

Aus dem Zentrum für Orthopädie und Unfallchirurgie der Universitätsmedizin der
Johannes Gutenberg-Universität Mainz

**Einfluss von Schädel-Hirn-Traumata und Echinomycin auf heterotope
Ossifikation und Angiogenese nach Achillessehnen-Tenotomie**

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
der Universitätsmedizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz
vorgelegt von

Anna Christin Hackemann
aus Worms

Mainz, 2021

Wissenschaftlicher Vorstand: (in der elektronischen Version entfernt)

1. Gutachter: (in der elektronischen Version entfernt)

2. Gutachter: (in der elektronischen Version entfernt)

Tag der Promotion: 06. Juli 2021

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
2. Literaturdiskussion	3
2.1. Heterotope Ossifikation	3
2.1.1. Definition.....	3
2.1.2. Ätiologie und Pathophysiologie.....	5
2.1.3. Klinisches Erscheinungsbild und Diagnostik.....	8
2.1.4. Prävention und Therapie	10
2.1.5. Tiermodelle.....	15
2.2. Schädel-Hirn-Trauma	18
2.2.1. Definition.....	18
2.2.2. Primäre und Sekundäre Schädigung nach Schädel-Hirn-Trauma	19
2.2.3. Einfluss auf heterotope Ossifikation.....	20
2.2.4. Ziel der Arbeit	21
3. Material und Methoden.....	22
3.1. Material	22
3.1.1. Tiere	22
3.1.2. Pharmazeutika.....	22
3.1.3. Operationsmaterial	23
3.1.4. Bildgebende Diagnostik	23
3.1.5. Bildbearbeitung und Auswertung	23
3.2. Methoden	23
3.2.1. Einteilung.....	23
3.2.2. Narkose und perioperatives Management	24
3.2.3. Tenotomie.....	25
3.2.4. Schädel-Hirn-Trauma	26
3.2.5. Echinomycin-Injektion.....	28

3.2.6.	Bildgebende Diagnostik	28
3.2.7.	Digitale Auswertung.....	29
3.2.8.	Statistische Analyse.....	34
4.	Ergebnisse	35
4.1.	Einfluss von Schädel-Hirn-Trauma auf heterotope Ossifikation	36
4.1.1.	Fläche im Röntgenbild	36
4.1.2.	Volumen und Dichte in der μ CT.....	44
4.1.3.	Angiogenese in der μ CT	46
4.2.	Einfluss von Echinomycin auf heterotope Ossifikation	50
4.2.1.	Fläche im Röntgenbild	50
4.2.2.	Volumen und Dichte in der μ CT.....	54
4.2.3.	Angiogenese in der μ CT	56
4.3.	Einfluss von Echinomycin auf heterotope Ossifikation unter Schädel-Hirn-Trauma	60
4.3.1.	Fläche im Röntgenbild	60
4.3.2.	Volumen und Dichte in der μ CT.....	65
4.3.3.	Angiogenese in der μ -CT.....	67
5.	Diskussion.....	71
5.1.	Methoden und Vorgehensweise.....	71
5.1.1.	Versuchsaufbau.....	71
5.1.2.	Achillessehnen -Tenotomie	71
5.1.3.	Controlled cortical impact	72
5.1.4.	Echinomycin-Injektion.....	72
5.1.5.	Bildanalyse	73
5.2.	Einfluss von Schädel-Hirn-Trauma auf heterotope Ossifikation	74
5.2.1.	Pathophysiologie	74
5.2.2.	Fläche, Volumen und Dichte.....	76
5.2.3.	Angiogenese.....	78

5.3. Einfluss von Echinomycin auf heterotope Ossifikation	79
5.3.1. Pathophysiologie	79
5.3.2. Fläche, Volumen und Dichte.....	80
5.3.3. Angiogenese.....	81
5.4. Einfluss von Echinomycin auf heterotope Ossifikation mit Schädel-Hirn-Trauma	82
5.4.1. Fläche, Volumen und Dichte.....	82
5.4.2. Angiogenese.....	83
6. Ergebnis.....	84
7. Danksagung	85
8. Curriculum Vitae.....	86
9. Literaturverzeichnis	88

Abkürzungsverzeichnis

ACR	Activin Rezeptor
ALK	Activin-like kinase
ATRA	all-trans retinoic acid
BHS	Blut-Hirn-Schranke
BMP	bone morphogentic protein
CCI	controlled cortical impact
COX	cyclooxygenase
CT	Computertomographie
DMSO	Dimethylsulfoxid
EC	Echinomycin
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FOP	fibrodysplasia ossificans progressiva
GNAS	guanine nucleotide binding protein alpha stimulating activity polypeptide
HIF-1 α	hypoxia-inducable factor -1 alpha
HLA	human leukocyte antigen
HO	heterotope Ossifikation
HU	Hounsfield unit
IL	Interleukine
mTOR	mammalian target of rapamycin
MRT	Magnetresonanztomographie
NHO	neurogene heterotope Ossifikation
NSAR	nicht steroidale Antirheumatika

OP	Operation
OSN	oncostatin M
PDGFR-alpha	platelet-derived growth factor- alpha
PI3K	Phosphatidylinositol-3-kinase
POH	progressive osseous heteeroplasia
RAR	retinoic acid receptor
RUNX	RUNT related transkription factor
SHT	Schädel-Hirn-Trauma
SMAD	small body sized, mothers against decapentaplegic
SOX	sex determining region Y
TEP	totale Endoprothese
TGF	transforming growth factor
VEGF	vascular endothelian growth factor
VHL	von-Hippel-Lindau Tumorsupressor

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: 17-Jähriger Patient mit FOP und thorakalem Insuffizienz-Syndrom (18)	4
Abbildung 2: Molekulargenetische Einflussfaktoren auf die Osteogenese (32)	8
Abbildung 3: Röntgenaufnahme vom Unterschenkel einer Maus nach Tenotomie der Achillessehne, Pfeile: heterotope Ossifikation	9
Abbildung 4: CT-Aufnahme Unterschenkel einer Maus. lila: heterotope Ossifikation grün: Knochen und Gefäße	9
Abbildung 5: 3D Rekonstruktion einer CT-Aufnahme des Hüftgelenkes zeigt die räumliche Nähe der Femoralgefäße zur heterotopen Ossifikation (110)	14
Abbildung 6: Molekulargenetische Prozesse nach Schädel-Hirn-Trauma (141)	20
Abbildung 7: Einteilung der Versuchstiere im Studiendesign	24
Abbildung 8: operative Tenotomie. a) laterale Schnittführung b) Sicht auf die Achillessehne c) Freipräparieren der Achillessehne d) Durchtrennung der Achillessehne e) Sichtkontrolle f) Verschluss durch Einzelknopfnähte	26
Abbildung 9: operative Beibringung eines Schädel-Hirn-Traumas a) controlled cortical impact b) Einspannen in Stabilisationsvorrichtung c) Hautschnitt und Markierung der Tapanationsstelle d) Freipräparierung e) Durchbohren der Trepanationsstelle f) Blick auf intakte Dura mater g) Positionierung des CCI-Gerätes h) Stillen der Blutung i) Aufbringung des abgenommenen Schädelknochens j) Fixierung mittels Gewebekleber k) Blick auf verschlossenes Schädeldach	28
Abbildung 10: Tiere nach Perfusion mit Microfil® a) Situs b) Schädel	29
Abbildung 11: Erstellen einer Skalierung in Pixel/mm in ImageJ	30
Abbildung 12: Röntgen des Unterschenkels von Versuchstier 58 am 56. Tag post-OP a) nativ b) nach Bearbeitung und Ausmessung mittels ImageJ	31
Abbildung 13: Schaltfläche Mimics Medical	32
Abbildung 14: Unterschenkel von Versuchstier 27 nach Tag 56 post-OP a) 3D Rekonstruktion Knochen und Gefäße b) HO c) HO ab 9000 HU d) HO ab 5000 HU	32
Abbildung 15: Gefäßrekonstruktion des Unterschenkels von Versuchstier 27 a) initiale Aufnahme b) nach Artefaktbereinigung	33
Abbildung 16: Gefäßmarkierung des Unterschenkels von Versuchstier 27 auf Höhe der Tenotomie	33

