression, and show a higher density of sensory nerve fibers in LF. This study shed new light on nociceptive nerve fibers, which are increased in LSS compared to controls. The findings speak against a strong inflammatory component in LSS. A higher pain levels in women compared to men can be explained by a higher density of nociceptive nerve fibers. © 2019 Orthopaedic Research Society. Published by Wiley Periodicals, Inc. *J Orthop Res* 9999:1–7, 2019.

Keywords: lumbar spinal stenosis; ligamentum flavum; flavectomy; sensory nerve fibers; hypertrophy; pain; substance P

Lumbar spinal stenosis (LSS) is the most common degenerative disorder of the elderly patient.^{1–3} The main symptom is neurogenic intermittent claudication with a decrease in walking distance.⁴ Besides claudication, also low back pain or buttock pain can be observed. LSS is a combination of degenerative changes of facet joints with osteophytes and bulging of degenerative discs.^{5,6} In addition, hypertrophy of the ligamentum flavum (LF) was discussed to play an important role for development of LSS.^{1–3} After conservative treatment is exhausted and in the absence of instability, decompression surgery of the spinal canal is the state-of-the-art therapeutic method in patients with LSS. Especially, leg pain, and claudication can be addressed by this procedure.⁷

Although some studies report on factors related to LF hypertrophy, not much is known about the role of this ligament in LSS.⁸ While some studies have shown that LF thickening is associated with aging, disc degeneration, and LSS,^{9,10} it is still discussed if the thickening of LF is a real hypertrophy or just buckling without histological changes.^{9–13} Moreover, nothing is known about the role of the LF in stimulating pain.

Pain or nociceptive nerve fibers have never been investigated in the LF of patients with LSS.

In recent years, our group studied the phenomenon of nociceptive nerve fiber sprouting, called sensory hyperinnervation. Sensory hyperinnervation was found in different diseases with inflammatory and non-inflammatory origin such as rheumatoid arthritis,¹³ Crohn's disease,¹⁴ Achilles tendinosis,¹⁵ Dupuytren contracture,¹⁶ chronic Charcot foot,¹⁷ and anterior knee pain.¹⁸ One can summarize that sensory hyperinnervation with substance P positive (SP+) nerve fibers is common in many musculoskeletal diseases.

Upon stimulation of the pain fiber nerve ending with various stimuli, an action potential is transmitted to the central nervous system and, in parallel, SP and Calcitonin gene-related peptide (CGRP) are locally released.^{19,20} Release of SP into the microenvironment is a proinflammatory stimulus that contributes to chronic inflammation.^{21,22} SP is a strong stimulator of connective tissue cell growth and function.²³ SP has a strong effect on fibroblast activation and extracellular matrix production leading to increased scar formation.^{24,25} Others demonstrated the pro-proliferative effect of SP injections on fibroblasts in ruptured tendons.²⁶ SP stimulation led to an increased rate of collagen remodeling mediated via its neurokinin-1 receptor.²⁷

From this point of view and with the knowledge that the LF is thickened in LSS, we hypothesized that this ligament demonstrates sensory hyperinnervation with SP+ nerve fibers. In addition, we hypothesized that the LF demonstrates signs of inflammation with leukocyte infiltration, neoangiogenesis, and fibroblast activation.

Conflict of interest: Each author certifies that he or she has no commercial associations (eg, consultancies, stock ownership, equity interest, patent/licensing arrangements, etc) that might pose a conflict of interest in connection with the submitted article.

Ethical review committee statement: The study was approved by the Ethics Committee of the University of Regensburg (12 April 2013, reference no. 13-101-0071). Written informed consent was obtained from all study participants.

Achim Benditz and Svenja Sprenger contributed equally.

Correspondence to: Achim Benditz (T: 09405 18 4828; F: 09405 18 3499; E-mail: achim.benditz@ukr.de)

© 2019 Orthopaedic Research Society. Published by Wiley Periodicals, Inc.

MATERIALS AND METHODS

Patients, Clinical Assessment, and Tissue Samples

The study was approved by the Ethics Committee of the University of Regensburg (12 April 2013, reference no. 13-101-0071). Written informed consent was obtained from all study participants.

A total of 28 samples of 28 patients with LSS and a clear indication for decompression surgery were prospectively collected. Inclusion criteria for patients were as follows: (A) neurogenic claudication, (B) leg pain more than 4 points on the numeric rating scale (NRS, 0–10), (C) pain for more than 6 months, (D) leg pain predominantly to back pain, and (E) definitive LF thickening in magnetic resonance imaging. The control group consisted of eight patients with acute disc herniation and with acute leg pain for less than 2 weeks and no low back pain before.