Abbildung 17: Röntgenbild des Unterschenkels von Versuchstier 87, Gruppe: Tenotomie mit SHT, Pfeil: heterotope Ossifikation	38
Abbildung 18: Röntgenbild des Unterschenkels von Versuchstier 86, Gruppe: Tenotomie mit SHT, Pfeile: heterotope Ossifikation	38
Abbildung 19: Boxplot zum Einfluss von Schädel-Hirn-Trauma auf die Fläche heterotoper Ossifikation nach Tenotomie im Röntgenbild nach 35 Tagen	39
Abbildung 20: Boxplot zum Einfluss von Schädel-Hirn-Trauma auf die Fläche heterotoper Ossifikation nach Tenotomie im Röntgenbild nach 56 Tagen post-OP ..	40
Abbildung 21: Balkendiagramm zum Einfluss von Schädel-Hirn-Trauma auf die Fläche heterotoper Ossifikation nach Tenotomie im Röntgenbild	40
Abbildung 22: Boxplot zum Einfluss von Schädel-Hirn-Trauma auf die Fläche heterotoper Ossifikation nach Tenotomie im Röntgenbild nach 35 Tagen post-OP unter Ausschluss von Tieren ohne HO-Bildung	41
Abbildung 23: Boxplot zum Einfluss von Schädel-Hirn-Trauma auf die Fläche heterotoper Ossifikation nach Tenotomie im Röntgenbild nach 56 Tagen post-OP unter Ausschluss von Tieren ohne HO-Bildung	42
Abbildung 24: Balkendiagramm zum Einfluss von Schädel-Hirn-Trauma auf die Fläche heterotoper Ossifikation nach Tenotomie im Röntgenbild unter Ausschluss von Tieren ohne HO-Bildung	42
Abbildung 25: Balkendiagramm zum Einfluss von Schädel-Hirn-Trauma auf Volumen und Dichte heterotoper Ossifikation nach Tenotomie in der μ CT	45
Abbildung 26: Versuchstier 26, Gruppe: Tenotomie ohne SHT; Pfeil: heterotope Ossifikation; Gefäßdarstellung und Querschnitt	48
Abbildung 27: Versuchstier 27, Gruppe: Tenotomie ohne SHT; Pfeil: heterotope Ossifikation; Gefäßdarstellung und Querschnitt	48
Abbildung 28: Versuchstier 86, Gruppe: Tenotomie mit SHT; Pfeil: heterotope Ossifikation; Gefäßdarstellung und Querschnitt	49
Abbildung 29: Versuchstier 88, Gruppe: Tenotomie mit SHT; Pfeil: heterotope Ossifikation; Gefäßdarstellung und Querschnitt	49
Abbildung 30: Boxplot zum Einfluss von Echinomycin auf die Fläche heterotoper Ossifikation nach Tenotomie im Röntgenbild nach 35 Tagen post-OP	52
Abbildung 31: Boxplot zum Einfluss von Echinomycin auf die Fläche heterotoper Ossifikation nach Tenotomie im Röntgenbild nach 56 Tagen post-OP	52
Abbildung 32: Balkendiagramm zum Einfluss von Echinomycin auf die Fläche heterotoper Ossifikation nach Tenotomie im Röntgenbild	53

Abbildung 33: Balkendiagramm zum Einfluss von Echinomycin auf Volumen und Dichte heterotoper Ossifikation nach Tenotomie in der μ CT	55
Abbildung 34: Versuchstier 26, Gruppe: Tenotomie ohne Echinomycin; Pfeil: heterotope Ossifikation; Gefäßdarstellung und Querschnitt	58
Abbildung 35: Versuchstier 27, Gruppe: Tenotomie ohne Echinomycin; Pfeil: heterotope Ossifikation; Gefäßdarstellung und Querschnitt	58
Abbildung 36: Versuchstier 57, Gruppe: Tenotomie mit Echinomycin; Pfeil: heterotope Ossifikation, Gefäßdarstellung und Querschnitt	59
Abbildung 37: Versuchstier 58, Gruppe: Tenotomie mit Echinomycin; Pfeil: heterotope Ossifikation, Gefäßdarstellung und Querschnitt	59
Abbildung 38: Versuchstier 119, Gruppe: Tenotomie mit SHT und Echinomycin; oben: 49. Tag post-OP unten: 56. Tag post-OP; Pfeil: oben: HO, unten: keine HO mehr sichtbar.....	61
Abbildung 39: Boxplot zum Einfluss von Echinomycin auf die Fläche heterotoper Ossifikation nach Tenotomie mit begleitendem Schädel-Hirn-Trauma im Röntgenbild nach 35 Tagen post-OP	63
Abbildung 40: Boxplot zum Einfluss von Echinomycin auf die Fläche heterotoper Ossifikation nach Tenotomie mit begleitendem Schädel-Hirn-Trauma im Röntgenbild nach 56 Tagen post-OP	63
Abbildung 41: Balkendiagramm zum Einfluss von Echinomycin auf die Fläche heterotoper Ossifikation nach Tenotomie mit begleitendem Schädel-Hirn-Trauma im Röntgenbild	64
Abbildung 42: Balkendiagramm zum Einfluss von Echinomycin auf Volumen und Dichte heterotoper Ossifikation nach Tenotomie mit Schädel-Hirn-Trauma in der μ CT	66
Abbildung 43: Versuchstier 86, Gruppe: Tenotomie mit Schädel-Hirn-Trauma ohne Echinomycin; Pfeil: heterotope Ossifikation; Gefäßdarstellung und Querschnitt.....	69
Abbildung 44: Versuchstier 88, Gruppe: Tenotomie mit Schädel-Hirn-Trauma ohne Echinomycin; Pfeil: heterotope Ossifikation; Gefäßdarstellung und Querschnitt.....	69
Abbildung 45: Versuchstier 117, Gruppe: Tenotomie mit Schädel-Hirn-Trauma und Echinomycin; Pfeil: heterotope Ossifikation; Gefäßdarstellung und Querschnitt.....	70
Abbildung 46: Versuchstier 119, Gruppe: Tenotomie mit Schädel-Hirn-Trauma mit Echinomycin; Pfeil: heterotope Ossifikation; Gefäßdarstellung und Querschnitt.....	70

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Glasgow Coma Scale	18
Tabelle 2: Ergebnistabelle zum Einfluss von Schädel-Hirn-Trauma auf die Fläche heterotoper Ossifikation nach Tenotomie im Röntgenbild	37
Tabelle 3: Deskriptive Statistik zum Einfluss Schädel-Hirn-Traumata auf die Fläche heterotoper Ossifikation nach Tenotomie im Röntgenbild	37
Tabelle 4: Mann-Whitney-U-Test zum Einfluss von Schädel-Hirn-Trauma auf die Fläche heterotoper Ossifikation nach Tenotomie im Röntgenbild	43
Tabelle 5: Mann-Whitney-U-Test zum Einfluss von Schädel-Hirn-Trauma auf die Fläche heterotoper Ossifikation nach Tenotomie im Röntgenbild unter Ausschluss der Tiere ohne HO-Bildung.....	44
Tabelle 6: Ergebnistabelle zum Einfluss von Schädel-Hirn-Trauma auf Volumen und Dichte heterotoper Ossifikation nach Tenotomie in der μ CT	45
Tabelle 7: Ergebnistabelle zum Einfluss von Schädel-Hirn-Trauma auf Angiogenese nach Tenotomie in der μ CT	46
Tabelle 8: Deskriptive Statistik zum Einfluss von Schädel-Hirn-Trauma auf die Gesamtvolumina der Gefäße nach Tenotomie in der μ CT	46
Tabelle 9: Deskriptive Statistik zum Einfluss von Schädel-Hirn-Trauma auf die Anzahl der Gefäße im Querschnitt nach Tenotomie in der μ CT	47
Tabelle 10: Ergebnistabelle zum Einfluss von Echinomycin auf die Fläche heterotoper Ossifikation nach Tenotomie im Röntgenbild	50
Tabelle 11: Deskriptive Statistik zum Einfluss von Echinomycin auf die Fläche heterotoper Ossifikation nach Tenotomie im Röntgenbild	51
Tabelle 12: Mann-Whitney-U-Test zum Einfluss von Echinomycin auf die Fläche heterotoper Ossifikation nach Tenotomie im Röntgenbild	54
Tabelle 13: Ergebnistabelle zum Einfluss von Echinomycin auf Volumen und Dichte heterotoper Ossifikation nach Tenotomie in der μ CT	55
Tabelle 14: Ergebnistabelle zum Einfluss von Echinomycin auf die Angiogenese nach Tenotomie in der μ CT.....	56
Tabelle 15: Deskriptive Statistik zum Einfluss von Echinomycin auf die Gesamtvolumina der Gefäße nach Tenotomie in der μ CT	56

Tabelle 16: Deskriptive Statistik zum Einfluss von Echinomycin auf die Anzahl der Gefäße im Querschnitt nach Tenotomie in der μ CT	57
Tabelle 17: Ergebnistabelle zum Einfluss von Echinomycin auf die Fläche heterotoper Ossifikation nach Tenotomie mit begleitendem Schädel-Hirn-Trauma im Röntgenbild	60
Tabelle 18: Deskriptive Statistik zum Einfluss von Echinomycin auf die Fläche heterotoper Ossifikation nach Tenotomie mit begleitendem Schädel-Hirn-Trauma im Röntgenbild	62
Tabelle 19: Mann-Whitney-U-Test zum Einfluss von Echinomycin auf die Fläche heterotoper Ossifikation nach Tenotomie mit begleitendem Schädel-Hirn-Trauma im Röntgenbild	65
Tabelle 20: Ergebnistabelle zum Einfluss von Echinomycin auf Volumen und Dichte heterotoper Ossifikation nach Tenotomie mit Schädel-Hirn-Trauma in der μ CT	66
Tabelle 21: Ergebnistabelle zum Einfluss von Echinomycin auf die Angiogenese heterotoper Ossifikation nach Tenotomie mit begleitendem Schädel-Hirn-Trauma in der μ CT	67
Tabelle 22: Deskriptive Statistik zum Einfluss von Echinomycin auf die Gesamtvolumina der Gefäße nach Tenotomie mit begleitendem Schädel-Hirn-Trauma in der μ CT	67
Tabelle 23: Deskriptive Statistik zum Einfluss von Echinomycin auf die Anzahl der Gefäße im Querschnitt nach Tenotomie mit begleitendem Schädel-Hirn-Trauma in der μ CT	68

1. Einleitung

Heterotope Ossifikation (HO) ist die Entstehung von Knochen an Orten des Körpers, an denen physiologisch kein Knochen wächst. Das Erscheinungsbild heterotoper Ossifikation als Komplikation nach Traumata wie chirurgischen Eingriffen reicht von kleinen subklinischen Läsionen bis zur kompletten Ankylose, die neben dem hohen Leidensdruck der Patienten auch zu einer erhöhten Mortalität führt. So verschieden die Auslöser und Ausprägungen sind, so umfangreich ist auch die Pathogenese hinter der Bildung heterotoper Ossifikation. Knochenbildung selbst ist ein physiologischer und notwendiger Vorgang des menschlichen Körpers. Seine Fehlleitung über verschiedenste molekulare Vorgänge führt zum Krankheitsbild der pathologischen Knochenbildung. Diese Vorgänge sind bisher nur unzureichend verstanden, sodass noch keine suffiziente Therapie existiert, welche die Erkrankung verhindern könnte. Eine erste Beschreibung des Auftretens heterotoper Ossifikation, benannt als *myositis ossificans progressiva*, findet sich in der Literatur bereits ab dem Jahre 1692 (1). Die erste Klassifikation des Phänomens erfolgte erst im Jahr 1924 durch Nobel. Dieser teilte die *myositis ossificans* in 3 Klassen ein: 1) *Myositis ossificans progressiva*, eine bei Kindern auftretende Verknöcherung des Skelettmuskels; 2) *Traumatische myositis ossificans circumscripta*, welche durch ein akutes oder chronisches Trauma ausgelöst wird und 3) *Myositis ossificans circumscripta* ohne traumatischen Hintergrund, die beispielsweise auf chronische Entzündungen basieren (2). Über die Jahre hat eine zunehmende Zahl von Autoren weitere Fälle dokumentiert (3). Synonym zur heterotopen Ossifikation verwendete Begriffe sind neben der *myositis ossificans* die ossifizierende Fibromyopathie, die Paraosteoarthropathie und die ektope Ossifikation (4). Der Begriff der heterotopen Ossifikation jedoch prägt als Bezeichnung zunehmend die Titel der Publikationen. Mit steigendem Fokus auf heterotope Ossifikation als Komplikation nach Operationen (OP) oder anderen Traumata stieg auch das Forschungsinteresse in den letzten Jahren. Mit dem Ziel in Zukunft heterotope Ossifikation besser zu verstehen und behandeln zu können schließt sich die folgende Studie an. Im Rahmen dieser Studie wird sowohl der Einfluss von Schädel-Hirn-Traumata auf heterotope Ossifikation untersucht als auch der Anteil einer vermutlich gesteigerten Angiogenese an der Entstehung von heterotopen Ossifikationen. Dabei wird die Substanz Echinomycin untersucht, welche die Angiogenese reduzieren soll. Sie wird als potenzielle Therapie nach peripherem Trauma mit und ohne begleitendes

Schädel-Hirn-Trauma (SHT) geprüft. Die Studie orientiert sich hierbei an einem bereits etablierten Tiermodell zur Provokation heterotoper Ossifikation: der Achillessehnen-Tenotomie bei Mäusen. Ziel ist es zum einen ein Modell zu entwickeln, um zukünftige Forschung in diesem Gebiet zu erleichtern; zum anderen soll die Studie prüfen, ob Angiogenese ein Schlüsselfaktor bei der Entstehung heterotoper Ossifikation nach Schädel-Hirn-Traumata darstellt und diese durch Echinomycin abgemildert wird. Hierdurch könnte die Komplikation heterotope Ossifikation in ihrer Ausprägung verringert oder sogar vollständig verhindert werden.

2. Literaturdiskussion

2.1. Heterotope Ossifikation

2.1.1. Definition

Heterotope Ossifikation beschreibt das Vorkommen von Lamellenknochen in Geweben, in denen üblicherweise kein Knochen vorkommt (5). Schon früh ging man von einer zentralen Rolle mesenchymaler Stammzellen aus, welche neben osteoinduktiven Faktoren maßgebliche Induktoren heterotoper Ossifikation sind (6, 7). Die meisten Autoren führen neben der obengenannten Definition von HO die Unterteilung in eine hereditäre oder erworbene heterotope Ossifikation an (8).

Hereditäre heterotope Ossifikation

Hereditäre, oder auch genetische HO, wird grundsätzlich in zwei verschiedene Krankheitsbilder eingeteilt: die fibrodysplasia ossificans progressiva (FOP) und die progressive osseous heteroplasia (POH).

Die FOP ist eine äußerst seltene und schwerwiegende Erkrankung mit einer Inzidenz von ca. 1 in 2.000.000 (9). Pathophysiologisch liegt eine zunehmende Ossifikation von Sehnen, Faszien, Ligamenta und Skelettmuskeln vor, mit Verlauf von kranial nach kaudal und von proximal nach distal (siehe Abbildung 1)(10). Die klinische Manifestation beginnt üblicherweise im Kindesalter und präsentiert sich zunächst in Form von schmerzhaften und erythematösen Knötchen im Nacken- und Rückenbereich. Im Verlauf ergänzen sich Torticollis, Rückenschmerzen und schmerzhafte Bewegungseinschränkungen des Beckens (11). Im späten Stadium entwickelt sich eine zunehmende Ankylose mit Bettlägerigkeit und aufgrund restriktiver Einschränkungen schließlich der Tod durch kardiopulmonale Ereignisse. Die mittlere Überlebenszeit beträgt nur etwa 56 Jahre (12). Genetisch betrachtet handelt es sich bei der FOP um eine autosomal dominant vererbte Veränderung im bone morphogenic protein (BMP) Typ I Rezeptor, genauer eine heterozygote Aktivierung im Activin Rezeptor IA/activin-like kinase-2 (ACR1/ALK2) (13).

Die progressive osseous heteroplasie ist ebenfalls eine genetische Erkrankung, die mit heterotoper Ossifikation einhergeht. Im Gegensatz zur FOP weisen die Betroffenen keine kongenitalen Malformationen auf. Erste klinische Manifestationen betreffen

hauptsächlich die Haut und dringen später in tiefere Gewebe vor (14, 15). Pathophysiologisch geht man von einer inaktivierenden Mutation im paternalen Allel des Gens GNAS (aus dem englischen: Guanine Nucleotide Binding Protein Alpha Stimulating Activity Polypeptide) aus (16). Aufgrund ähnlicher genetischer Ursachen, aber teilweise unterschiedlicher klinischer Ausprägung diskutiert man eine weitere Differenzierung der POH, die Albrigh's hereditary osteodystrophy (17).



Abbildung 1: 17-Jähriger Patient mit FOP und thorakalem Insuffizienz-Syndrom (18)

Erworbene heterotope Ossifikation

Erworbene, oder nichtgenetische, heterotope Ossifikation kann als fehlgeleiteter Reparaturmechanismus angesehen werden und ist im klinischen Alltag als Komplikation, häufig nach Traumata wie Operationen, verbreitet. Man unterscheidet hierbei traumatische und neurogene heterotope Ossifikation, wobei traumatische HO spitze oder stumpfe Gewalteinwirkung, sowie Operationen umfasst und neurogene HO nach Schädel-Hirn-Trauma oder Rückenmarksverletzungen auftritt. Epidemiologisch tritt die erworbene HO zumeist nach endoprothetischen Eingriffen der Hüfte in bis zu 44,6% der Fälle auf (19-26). Nach Frakturen oder Dislokationen, häufig des Ellenbogens, werden bis zu 37% erreicht (27, 28) . Auch nach Hochrasanztraumata wie Explosionsverletzungen tritt HO vermehrt auf (29). Führt dies zusätzlich zu einer traumatischen Amputation steigt die Inzidenz auf bis zu 90% (30). Ein erhöhtes

Vorkommen zeigt sich außerdem nach Schädel-Hirn-Traumata mit ca. 10-23%, sowie Rückenmarksverletzungen mit ca. 40-50% (7). In seltenen Fällen von 2-5% tritt HO auch nach Brandverletzungen auf. Ausmaß und Verlauf der Knochenbildung entwickeln sich proportional zum Schweregrad und Fläche der erlittenen Verletzung und korrelieren außerdem direkt mit Immobilisation, Bedarf an Beatmungsunterstützung, Notwendigkeit von Reoperationen, sowie der Entwicklung einer Sepsis (31).

Die vorliegende Arbeit bezieht sich im Folgenden ausschließlich auf die erworbene heterotope Ossifikation.

2.1.2. Ätiologie und Pathophysiologie

Die körpereigene Fähigkeit verletztes Gewebe heilen zu lassen folgt einem komplexen Prozess, welcher fehlgeleitet zu pathologischen Prozessen führen kann, wie zum Beispiel heterotope Ossifikation. Um einen Angriffspunkt möglicher Therapien zu identifizieren ist das Verständnis des Pathomechanismus von essenzieller Bedeutung. Die Entstehung heterotoper Ossifikation ist jedoch noch nicht vollständig verstanden. Es handelt sich um enchondrale Ossifikation, basierend auf der Mineralisierung eines knorpeligen Zwischenproduktes, wobei mehrere Zellreihen, entzündliche Prozesse, Differenzierungsvorgänge, sowie endogene Signalkaskaden involviert sind und diese untereinander interagieren (32).

Inflammation

Heterotoper Ossifikation geht stets ein inflammatorischer Prozess voraus, initiiert beispielsweise durch Traumata. Ausgelöst wird die Entzündung zum einen durch die Invasion von Mikroorganismen, sowie endogenen Mediatoren aus geschädigtem Gewebe (33). Direkt mit der HO assoziierende, klassische Interleukine (IL), wie IL-3 und IL-12, konnten in Wundgewebe, sowie im Serum im Tiermodell nachgewiesen werden (34). Inzidenz und Ausmaß der Bildung heterotoper Ossifikation nimmt bei bakterieller Wundbesiedlung, sowie einer Anfälligkeit für chronisch entzündliche Erkrankungen, beispielsweise bei Patienten mit positivem human leukocyte antigen (HLA)-B27, zu (35-37). Auch ein neurogenes Trauma induziert über Ausschüttung spezifischer Peptide eine Entzündungsreaktion und führt damit zu erhöhter Inzidenz

von HO (38). Der genaue Pathomechanismus der Neuroinflammation wird in den Kapiteln 3.2.2 und 3.2.3 detaillierter erläutert.