As a control group, patients with an acute disc herniation were included, as disc herniation occurs in younger people without degenerative changes of the spine and no low back pain, in contrast to LSS that develops over many years due to degenerative changes. In both groups, a total flavectomy was performed. Like others, we consider the disc herniated group to be the ideal control group for LSS.¹⁰

Before surgery, several parameters were determined like back and leg pain using the NRS 0–10, presence of claudication, the German version of the Oswestry Disability Index (ODI),²⁸ the Roland Morris Questionnaire,²⁹ and the German version of the Depression-Anxiety-Stress Questionnaire (DASS21-G).³⁰ The characteristics of patients are given in Table 1.

In both groups, a total en bloc flavectomy was performed during surgery. Ligamentum flavum samples were immediately given into 3.7% formaldehyde in phosphate buffered saline (PBS) and fixed for 24 h. Samples were incubated in PBS with 20% sucrose for additional 12–24 h. The tissue was then bedded in Tissue-Tek (Sakura Finetek, Leiden, The Netherlands) and stored on -80°C .

Magnetic Resonance Imaging, Image Processing and Analysis

Magnetic resonance imaging (MRI) data were obtained on 1.5 T Intera scanner (Philips Medical Systems, Eindhoven, Netherlands). For all MRI examinations, T1-weighted axial and sagittal images with <3 mm slice thickness, 0.9 mm intersection gap, 30 cm field of view, >3 echo train length (ETL), and 448 A~314 matrix were performed.

Measurement was performed as described by Kim et al.³ We measured the operated level on the surgery side in T1-weighted axial MR images at the level of facet joint using a

picture archiving and communications system. All measurements were performed by two experienced spinal surgeons and the mean value was taken for analysis of LF thickness.

Determination of Nerve Fiber Density and Cellular Density

The tissue sections were incubated with the primary antibody against substance P (SP, key neurotransmitter of nociceptive nerve fibers; cat. sc-21715, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany) or tyrosine hydroxylase (key enzyme for sympathetic nerve fibers; cat. AB152, Millipore, Darmstadt, Germany). The slides were then incubated with the secondary antibody (Alexa Fluor 546, Invitrogen, Darmstadt, Germany). We controlled the positive nerve fiber staining by incubating the tissue with control antibodies. Cell nuclei were stained using 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). Finally, the samples were prepared with Dako fluorescent mounting medium (Dako/Agilent, Santa Clara, CA).

As in an earlier study,¹⁸ the numbers of sympathetic and SP+ sensory nerve fibers per mm^2 were determined by averaging the number of stained nerve fibers in 17 randomly selected high power fields of view ($\times 400$). In a similar way, cellular density in the tissue was determined by counting DAPI-stained nuclei in 17 randomly selected high power fields.

Immunostaining of Inflammation Markers—Macrophages, Fibroblasts, and Vessels

Staining for macrophages was performed in the following way. After blocking, slices were incubated with the primary antibody (monoclonal anti-CD163 human IgG/mouse, cat. K01473, MBL, Nagoya, Japan), followed by a polyclonal link antibody (cat. D0486, Dako, Santa Clara, CA), and developed with the APAAP system (cat. D0651, Dako).

Staining of collagen-producing fibroblasts was done using an antibody against prolyl 4-hydroxylase (cat. PA5-55353, ThermoFisher, Waltham, MA). Nonspecific binding sites were blocked with components in the UltraVision LP Detection System (cat. TL-015-HA, ThermoFisher). Slices were developed using the UltraVision LP Detection protocol (cat. TL-015-HA, ThermoFisher).

Vessels were stained with the primary antibody against collagen type IV (Clone CIV 22, cat. M0785, Dako) and the Dako REAL Detection System (cat. K5003). Macrophage density and vascularity were determined by counting stained cells and vessels in 17 randomly selected high power fields ($\times 400$).

Statistical Analyses

All data are given as mean \pm SEM (standard error of the mean). Box plots give the 10th, 25th, 50th (median), 75th,

Table 1. Characteristics of Patients With Disc Herniation and Spinal Stenosis. Data are Given as Means \pm SEM.

	Disc herniation	Spinal stenosis
Number of samples	8	28
Age, yr	41.5 \pm 3.2	75.0 \pm 2.2**
Body weight, kg	88.9 \pm 5.7	81.2 \pm 3.6
Body height, cm	178.4 \pm 2.4	166.4 \pm 2.0**
Duration of symptoms, weeks	1.7 \pm 0.2	83.2 \pm 15.6*
Back pain VAS, pts	8.0 \pm 1.0	6.2 \pm 0.7
Leg pain VAS, pts	9.0 \pm 1.0	7.6 \pm 0.5
Presence of claudication, %	0.0	39.3
Finger-floor distance, cm	35.8 \pm 7.1	21.8 \pm 4.1
Thickness of ligamentum flavum in MRT, mm	3.1 \pm 0.4	4.8 \pm 0.2**

* $p < 0.05$, ** $p < 0.005$. MRT, magnetic resonance imaging; VAS, visual analogue scale.

and 90th percentile. We compared group medians by the non-parametric Mann-Whitney U test (IBM SPSS Statistics, version 22; IBM, Chicago). Correlation analyses were carried out by Spearman rank correlation analysis and linear regression lines are given in figures. Multilinear regression was performed using SPSS. Comparison of frequencies were done using Fisher's exact test. A *p*-value below 0.05 was the significance level.