Zelllinien und Differenzierung

Betrachtet man die Pathogenese der heterotopen Ossifikation liegt die Wahrscheinlichkeit nahe, dass sie die Folge einer fehlgeleiteten Differenzierung von Vorläuferzellen, sogenannten Osteoprogenitorzellen darstellt. Als ursächlich wird hierfür ein pathologisches Ungleichgewicht lokaler oder systemischer Faktoren entsprechend der Abbildung 2 angenommen. Während man zu Beginn der Forschung noch vom hauptsächlichen Anteil mesenchymaler Stammzellen ausgegangen ist, so wurden im Verlauf auch Vorläuferzellen der endothelialen, neuronalen, sowie epidermalen Zellreihe nachgewiesen (39). Basis dieser Vermutung ist die Feststellung, dass Stammzellen, basierend auf ihr Umfeld, in der Lage sind ihre zelluläre Spezifikation zu ändern (40). Neben ortsansässigen Zellen spielen auch solche eine Rolle, die sich mobilisieren und im Blut zirkulieren können. Dies könnte die Tatsache erklären, dass heterotope Ossifikation nicht zwingend am Ort des Traumas auftreten muss (32).

Brain morphogenetic protein Signalweg

Nachdem Marshall R Urist 1965 eine Substanz entdeckte die heterotope Ossifikation entstehen lässt, sie 1979 isolierte und als brain morphogenetic protein benannte, legte er den Grundstein für die Erforschung der Pathophysiologie heterotoper Ossifikation (41, 42). Heute zählt man BMP zur Familie der transforming growth factor (TGF)- β . Die Zytokine steuern eine breite Menge an Entstehungs- und Entwicklungsvorgängen, wozu auch die Osteoinduktion, Differenzierung und Reifung zählen (43). Hierbei wurden insbesondere BMP-2 und BMP-7 wurden als osteoinduktiv eingestuft (44). Über die Dimerisierung von BMP-Rezeptoren aktivieren BMPs die Phosphorylierung von SMAD1/5 (aus dem engl. Small body sized und mothers against decapentaplegic). Nach Phosphorylierung aktiviert SMAD1/5 die Transkription chondro- und osteogener Genabschnitte (siehe Abbildung 2) (45, 46).

Auch bei genetischer HO spielt dieser Signalweg eine zentrale Rolle. Die Aktivierung von Activin Rezeptor IA, auch activin rezeptor-like kinase-2 genannt, führt zu einer Activin-A Bindung, welches ebenfalls zur Gruppe der TGF- β Familie gehört und physiologischerweise eine antagonistische Wirkung zum BMP Signalweg zeigt. Diese

genetische Fehlaktivierung führt zu einer vermehrten Initiierung chondro- und osteogenetischer Genabschnitte (47, 48).

mTOR Signalweg

Als Reaktion auf Störungen schütten Zellen Mediatoren, wie Wachstumsfaktoren aus, um die Homöostase wiederherzustellen. Hierbei wird die Phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) und darüber die mTOR-Signalkaskade (aus dem englischen „mammalian Target of Rapamycin“) gestartet (49). Über Aktivierung verschiedener Transkriptionsfaktoren werden zellspezifisch verschiedenste Prozesse wie Autophagie, T-Zell-Differenzierung, sowie die Proliferation von Fibroblasten und Chondrozyten initiiert (siehe Abbildung 2) (50, 51).

Vitamin A Signalweg

Ein weiterer Faktor im komplexen Mechanismus der Entstehung heterotoper Ossifikation ist Vitamin A, bzw. dessen aktive Form ATRA (aus dem englischen all-trans retinoic acid). Gebunden an einen Rezeptor der Retinoic Acid Receptor Familie (wie beispielsweise RAR- α oder RAR- β) führt das Retinoid zu verschiedenen Einflüssen auf Transkriptionen. Darunter zählt auch die Aktivierung von Osteoklasten sowie die Verhinderung der chondrogenen Zelldifferenzierung, was in vermindertem Knochenaufbau und damit verringerter heterotoper Ossifikation resultiert (32, 52).

HIF-1 α Signalweg

Der von-Hippel-Lindau-Tumorsuppressor (VHL) reguliert sauerstoffabhängig den Abbau vom hypoxia-inducible factor-1alpha (HIF-1 α) durch Bindung an seine hydroxylierte Untereinheit und Induktion der Proteolyse (53). Sinkt der Sauerstoffgehalt, wie beispielsweise bei Gewebshypoxie nach einem Trauma, wird diese Regulation gehemmt. HIF-1 α dimerisiert mit HIF-1 β im Nucleolus der Zellen und aktiviert Transkriptionsmechanismen, welche zu einer erhöhten chondrogenen Aktivierung und über Expression von vascular endothelial growth factor (VEGF) verstärkter Angiogenese führen (54). Angiogenese ist für die Knochenbildung essenziell, da hierüber Osteoprogenitorzellen, Cytokine und Sauerstoff transportiert werden. Des Weiteren scheint HIF-1 α in der Lage zu sein unabhängig von der Angiogenese direkt mesenchymale Stammzellen zu aktivieren, sowie die Proliferation und Differenzierung von Osteoblasten voranzutreiben (55). Dies geschieht durch Bindung des Heterodimers an den Promotor von SOX-9 (aus dem englischen sex

determining region Y) unter hypoxischen Bedingungen, wobei die Chondrogenese aktiviert wird (56, 57). Im späteren Stadium wirkt sich HIF-1 α über RUNX-Hemmung negativ auf die die Osteogenese aus, wobei die Chondrogenese zeitlich verlängert wird. Zuletzt verstärkt HIF-1 α außerdem die Proliferation der Osteoblasten (58).

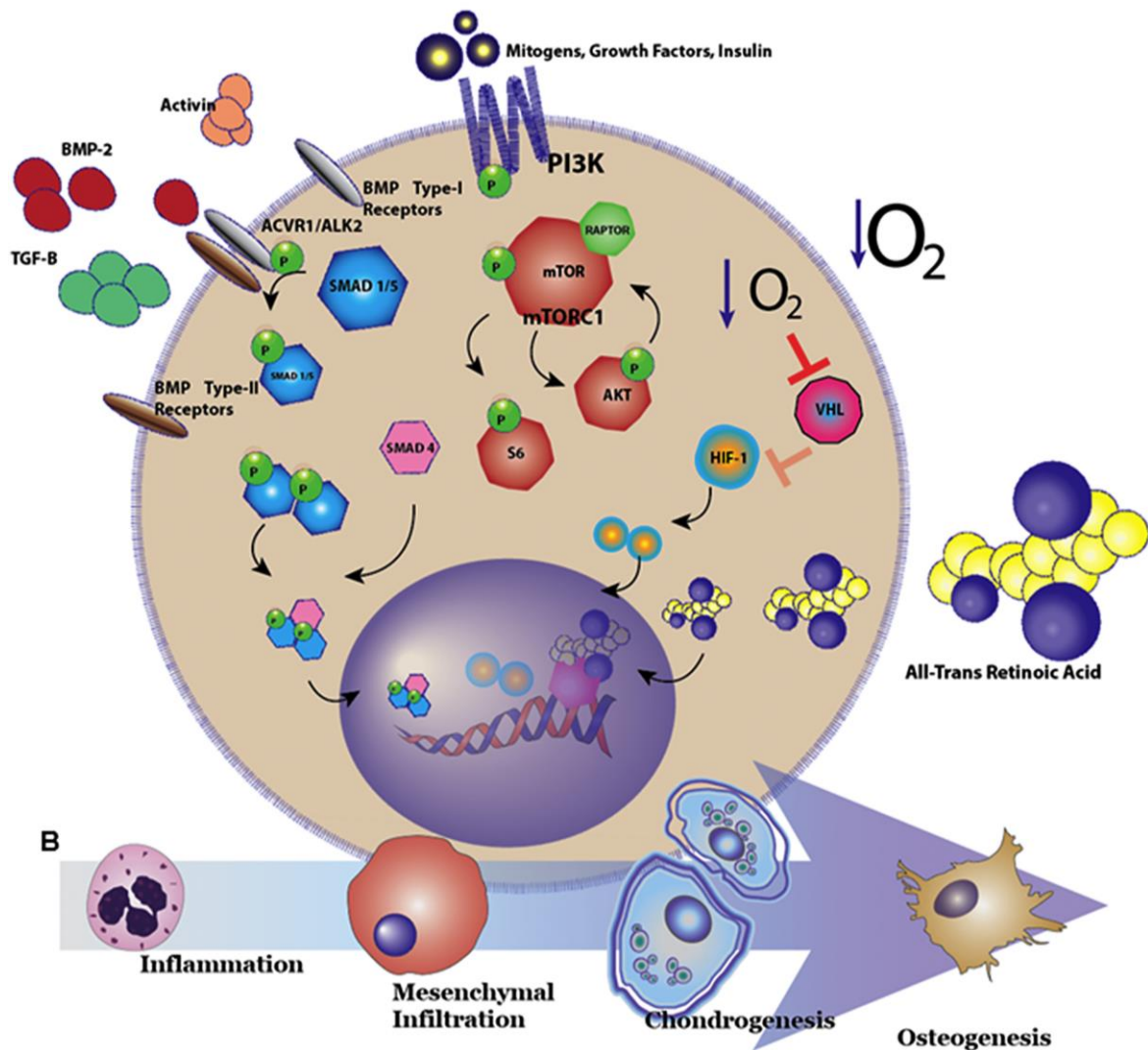


Abbildung 2: Molekulargenetische Einflussfaktoren auf die Osteogenese (32)

2.1.3. Klinisches Erscheinungsbild und Diagnostik

Aufgrund der Vielschichtigkeit bezüglich Ätiologie, Lokalisation sowie Ausmaß der heterotopen Ossifikation zeigt sich ein sehr variables Erscheinungsbild. Im frühen, entzündlichen Stadium präsentiert sich die Läsion mit lokalisierten Schmerzen und Schwellung mit zunehmendem Volumen, was die Differenzialdiagnose eines

Weichteilsarkoms aufwerfen kann (59, 60). Mit Verfestigung des Knochengewebes lokalisiert sich der Schmerz, eine Infiltration von Gelenken kann Bewegungseinschränkungen hervorrufen (61).