RESULTS

Although the LF consists of two layers, the dorsal and the dural layer, the findings were diffusely all over the LF and not limited to one of those.

Density of Sensory and Sympathetic Nerve Fibers in the Ligamentum Flavum

Sensory or nociceptive, SP+ nerve fibers are the most important nerve fibers for pain transmission to the central nervous system, and locally, SP can have proinflammatory effects. Thus, SP+ nerve fibers may be a critical element to understand some clinical problems in LSS.

The study demonstrates that density of nociceptive nerve fibers is higher in LSS compared to disc herniation controls (Fig. 1A). In order to test specificity of this result for sensory nerve fibers, sympathetic nerve fibers were additionally stained. In contrast to sensory nerve fibers, sympathetic nerve fiber density was similar in both groups (Fig. 1B).

Density of Sensory Nerve Fibers and Clinical Readouts

In LSS patients, density of sensory nerve fibers was positively correlated with the result of the Roland-Morris score (Fig. 2). Similarly, density of sensory nerve fibers was positively correlated with the result of the Oswestry Disability Index (Fig. 3) and the depression subscore of the DASS-G (Rank = 0.541, *p* = 0.021). While these results speak for a direct influence of local nerve fiber supply on pain perception and functional disability, sensory nerve fiber density was not correlated with measure of pain from legs and back, walking distance, or finger-floor distance (data not shown).

Density of Sensory Nerve Fibers and Inflammatory Readouts

SP is a proinflammatory factor in neurogenic inflammation. Thus, one might expect a higher degree of inflammation in the LF.

In order to study such an association in LSS patients, we separated the entire LSS group into two subgroups according to the median of the density of sensory nerve fibers (median = 0.58 nerve fibers/mm², 25th percentile = 0.19, 75th percentile = 1.31). The two groups were compared for some parameters of inflammation. However, the two subgroups did not differ in density of active fibroblasts stained for prolyl-4-hydroxylase (LSS low: 11.2 ± 5.7 vs. LSS high: 8.4 ± 4.0/mm²), density of macrophages (not detectable at all in both groups), density of all cells (217.1 ± 24.8 vs. 239.0 ± 19.5/mm²), and density of vessels as a sign of neoangiogenesis (2.6 ± 0.6 vs. 4.4 ± 0.9/mm²).

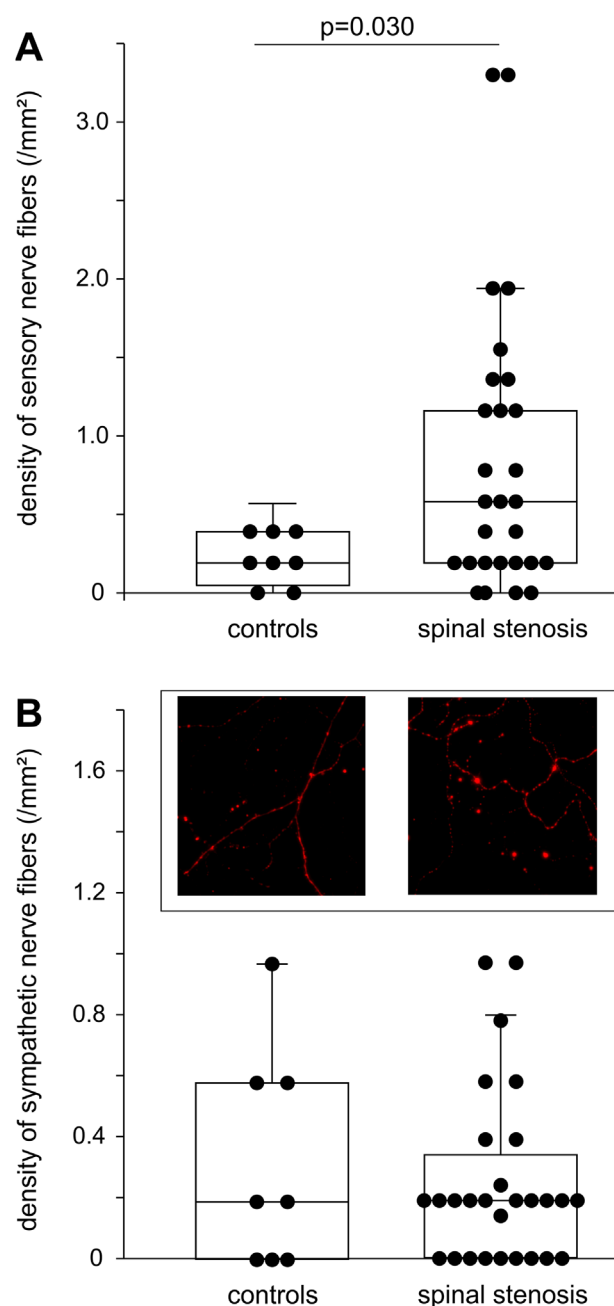


Figure 1. Density of sensory and sympathetic nerve fibers in control patient with acute disc herniation and lumbar spinal stenosis. In all panels, data are presented as box plots with the 10th, 25th, 50th (median), 75th, and 90th percentiles. Each symbol represents one patient sample. In panel B, the inlays demonstrate two examples of substance P nerve fiber staining, magnification 200 \times .

In a direct comparison of patients with LSS and disc herniation, we did not find a difference for histological signs of inflammation (Table 2). The difference in cellular density is mainly derived from non-activated fibroblasts, which are not positive for prolyl-4-hydroxylase (Table 2).

In addition, we performed a multilinear regression analysis with LF thickness as the dependent variable and age, sex, body weight, body height, prolyl-4-hydroxylase+ fibroblast density, density of all cells,

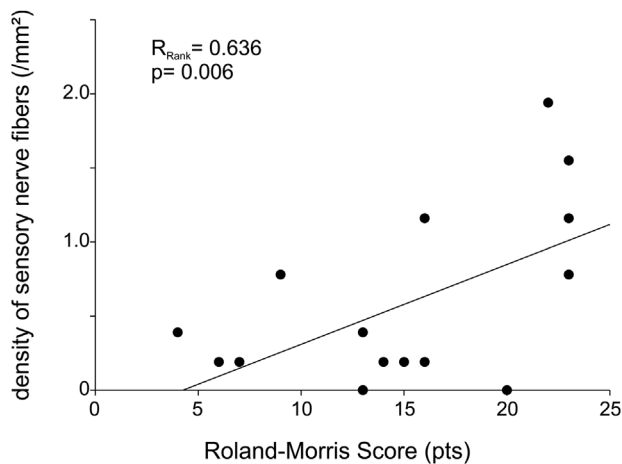


Figure 2. Interrelation of the Roland-Morris score and density of sensory nerve fibers. The Spearman rank correlation and its p -value are given. The linear regression line is shown.

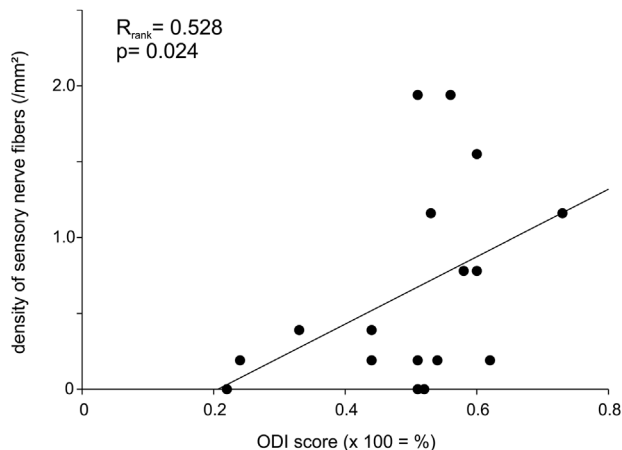


Figure 3. Interrelation of the Oswestry Disability Index and density of sensory nerve fibers. The Spearman rank correlation and its p -value are given. The linear regression line is shown.

and density of vessels as dependent variables. This analysis did not yield any significant influence of histological parameters on LF thickness.

These data speak against active inflammation in our LSS group despite thickened LF and higher density of sensory nerve fibers therein.

Gender-Dependent Differences in Women and Men With LSS

Since women typically score higher in pain and depression questionnaires than men,³¹ the comparison

of the two groups might give some more information on relevant factors in LSS.

Women with LSS compared to men with LSS, had more leg pain, a higher depression score in the DASS-G, and a tentatively higher Roland-Morris score, but thickness of the LF was similar (Table 3). The direct comparison of density of sensory nerve fibers demonstrated a higher value for women compared to men with LSS (Fig. 4).

DISCUSSION

In most investigations, hypertrophy of the LF is thought to play a critical role. Increased proliferation of collagen type II leads to fibrocartilaginous changes with ossification of the ligament and incorporation of calcium crystals.³² The degenerative changes decrease elasticity of the LF, loss of elastic fibers, and an increase of collagen fibers.³³

Some relevant growth factors were identified in hypertrophy of the ligament such as transforming growth factor beta 1 (TGF β 1),^{10,34} and TGF β 1 plays a role in collagen generation of cells derived from LF.³⁵ Angiopoietin-like protein 2 might be a factor that induces TGF β 1.³⁶ With increasing hypertrophy, the TGF β 1 expression decreases again, and it seems that TGF β 1 only exerts an influence at the beginning of the degenerative process.³⁷ Another growth factor, connective tissue growth factor (CTGF) was related to LF thickness.³⁸ Others found increased expression of basic fibroblast growth factor³⁹ and platelet-derived growth factor BB.⁴⁰

Density of Sensory and Sympathetic Nerve Fibers in the Ligamentum Flavum

We have not studied growth factors at this time but mainly focused on activated prolyl-4-hydroxylase-positive fibroblasts as a substitute marker. This marker was not different in LSS versus acute disc herniation. Thus, it might not be a good hypertrophy marker or hypertrophy is not relevant.