[PatientID]: HO4.CT9.86, [Access#]: 11, [Name]: MOUSE, MR., [Gender]: M, [Time]: 2002/01/01 00:40:55
[File]: I20020101004055, [StudyID]: , [Study]: , [Proc]: , [Position]: RIGHT
[Physician]: , [TechID]: , [Tech]: A. HACKEMANN, [Station]: FAXITRON, [Institution]:

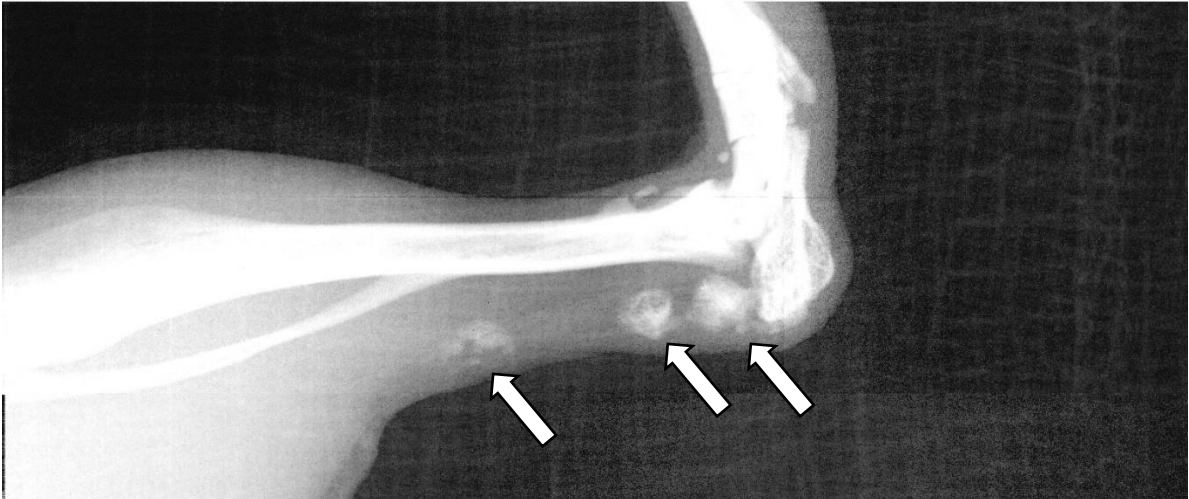


Abbildung 3: Röntgenaufnahme vom Unterschenkel einer Maus nach Tenotomie der Achillessehne, Pfeile: heterotope Ossifikation

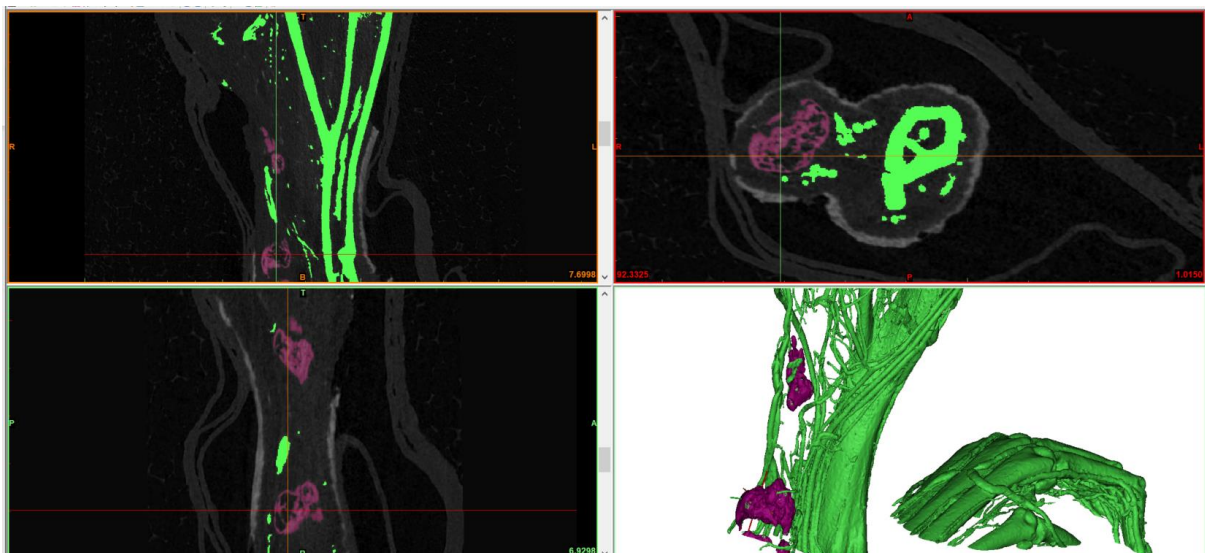


Abbildung 4: CT-Aufnahme Unterschenkel einer Maus. lila: heterotope Ossifikation grün: Knochen und Gefäße

Basisdiagnostik für den Nachweis heterotoper Ossifikation ist aufgrund flächendeckender Verfügbarkeit sowie geringer Kostenintensität das konventionelle Röntgenbild (siehe Abbildung 3). Einem röntgenologischen Nachweis sollte im Verlauf,

bei Komplikationen, sowie präoperativ, eine Computertomographie (CT) folgen, welche den Bezug zu umgebenden Strukturen klären kann (siehe Abbildung 4) (62). Die Darstellbarkeit beider Methoden ist jedoch von der Dichte des neugebildeten Knochengewebes abhängig, wodurch ein Nachweis häufig erst Wochen nach dem initialen Trauma gelingt (63-65). Frühe Läsionen imponieren durch flockige, unregelmäßige Strukturen, die sich im Verlauf verdichten und später eine klassische zonale Ossifikationszone mit Randzonenaufhellung bildet (66). HO, die sich an Strukturen wie Ligamenta oder Sehnen bildet, folgt diesen klassischerweise entlang ihres natürlichen Verlaufs und ist häufig bildmorphologisch von beispielsweise einer tendinosus calcarea nicht zu unterscheiden (61, 67). Entscheidend hierbei ist die klinische Anamnese eines Traumas zur differentialdiagnostischen Abklärung.

Mittels einer Magnetresonanztomographie (MRT) kann heterotope Ossifikation bereits in seiner Frühphase aufgrund von erhöhter Gewebedichte und -vaskularisation nachgewiesen werden (68). Eine häufig schwer abgrenzbare Differentialdiagnose sind Weichteiltumore, wie beispielsweise Sarkome, wovon sich die heterotope Ossifikation durch seine klassische Randanreicherung differenzieren lässt (69).

Eine leicht zugängliche und kostengünstige Diagnostik ermöglicht der Ultraschall. Abhängig von der Expertise des Untersuchers und der Lokalisation heterotoper Ossifikation, ermöglicht er eine frühe, sensible und reproduzierbare Darstellung und wird als postoperative Kontrolle und zur Anpassung rehabilitativer Maßnahmen diskutiert (70, 71).

2.1.4. Prävention und Therapie

Verschiedene Studien konnten prädiktive Faktoren für die Entstehung heterotoper Ossifikation nachweisen. Männliche Tiere weisen im Mausmodell ein gehäuftes Auftreten von heterotoper Ossifikation nach Tenotomie oder Verbrennungen auf (72), wobei eine verminderte Differenzierung von Osteoblasten als morphologische Ursache diskutiert wird (73). Weitere Studien zeigten, dass die Dauer eines komatösen Zustandes und der mechanischen Ventilation, sowie ausgeprägte chirurgische Frakturversorgung die Inzidenz für HO bei Patienten mit Schädel-Hirn-Trauma erhöhen. Spastiken konnten als Risikofaktoren sowohl bei Patienten nach Schädel-Hirn-Traumata als auch nach Rückenmarksläsionen detektiert werden (74-76). Eine

frühe Rehabilitationsmaßnahme und Mobilisierung konnten das Outcome der Patienten verbessern (77).

Da die Pathomechanismen der Entstehung heterotoper Ossifikation noch nicht vollständig verstanden sind und es sich um eine Vielzahl möglicher Mediatoren und deren Zusammenspiel untereinander handelt, ergeben sich verschiedenste Ansätze zur Prävention und Behandlung heterotoper Ossifikation.

Nicht steroidale Antirheumatika

Seit vielen Jahren werden in wissenschaftlichen Publikationen klassische nicht steroidale Antirheumatika (NSAR), insbesondere Indometacin sowie die neueren selektiven Cyclooxygenase (COX) 2-Inhibitoren untersucht. Nach einer groß angelegten systematischen Untersuchung von Neal et al. vermindern NSAR das Risiko des Auftretens von HO um 57% (78). Auch die neueren COX2-Inhibitoren zeigten in der perioperativen Prävention einen signifikanten Nutzen (79). Beim zugrundeliegenden Mechanismus handelt es sich am ehesten um den Einfluss auf Prostaglandine, von denen insbesondere die Untergruppe der Prostaglandine E2 regulatorisch auf die Aktivität von Osteoblasten und Osteoklasten einwirken. Über die Hemmung von COX2 verringern Osteoblasten die Ausschüttung von Prostaglandinen (80). Dennoch konnte in Studien kein deutlicher Vorteil der selektiven COX-Hemmer bewiesen werden (81). Ein erheblicher Unterschied zwischen den beiden Substanzgruppen ergibt sich aus dem Nebenwirkungsprofil. Hierbei sind gastrointestinale Blutungen, ein negativer Einfluss auf die Knochenheilung durch vermindert mineralisierten Kallus sowie kardiovaskuläre Nebenwirkungen zu betrachten (82-85). Studien stellen den Verdacht, dass NSAR im Vergleich zu selektiven COX2-Inhibitoren vermehrt gastrointestinale Blutungen, jedoch weniger kardiovaskuläre Ereignisse verursachen (86). Auch ein erhöhter Blutdruck über die COX2-Hemmung, welche bei Patienten unter Dauertherapie mit AT1- oder ACE-Hemmern sowie Diuretika zur erhöhten Inzidenz kardiovaskulärer Ereignisse führen, ist von großer Bedeutung. Patienten die beispielsweise eine totale Endoprothese (TEP) der Hüfte benötigen weisen häufig entsprechende Komorbiditäten auf (85). Um die systemischen Nebenwirkungen zu umgehen gibt es bereits Studien, die eine lokale Anwendung zur Diskussion gebracht haben, bisher jedoch nur in experimentellem Setting (87).