In addition, some study groups related hypertrophy to inflammatory factors such as cyclooxygenase (COX)-2 expression,⁴¹ or the chemotactic factor fractalkine (CX3CL1).⁴² Only one study described infiltration with macrophages, scattered T lymphocytes, and neovascularization.⁴³ Using two different antibodies for human macrophages, we were not able to detect macrophages in our samples. In addition, in our study, cellularity and density of vessels was not different in LSS

Table 2. Histological Inflammation Characteristics of Patients With Disc Herniation and Spinal Stenosis. Data Are Given as Means \pm SEM.

	Disc herniation	Spinal stenosis
Cellular density per mm ²	373.6 \pm 42.0	229.7 \pm 15.2*
Prolyl-4-hydroxylase+ fibroblasts per mm ²	6.5 \pm 3.7	21.6 \pm 5.6
Macrophages per mm ²	0 \pm 0	0 \pm 0
Vessels per mm ²	2.0 \pm 0.7	3.6 \pm 0.6

* $p < 0.005$ (these are mainly fibroblasts that are not activated since only prolyl-4-hydroxylase-positive fibroblasts are activated).

Table 3. Comparison of Women and Men With LSS.

	Women	Men
Number of samples	14	14
Age, yr	76.2 ± 3.7	73.8 ± 2.5
Body weight, kg	78.3 ± 5.8	83.5 ± 4.7
Body height, cm	162.2 ± 2.0	169.8 ± 2.8
Back pain NRS, pts	7.0 ± 1.1	5.4 ± 0.9
Leg pain NRS, pts	8.9 ± 0.4	6.3 ± 0.7***
DAS-depression, pts	14.4 ± 2.1	5.2 ± 1.4***
DAS-anxiety, pts	8.8 ± 2.3	4.3 ± 1.3
DAS-stress, pts	13.0 ± 2.0	7.0 ± 1.4
Roland-Morris score, pts	17.6 ± 2.3	12.8 ± 1.6*
ODI score, %	58 ± 3	44 ± 5
Thickness of LF in MRI, mm	4.7 ± 0.3	4.8 ± 0.2

* $p < 0.10$, *** $p < 0.005$. DAS, depression-anxiety-stress score (DASS21-G); MRI, magnetic resonance imaging; NRS, numeric rating scale; LF, ligamentum flavum. Data are Given as Means ± SEM.

compared to acute disc herniation, which speaks against inflammation. The reasons for the different results remain unclear.

In contrast to prior studies on the LF, we focused on sensory hyperinnervation with nociceptive SP-positive nerve fibers. The study clearly shows a higher density of sensory nerve fibers in patients with LSS compared to patients with an acute disc herniation. Patients with disc herniation were clearly younger than patients with LSS, and this might interfere with our results. However, during aging, nerve fiber density remains constant^{44–46} or decreases,^{47,48} but there are no data that demonstrate increased nerve fiber density

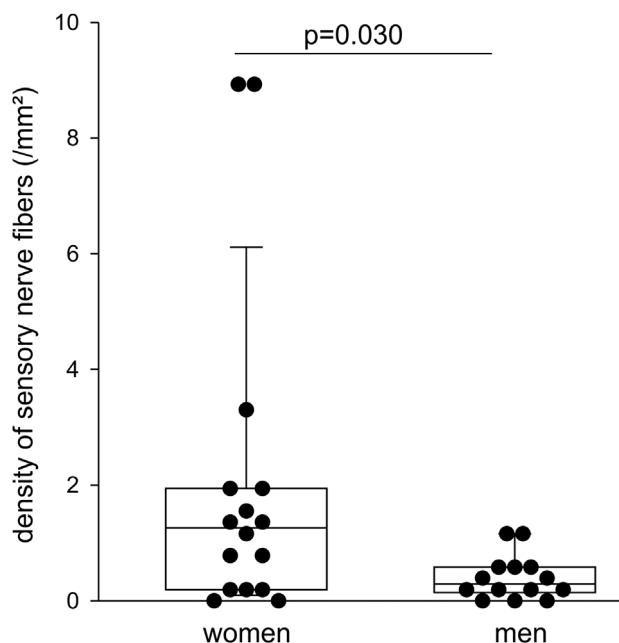


Figure 4. Density of sensory nerve fibers in women and men with lumbar spinal stenosis. In all panels, data are presented as box plots with the 10th, 25th, 50th (median), 75th, and 90th percentiles. Each symbol represents one patient sample.

during aging. From this point of view, the older LSS patients compared to the younger controls should have had a similar or a lower density of nerve fibers, but the opposite was found. Furthermore, density of sympathetic nerve fibers might also be affected by age, but the two groups had comparable levels, which speaks against an influence of age.

Density of Sensory Nerve Fibers and Clinical Readouts

Importantly, clinical measures of pain and functional disability were related to the density of sensory nerve fibers in LSS patients. Although the numbers of LSS patients is relatively small, these results strengthen the importance of sensory nerve fiber density. These findings are another factor of the multifactorial low back pain and might partly explain a reduction of low back pain at least for a period of time after surgery (the time until re-entering of sensory nerve fibers).

Density of Sensory Nerve Fibers and Inflammatory Readouts

Despite the higher sensory nerve fiber density, we did not observe marked inflammation in the LF in LSS. Macrophages that are strong markers of inflammation were not present and vascularity as well as prolyl-4-hydroxylase-positive fibroblasts did not differ in LSS versus disc herniation.

In addition, density of sensory nerve fibers was not related to a higher number of active, prolyl-4-hydroxylase-positive fibroblasts, which speaks against the pro-proliferative influence of SP on fibroblast activity when inflammation is absent. In our recent studies, we argued that SP and sensory hyperinnervation are strong pro-proliferative factors,^{14,17,18,49} but this seems to be relevant only in diseases with an inflammatory component. It might well be that SP is only one factor but additional factors like tumor necrosis factor—stimulated growth factors are needed for proliferation. Proinflammatory cytokines were not described in the LF of LSS patients.

In the light of these results, one might speculate whether MRI-measured thickness of the LF depends on proliferation or inflammation. Similar as in other studies,⁸ it is questionable whether thickening of the LF is a real hypertrophy, because it looks more like the result of buckling without many histological changes. Thickening might be a result of bulging due to loss of height of the movement segment.

Gender-Dependent Differences in Women and Men With LSS

The study also demonstrated the known difference in women versus men with a higher pain perception and elevated depression scores in women (reviewed in ref.³¹). Importantly, this phenomenon was accompanied by a higher density of sensory nerve fibers in the LF of LSS women compared to LSS men. In the epidermis, a similar higher density of sensory nerve fibers was detected in women compared to men.⁴⁷ In our study, inflammatory markers were not different

between women and men (data not shown). Since pain is a critical element to induce depression, particularly in chronic conditions,⁵⁰ sensory hyperinnervation can be an important forerunner of depressive symptoms in these patients.

Some limitations have to be mentioned. In the LSS group other pain generators as Modic changes in the endplates or facet joint degeneration could not be compared. Another limitation is the sample size difference (1:3 ratio) between the two groups, nevertheless the sample size can be compared to other LF studies.

CONCLUSIONS

In summary, in LSS, the LF shows signs of sensory hyperinnervation but without signs of inflammation or proliferation of cells. In clinical routine, these findings might partly explain the phenomenon of reduced low back pain after decompression and flavectomy without fusion, just by reducing the nociceptive output from the LF. Women are more affected than man and show more clinical pain and disability. Future studies need to address possible nerve growth factors that might be stimulated by continuous shear stress and produced by local cells (fibroblast). Nerve growth factors can be a target of intervention.

AUTHORS' CONTRIBUTION

AB, SS, and RS made substantial contributions to research design. AB, MW, SS, and LR made contributions to data acquisition. AB, SS, RS, JG, and MW made analysis and interpretation of data; All authors helped drafting the paper and revising it critically; All authors have read and approved the final submitted manuscript.