Radiotherapie

Die Strahlentherapie, auch Radiotherapie, genannt ist die am längsten bekannte Methode zur Prävention einer heterotopen Ossifikation und die bisher einzige lokale Therapiemöglichkeit (88). Bereits 1970 wurden die ersten Patienten mit einer Hüft-Operation bestrahlt (89). Auch bei neurogener HO wurde die Radiotherapie, im Fall von Sautter-Bihl et al. erfolgreich nach Rückenmarksverletzung eingesetzt, wobei weniger als 10% der Patienten eine Progression der ektopen Knochenbildung aufwiesen (88). Die Funktionsweise ist noch nicht vollständig verstanden, jedoch wird vermutet, dass Strahlentherapie die Differenzierung pluripotenter mesenchymaler Stammzellen zu Osteoblasten verhindert (90, 91). Eine weitere mögliche Wirkung ist der antiphlogistische Effekt von Niedrigdosis-Radiotherapie. Trotz umfangreicher Studien gibt es weiterhin keine allgemeingültigen Handlungsempfehlungen für die Prophylaxe mittels Strahlentherapie, wobei die meisten Therapien mit einer Dosis von 700cGy durchgeführt werden (92). Diese Dosierung wurde in mehreren Studien, vor allem bei Hüftoperationen untersucht und die Effektivität auch im Vergleich zu 400cGy nachgewiesen. Einen Unterschied zwischen prä- oder postoperativer Therapie konnte bislang nicht sicher nachgewiesen werden (92-95).

Die Studienlage bezüglich der Effektivität einer Radiotherapieprophylaxe bei erworbener heterotoper Ossifikation nach neurogenem Trauma ist rudimentär. In den beschriebenen Case Reports werden häufig multifraktionelle Therapien von 20Gy in 2Gy-Dosen verabreicht, mit positivem Effekt auf Schmerzlinderung und Bewegungseinschränkung, sowie die Verminderung des Progresses heterotoper Ossifikation (96-98). Cipriano et al. hingegen widerlegte eine signifikante Prophylaxe neurogener heterotoper Ossifikation (99). Weitere Studien müssen folgen, um den Effekt von Strahlentherapie auf erworbene HO nach neurogenem Trauma zu untersuchen.

Eine große Cochrane kontrollierte Meta-Analyse von Vavken et al. zufolge gibt es keinen signifikanten Unterschied der Wirksamkeit zwischen dem Verwenden von NSAR oder Radiotherapie zur Prävention heterotoper Ossifikation (100). Betrachtet man den finanziellen Aspekt, so sind die Kosten der Behandlung der Radiotherapie höher, berücksichtigt man jedoch mögliche zusätzliche Kosten wie Hospitationszeit und Arbeitsausfall durch beispielsweise gastrointestinale Blutungen nach NSAR-

Einnahme könnten sie, je nach zugrundeliegender Studie für die Inzidenz dieser Komplikationen, höher liegen (101).

Echinomycin

Echinomycin (NSC-13502) ist ein zyklisches Peptid und einer der potentesten Inhibitoren von HIF-1 α . (102, 103). Hierdurch soll die Angiogenese gemindert und heterotope Ossifikation verhindert werden. Das Molekül wurde bisher nur in Tiermodellen getestet. Eine klinische Verwendung besteht aktuell noch nicht. Die Wirkweise wird in Kapitel 6.3.1 näher beschrieben.

Operation

Eine operative Versorgung ist bisher die einzige Möglichkeit bereits entstandene heterotope Ossifikation zu therapieren, wobei die Indikation aufgrund der hohen Komplikationsrate kritisch zu stellen ist und beispielsweise bei starken Bewegungseinschränkungen, Kontrakturen sowie therapierefraktären Schmerzen greift (104). Die Komplikationen umfassen tiefe (2-5%) und oberflächliche Infektionen (7-28%), wie auch intra- (9-83%) und postoperative Blutungen (5-38%) (105). Weitere Komplikationen sind die intraoperative Verletzung von Gefäßen und Knochen sowie die Gefahr druckbedingter Ulzerationen (106). Problematisch ist außerdem die hohe Rate an Rezidiven heterotoper Ossifikation. In einer systematischen Übersichtsarbeit von Chalidis et al. wurden 16 Studien untersucht, wobei die Patienten nach Schädel-Hirn-Trauma ein HO- Rezidiv nach OP von 19% (KI 95% 0-40%) aufwiesen. Er postuliert, dass dies jedoch weniger auf den Zeitpunkt des chirurgischen Eingriffes, sondern vielmehr auf Dauer des Komas und Schwere des neurologischen Defizites zurückzuführen sei (107). Das Rezidivgeschehen nach operativem Eingriff ist auf einen ähnlichen Mechanismus zurückzuführen wie die initiale Entstehung der HO. Agarwal et al. wies in Mäusen nach Re-Operation eine ähnliche Proliferation mesenchymaler Stammzellen mit Expression von PDGFR-alpha (platelet-derived growth factor- alpha) sowie weitere Signalmechanismen nach, die zur Entstehung ektopter Ossifikation führen (108). Eine operative Versorgung in Kombination mit Indomethacin als NSAR und Radiotherapie zeigte in einer kleinen Patientenkohorte von Macheras et al. ein gutes Outcome bei weiterhin erhöhter Komplikationsrate von 15,4 Prozent (109). Denormandie et al. wiederum postuliert, dass vielmehr eine strenge OP-Indikation im multidisziplinären Setting sowie Expertise und genaue OP-

Planung, beispielsweise mit vorherigem 3D-CT-Scan die Komplikationsrate von neurogen verursachter HO deutlich senken (siehe Abbildung 5) (110).

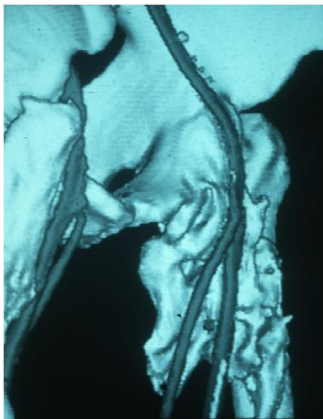


Abbildung 5: 3D Rekonstruktion einer CT-Aufnahme des Hüftgelenkes zeigt die räumliche Nähe der Femoralgefäße zur heterotopen Ossifikation (110)

Disodium etidronate

Disodium etidronate, kurz EHDP, oder Etidronsäure ist ein Bisphosphonat, welches die Mineralisierung und Bindung von Hydroxyapatit-Kristallen vermindert und wurde schon früh als Präventionsmöglichkeit heterotoper Ossifikation genutzt (111, 112). Die Studienlage ist jedoch zum Großteil veraltet und lückenhaft, EHDP soll jedoch eine signifikante Verminderung heterotoper Ossifikation zu bewirken, allerdings konnte bislang kein klarer Vorteil gegenüber Indomethacin als NSAR festgestellt werden, EHDP ist zudem deutlich kostenintensiver (112, 113).

Calcitonin

Calcitonin ist bisher nur sehr rudimentär untersucht worden. Der Wirkmechanismus funktioniert vermutlich analog zu den NSAR über die Inhibition von Thromboxan A2 und Prostaglandinen (114). Nachdem Gunal et al. die Wirkung bei Ratten nachgewiesen hatte führte er eine prospektive Studie mit 60 Patienten durch, bei der der Einsatz von Calcitonin eine signifikant bessere Wirkung zeigte als NSAR (115, 116). Weitere Studien müssen dies jedoch bestätigen, um einen Vorteil gegenüber NSAR zu beweisen.

Fazit

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass zwar Präventivmaßnahmen existieren, diese jedoch nur die Auftretenswahrscheinlichkeit verringern können. Leiden die Patienten bereits unter heterotoper Ossifikation, so ist der operative Eingriff bislang die einzige Möglichkeit diese zu behandeln. Re-Operationen tragen allerdings ein erhöhtes Risiko von Komplikationen und Rezidiven von HO.

2.1.5.Tiermodelle

Um den Pathomechanismus der Entstehung heterotoper Ossifikation zu verstehen und Behandlungskonzepte zu etablieren, sind Tiermodelle nötig. Diese Modelle müssen sicher reproduzierbar sein, eine hohe Inzidenz bezüglich der Auftretenswahrscheinlichkeit von HO bieten sowie eine Vergleichbarkeit mit dem Menschen aufweisen (117). Im Folgenden werden ausschließlich Modelle beschrieben, bei denen es sich um erworbene heterotope Ossifikation handelt.

Achillessehnen-Modell

Das erste Auftreten von heterotoper Ossifikation der Achillessehne wurde 1932 beobachtet und führte circa 20 Jahre später zur Entwicklung des ersten Modells zur Provokation heterotoper Ossifikation (118, 119). Heute ist das Modell mehrfach weiterentwickelt und basiert auf einer Durchtrennung der Achillessehne mit einem scharfen Instrument ohne nachträgliche Sehnennaht und wird hauptsächlich an Ratten und Mäusen durchgeführt (120). Eine ausführlichere Ausarbeitung der Methode findet sich im Kapitel 4.2.3.

Michelsson-Modell

Michelsson et al. waren in der Lage 1980 in einem Tiermodell an Kaninchen heterotope Ossifikation des Musculus quadrizeps femoris durch eine Abfolge von Immobilisation und Manipulation zu provozieren (121). Hierbei wurde das Kniegelenk der Tiere für fünf Wochen mit einer Schiene sowie elastischen Binden immobilisiert. Einmal täglich wurden die Schienen entfernt und das Kniegelenk passiv und in vollem Ausmaß bewegt. Radiologisch zeigten alle Tiere heterotope Ossifikation im Muskelgewebe (122). Mehrere Autoren verwendeten in Folge dieses Modell für experimentelle Studien hinsichtlich einer HO-Prophylaxe, wobei die genaue Pathophysiologie unklar

bleibt sowie dementsprechend auch die Vergleichbarkeit auf den Menschen (123, 124).

BMP-Modell

BMP-Modelle basieren auf Injektion oder chirurgische Implantation von Trägern, welche das bone morphogenetic protein enthalten und dadurch eine Knochenbildung provozieren. Zunächst injizierten Levander et al. im Jahre 1938 Knochen in alkoholischer Lösung in die Oberschenkelmuskulatur von Tieren und konnten in knapp einem Viertel der Fälle die Bildung von Knorpel und Knochen beobachten (125). Nachdem Lacroix et al. 1945 durch Injektion mit Bestandteilen von Epiphysenknochen aus neu geborenen Kaninchen hämatopoetisches Knochenmark im Muskel wachsen lassen konnte, warf sich die Frage nach dem Vorhandensein osteoinduktiver Faktoren auf (126). Auf dieser Basis entwickelte sich die sog. Auto-Injektion von Urist et al. aus dem Jahr 1965, bei der demineralisierte Knochenmatrix injiziert wurde (41). Hierbei wurde festgestellt, dass Bildung und Zusammensetzung der heterotopen Ossifikation mit der natürlichen Knorpel- und Knochenbildung übereinstimmt (127). Daraufhin wurde das Modell für die Untersuchung der Induktion von Knochengewebe häufig verwendet, bis schließlich 1979 die aktive Komponente von Urist et al identifiziert und als bone morphogenetic protein benannt wurde (42, 128). Mit der Extrahierbarkeit des Gens entwickelte sich das Modell sukzessive weiter. Das Protein kann nun isoliert direkt auf einem Träger operativ, oder die Expression durch genetische Implantation der codierenden Abschnitte über Viren sowie deren Plasmide, eingebracht werden. Aufgrund des hohen osteogenen Potentials wird hierbei in der Regel BMP Typ 2 oder 4 verwendet (129, 130). An diesem Modell lässt sich die Pathogenese der Knocheninduktion heterotoper Genese sowie potenziell präventive Maßnahmen untersuchen. Des Weiteren zeichnet sich das Modell durch eine gute Reliabilität aus. Die Schwächen des BMP-Modells zeigen sich in der unphysiologisch hohen Konzentration an osteogenetischen Faktoren, wie auch in der lokalen Anwendung. Die Bildung heterotoper Ossifikation im Menschen ist ein vielschichtiger Prozess, bei dem neben lokalen Faktoren auch systemische einen relevanten Einfluss haben (131).

Schneider Modell

Im Jahr 1998 entwickelten Schneider et al. ein kliniknahes Modell zur Entstehung heterotoper Ossifikation, bei denen an Kaninchen das operative Trauma einer Hüft-Endoprothetik nachempfunden wurde. Hierbei wurde unter anterolateralem Zugang

der Musculus gluteus maximus entlang der Muskelfasern aufgeteilt und der Markkanal des Femurs freigelegt. Entsprechend einer folgenden Implantation bei totaler Endoprothese erfolgte eine Aufweitung des Markkanals mittels eines Bohrers. In einer Kontrollgruppe wurde zusätzlich mittels Kocherklemme eine Ischämie des Musculus gluteus maximus und medius hervorgerufen. In beiden Gruppen zeigte sich eine hohe Inzidenz von heterotoper Ossifikation (132). Eine Übertragung des Modells auf andere Tierarten, insbesondere Ratten, erwies sich ebenfalls als möglich (133). Im Verlauf wurde dieses Modell häufig zur Erforschung von Pathogenese sowie zur Implementation präziser Präventionsmaßnahmen heterotoper Ossifikation nach Hüft-TEP verwendet (134-136).

Trauma Modell

Bereits vor circa 100 Jahren begannen die ersten Bemühungen ein Modell zu entwickeln, welches durch reine Trauma-Induktion verlässlich heterotope Ossifikation hervorrufen kann (131). Nach mehreren Fehlversuchen einiger Autoren gelang es Tannous et al. einen Versuchsaufbau zu entwickeln, bei dem ein hoher Anteil der Versuchstiere HO entwickelt hatten. Hierbei handelt es sich um ein Explosions-Amputations-Modell. Der unteren Extremität einer Maus wurde isoliert einer Explosionsverletzung distal einer vorgegebenen Amputationshöhe zugeführt. Durch eine spezielle Vorrichtung erlitt der restliche Körper des Tieres keinen Schaden (137). Dieses Modell spiegelt Kriegsverletzungen wider, bei denen in menschlichen Individuen eine hohe Inzidenz von heterotoper Ossifikation auftraten. Ein Vergleich der Gewebe von Ratten und Menschen nach Explosionstraumata ergab, dass ähnliche Konzentrationen an Signalmolekülen vorlagen. Ebenso waren die radiologischen Ergebnisse heterotoper Ossifikation vergleichbar. Das Modell der Explosions-Traumata ist somit hinsichtlich dieser Ätiologie gut auf den Menschen übertragbar (138).

Weitere Modelle

Im weiteren zeitlichen Verlauf wurden Modelle entwickelt, bei denen eine Kombination aus dem BMP-, und Trauma Modell heterotope Ossifikation hervorruft, wobei der genaue Pathomechanismus bislang unklar bleibt (139). Des Weiteren wurden diverse Injektionsmodelle entworfen, bei denen verschiedenste Substanzen injiziert wurden, welche HO hervorrufen sollten. Darunter befanden sich unter anderem Azid-Alkohole,

sowie Calciumchlorid (140). Aufgrund der fraglichen klinischen Relevanz lassen sich diese Modelle allerdings nur stark eingeschränkt nutzen.

2.2. Schädel-Hirn-Trauma

2.2.1. Definition

Ein Schädel-Hirn-Trauma (SHT) wird definiert als veränderte Hirnfunktion oder andere Hirnpathologie, welche durch einen äußeren Reiz hervorgerufen wird. Mit einer jährlichen Inzidenz von über 50 Millionen Fällen weltweit, wobei von einer hohen Dunkelziffer ausgegangen werden muss, zählt das Schädel-Hirn-Trauma zu einer der häufigsten Ursachen von Morbidität und Mortalität in allen Altersgruppen. Männer sind in der Regel häufiger betroffen (141-143). Eingeteilt wird das Schädel-Hirn-Trauma zum einen nach der Art der Verletzung in ein offenes SHT mit defekter Dura mater, sowie ein geschlossenes SHT mit intakter Dura mater. Man unterscheidet zusätzlich stumpfe sowie penetrierende Verletzungen und fügte diesen beiden Mustern im Rahmen von Kriegsgeschehnissen Explosionsverletzungen zu, da diese aufgrund der Bildung von Druckwellen ein anderes Verletzungsmuster präsentieren (143). Weiterhin teilt man die Verletzung nach der Schwere ihres klinischen Erscheinungsbildes ein. Hierbei nutzt man die Glasgow Coma Scale (siehe Tabelle 1). Hierbei werden sowohl die motorischen als auch kognitiven Fähigkeiten des Patienten geprüft und eine Einteilung in mild (13-15), moderat (9-12) und schwer (<9) durchgeführt. Klinisch kann sich ein Schädel-Hirn-Trauma neben eines pathologischen GCS auch durch Krampfanfälle, Übelkeit, Erbrechen, Kopfschmerzen sowie Verhaltensauffälligkeiten präsentieren (144).

Augenöffnen	Beste verbale Reaktion	Beste motorische Reaktion	Punkte
	Orientiert	Auf Aufforderung Gezielte Abwehr	6 5
Spontan	Desorientiert	Ungezielte Abwehr	4
Auf Aufforderung	Unzusammenhängende Wörter	Beugesynergismen	3
Auf Schmerzreiz	Unverständliche Laute	Strecksynergismen	2
Keine	Keine	Keine	1

Tabelle 1: Glasgow Coma Scale

2.2.2. Primäre und Sekundäre Schädigung nach Schädel-Hirn-Trauma

Entsprechend der unterschiedlichen Pathophysiologie unterscheidet man primäre von sekundären Schäden nach SHT. Primäre Schäden treten direkt nach dem traumatischen Ereignis auf und betreffen neuronale Axone, Oligodendrozyten sowie Blutgefäße. Der Ort der Verletzung liegt bei direkter Gewalteinwirkung meist fokal an der Stelle des Traumas, wobei durch Kraftübertragung zusätzlich eine Verletzung auf der Gegenseite des Gehirns stattfinden kann. Hierbei spricht man von einer coup-contre-coup-Verletzung. Auch eine diffuse Verletzung des Gehirns ist möglich, ursächlich ist hierbei meist ein Accelerations-Decelerations-Trauma (144). Primäre Schädigungen führen zum Untergang von Neuronen, Bildung von Ödemen und können Hirnblutungen auslösen (145).