REFERENCES

- Kim YU, Kong Y-GG, Lee J, et al. 2015. Clinical symptoms of lumbar spinal stenosis associated with morphological parameters on magnetic resonance images. *Eur Spine J* 24:2236–2243.
- Yoshiiwa T, Miyazaki M, Kawano M, et al. 2016. Analysis of the relationship between hypertrophy of the ligamentum flavum and lumbar segmental motion with aging process. *Asian Spine J* 10:528–535.
- Kim YU, Park JY, Kim DH, et al. 2017. The role of the ligamentum flavum area as a morphological parameter of lumbar central spinal stenosis. *Pain Physician* 20:E419–E424.
- Ogikubo O, Forsberg L, Hansson T. 2007. The relationship between the cross-sectional area of the cauda equina and the preoperative symptoms in central lumbar spinal stenosis. *Spine (PhilaPa 1976)* 32:1423–1428. discussion 1429.
- Park CH, Lee SH, Jung JY. 2011. Dural sac cross-sectional area does not correlate with efficacy of percutaneous adhesiolysis in single level lumbar spinal stenosis. *Pain Physician* 14:377–382.
- Benditz A, Grifka J, Matussek J. 2015. Lumbar spinal stenosis: from diagnosis to correct therapy. *Z Rheumatol* 74:215–224.
- Joaquim AF, Milano JB, Ghizoni E, et al. 2015. Is there a role for decompression alone for treating symptomatic degenerative lumbar spondylolisthesis? a systematic review. *J Spinal Disord Tech* 29:191–202.
- Yabe Y, Hagiwara Y, Ando A, et al. 2015. Chondrogenic and fibrotic process in the ligamentum flavum of patients with lumbar spinal canal stenosis. *Spine (PhilaPa 1976)* 40:429–435.
- Park J-BB, Lee J-KK, Park S-JJ, et al. 2005. Hypertrophy of ligamentum flavum in lumbar spinal stenosis associated with increased proteinase inhibitor concentration. *J Bone Jt. Surg Am* 87:2750–2757.
- Park JB, Chang H, Lee JK. 2001. Quantitative analysis of transforming growth factor-beta 1 in ligamentum flavum of lumbar spinal stenosis and disc herniation. *Spine (PhilaPa 1976)* 26:E492–E495.
- Altinkaya N, Yildirim T, Demir S, et al. 2011. Factors associated with the thickness of the ligamentum flavum: is ligamentum flavum thickening due to hypertrophy or buckling? *Spine (Phila Pa 1976)* 36:E1093–E1097.
- Yabe Y, Hagiwara Y, Tsuchiya M, et al. 2015. Decreased elastic fibers and increased proteoglycans in the ligamentum flavum of patients with lumbar spinal canal stenosis. *J Orthop Res* 34:1241–1247.
- Weidler C, Holzer C, Harbuz M, et al. 2005. Low density of sympathetic nerve fibers and increased density of brain derived neurotrophic factor positive cells in RA synovium. *Ann Rheum Dis* 64:13–20.
- Straub RH, Grum F, Strauch U, et al. 2008. Anti-inflammatory role of sympathetic nerves in chronic intestinal inflammation. *Gut* 57:911–921.
- Schubert TEO, Weidler C, Lerch K, et al. 2005. Achilles tendinosis is associated with sprouting of substance P positive nerve fibers. *Ann Rheum Dis* 64:1083–1086.
- Schubert TEO, Weidler C, Borisch N, et al. 2006. Dupuytren's contracture is associated with sprouting of substance P positive nerve fibers and infiltration by mast cells. *Ann Rheum Dis* 65:414–415.
- Koeck F-XX, Bobrik V, Fassold A, et al. 2009. Marked loss of sympathetic nerve fibers in chronic Charcot foot of diabetic origin compared to ankle joint osteoarthritis. *J Orthop Res* 27:736–741.
- Lehner B, Koeck FX, Capellino S, et al. 2008. Preponderance of sensory versus sympathetic nerve fibers and increased cellularity in the infrapatellar fat pad in anterior knee pain patients after primary arthroplasty. *J Orthop Res* 26:342–350.
- Mantyh PW. 2002. Neurobiology of substance P and the NK1 receptor. *J Clin Psychiatry* 63:6–10.
- Basbaum AI, Bautista DM, Scherrer G, et al. 2009. Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell* 139:267–284.
- O'Connor TM, O'Connell J, O'Brien DI, et al. 2004. The role of substance P in inflammatory disease. *J Cell Physiol* 201:167–180.
- Levine JD, Clark RON, Devor M, et al. 1984. Intraneuronal substance P contributes to the severity of experimental arthritis. *Science (80-)* 226:547–549.
- Nilsson J, Von Euler AM, Dalsgaard CJ. 1985. Stimulation of connective tissue cell growth by substance P and substance K. *Nature* 315:61–63.
- Burssens P, Steyaert A, Forsyth R, et al. 2005. Exogenously administered substance P and neutral endopeptidase inhibitors stimulate fibroblast proliferation, angiogenesis and collagen organization during Achilles tendon healing. *Foot Ankle Int* 26:832–839.
- Steyaert A, Burssens P, Forsyth R, et al. 2010. Qualitative analysis of substance P, NK1-receptor and nerve ingrowth in substance P-treated ruptured rat achilles tendon. *Acta Orthop Belg* 76:387–395.
- Carlsson O, Schizas N, Li J, et al. 2011. Substance P injections enhance tissue proliferation and regulate sensory nerve ingrowth in rat tendon repair. *Scand J Med Sci Sport* 21:562–569.

27. Fong G, Backman LJ, Hart DA, et al. 2013. Substance P enhances collagen remodeling and MMP-3 expression by human tenocytes. *J Orthop Res* 31:91–98.
28. Mannion A, Junge A, Grob D, et al. 2006. Development of a German version of the Oswestry Disability Index. Part 2: sensitivity to change after spinal surgery. *Eur Spine J* 15:66–73. <https://doi.org/10.1007/s00586-004-0816-z>.
29. Macedo LG, Maher CG, Latimer J, et al. 2011. Responsiveness of the 24-, 18- and 11-item versions of the roland morris disability questionnaire. *Eur Spine J* 20:458–463. <http://www.springerlink.com/content/y3v611282887g65v/>.
30. Nilges P, Essau C. 2015. Depression, anxiety and stress scales. *Der Schmerz* 29:649–657.
31. Bartley EJ, Fillingim RB. 2013. Sex differences in pain: a brief review of clinical and experimental findings. *Br J Anaesth* 111:52–58.
32. Yoshida M, Shima K, Taniguchi Y, et al. 1992. Hypertrophied ligamentum flavum in lumbar spinal canal stenosis: pathogenesis and morphologic and immunohistochemical observation. *Spine (Phila Pa 1976)* 17:1353–1360.
33. Kosaka H, Sairyo K, Biyani A, et al. 2007. Pathomechanism of loss of elasticity and hypertrophy of lumbar ligamentum flavum in elderly patients with lumbar spinal canal stenosis. *Spine (Phila Pa 1976)* 32:2805–2811.
34. Rispoli R, Mastrostefano R, Brunelli F. 2010. Morphology and TGF-beta1 concentration analysis of ligamentum flavum in patients with lumbar canal stenosis and lumbar disc herniation. *Neuroradiol J* 23:347–353.
35. Nakatani T, Marui T, Hitora T, et al. 2002. Mechanical stretching force promotes collagen synthesis by cultured cells from human ligamentum flavum via transforming growth factor-beta1. *J Orthop Res* 20:1380–1386.
36. Nakamura T, Okada T, Endo M, et al. 2014. Angiopoietin-like protein 2 induced by mechanical stress accelerates degeneration and hypertrophy of the ligamentum flavum in lumbar spinal canal stenosis. *PLoS ONE* 9:e85542.
37. Sairyo K, Biyani A, Goel V, et al. 2005. Pathomechanism of ligamentum flavum hypertrophy: a multidisciplinary investigation based on clinical, biomechanical, histologic, and biologic assessments. *Spine (Phila Pa 1976)* 30:2649–2656.
38. Zhong Z-MM, Zha D-SS, Xiao W-DD, et al. 2011. Hypertrophy of ligamentum flavum in lumbar spine stenosis associated with the increased expression of connective tissue growth factor. *J Orthop Res* 29:1592–1597.
39. Honsawek S, Poonpukdee J, Chalermpanpipat C, et al. 2013. Hypertrophy of the ligamentum flavum in lumbar spinal canal stenosis is associated with increased bFGF expression. *Int Orthop* 37:1387–1392.
40. Zhang Y, Chen J, Zhong Z-MM, et al. 2010. Is platelet-derived growth factor-BB expression proportional to fibrosis in the hypertrophied lumbar ligamentum flavum? *Spine (Phila Pa 1976)* 35:E1479–E1486.
41. Sairyo K, Biyani A, Goel VK, et al. 2007. Lumbar ligamentum flavum hypertrophy is due to accumulation of inflammation-related scar tissue. *Spine (Phila Pa 1976)* 32:E340–E347.
42. Oh I-SS, Suh D-WW, Ha K-YY. 2013. Hypertrophy of the ligament flavum in degenerative lumbar stenosis associated with the increased expression of fractalkine (CX3CL1)/CX3CR1 chemokine. *Connect Tissue Res* 54:380–385.
43. Löhr M, Hampl JA, Lee JY, et al. 2011. Hypertrophy of the lumbar ligamentum flavum is associated with inflammation-related TGF- β expression. *Acta Neurochir* 153:134–141.
44. Tanaka K, Webster HD. 1991. Myelinated fiber regeneration after crush injury is retarded in sciatic nerves of aging mice. *J Comp Neurol* 308:180–187.
45. Jimenez-Andrade JM, Mantyh WG, Bloom AP, et al. 2012. The effect of aging on the density of the sensory nerve fiber innervation of bone and acute skeletal pain. *Neurobiol Aging* 33:921–932.
46. Liu Y, Fan X, Wei Y, et al. 2014. Intraepidermal nerve fiber density of healthy human. *Neurol Res* 36:911–914.
47. Gøransson LG, Mellgren SI, Lindal S, et al. 2004. The effect of age and gender on epidermal nerve fiber density. *Neurology* 62:774–777.
48. Perez SD, Silva D, Millar AB, et al. 2009. Sympathetic innervation of the spleen in male Brown Norway rats: a longitudinal aging study. *Brain Res* 1302:106–117.
49. Koeck FX, Schmitt M, Baier C, et al. 2016. Predominance of synovial sensory nerve fibers in arthrofibrosis following total knee arthroplasty compared to osteoarthritis of the knee. *J Orthop Surg Res* 11:25.
50. Buller LT, Best MJ, Klika AK, et al. 2015. The influence of psychiatric comorbidity on perioperative outcomes following primary total hip and knee arthroplasty; a 17-year analysis of the National Hospital Discharge Survey database. *J Arthroplast* 30:165–170.