Initiiert vom primären Trauma führt das sekundäre Trauma über Stunden bis Jahre hinweg durch komplexe molekulare Mechanismen zur weiteren Neurodegeneration (siehe Abbildung 6) (146). Zentrale Punkte des Pathomechanismus sind die Schädigung der Blut-Hirn-Schranke (BHS) sowie oxidativer Stress. Hierdurch werden unter anderem exzitatorische Neurotransmitter wie Glutamat und Aspartat ausgeschüttet, zusätzlich werden Mitochondrien geschädigt (147-149). Dies führt über komplexe Signalkaskaden zu einer erhöhten Freisetzung von Calcium, freien Radikalen und Stickstoffoxid, folglich zu apoptotischem Zelluntergang und damit zu einer weiteren Neurodegeneration (149-151). Zusätzlich erfolgt durch die defekte Blut-Hirn-Schranke eine Invasion von aktivierten Immunzellen in das Parenchym des Gehirns und löst dort eine Neuroinflammation aus. Diese Leukozyten aktivieren das Komplementsystem und setzen Interleukine sowie Chemokine frei, welche den inflammatorischen Prozess wiederum verstärken können und einen programmierten Zelltod initiieren. Einige dieser Zytokine sind jedoch auch neuroprotektiv und für die Regeneration des betroffenen Areals von großer Bedeutung. (152, 153).

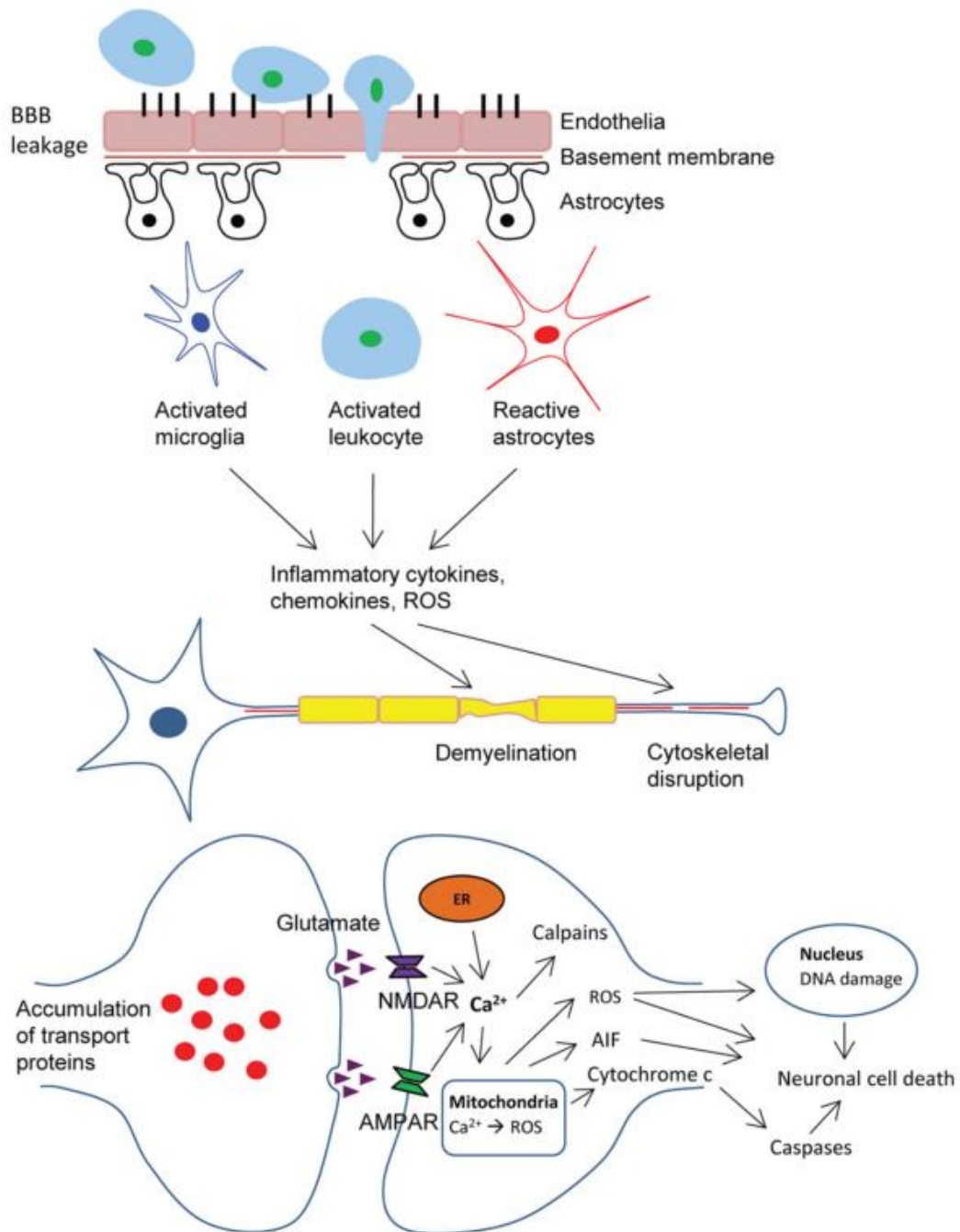


Abbildung 6: Molekulargenetische Prozesse nach Schädel-Hirn-Trauma (141)

2.2.3. Einfluss auf heterotope Ossifikation

In einer multizentrischen Studie von Bargellesi et al. zeigten von den 689 eingeschlossenen Patienten mit schwerem Schädel Hirn Trauma 13,6% heterotope Ossifikation von Gelenken. Diffuses Trauma, männliches Geschlecht, lange Komazeiten, die Notwendigkeit des Einsatzes maschineller Beatmung sowie Spastiken erhöhten das Risiko für HO (76). Neben der Bildung von heterotoper

Ossifikation nach Schädel-Hirn-Traumata zählt zusätzlich die Bildung von HO nach Wirbelsäulentrauma zu neurogener HO (NHO). Die ablaufenden Signalkaskaden ähneln denen der rein traumatischen HO stark, bestimmte Faktoren können jedoch durch neurogene Prozesse verstärkt werden. Einen Anteil trägt hierbei die geschädigte Blut-Hirn-Schranke. Hierüber können Zytokine aus dem Gehirn in den Kreislauf austreten und über komplexe Prozesse eine systemische Wirkung hervorrufen, wie beispielsweise heterotope Ossifikation (154). So konnte in Studien eine Erhöhung von HIF-1 α bei begleitendem Schädel-Hirn-Trauma nachgewiesen werden (155). Dieser Wachstumsfaktor ist ein wichtiger Treiber im Rahmen der Angiogenese, welche wiederum essenziell für die Entwicklung von Knochen ist (55, 156). Der komplexe Pathomechanismus ist mit seinen gegenseitigen Wechselwirkungen noch nicht vollständig verstanden. Die bisherigen Studienergebnisse hierzu sind in Kapitel 6.2.1 aufgeführt.

2.2.4. Ziel der Arbeit

Ziel der Arbeit ist es die Substanz Echinomycin zu testen hinsichtlich ihrer hemmenden Wirkung auf die Bildung heterotoper Ossifikation. Da es sich bei der Substanz um einen Blocker der Angiogenese handelt wird zudem die Gefäßbildung zur Zeit der HO-Bildung untersucht und zwischen den Gruppen verglichen. Schädel-Hirn-Traumata stehen im Verdacht heterotope Ossifikation zu verstärken. Da diese Traumata proangiogenetische Faktoren freisetzen liegt die Vermutung nahe, dass dies einer der entscheidenden Mechanismen ist. Die vorliegende Arbeit prüft dies und ergänzt, ob Echinomycin diesen Wirkmechanismus unterdrücken kann. Hiermit wäre Echinomycin nicht nur ein mögliches Medikament und bei Patienten heterotope Ossifikation zu verringern, sondern könnte ganz gezielt bei Patienten eingesetzt werden, die im Rahmen beispielsweise eines Polytraumas, zusätzlich ein Schädel-Hirn-Trauma erlitten. Die Verringerung heterotoper Ossifikation kann hierbei nicht nur die Mortalität senken, sondern auch die Lebensqualität der Patienten deutlich verbessern.

3. Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1. Tiere

Zur Durchführung der Studie wurden männliche Mäuse der Gattung C57BL/6 (Charles River, Köln), auch „black 6“ genannt, verwendet. Die Entscheidung für männliche Tiere basiert auf einer in Studien nachgewiesenen erhöhten Inzidenz für das Vorkommen von Osteoprogenitorzellen und damit auch von HO (72). Die Tiere wurden im Translational Animal Research Center (TARC) der Universitätsmedizin Mainz in standardisierten Käfigen zu maximal fünf Tieren untergebracht, mit einem zwölf Stunden Tag/Nacht-Rhythmus und einer konstanten Temperatur von 21°C. Sie erhielten uneingeschränkten Zugang zu Trockenpellets und Wasser, eine Reinigung der Käfige fand wöchentlich statt. Studiendesign sowie Unterbringung, Untersuchungsmethoden und postoperative Betreuung erfolgten in Absprache und Zustimmung des zuständigen Ethik-Komitees (DE RLP 23 177-07 / G 15-1-095).

Zum Zeitpunkt der Operation wogen die Mäuse im Mittelwert 24,5 g mit einer Spanne von 21,2 g bis 30,8 g und hatten ein Alter von acht bis zehn Wochen.

Die Euthanasie erfolgte je nach Gruppenzugehörigkeit durch zervikale Dislokation nach inhalativer Sedierung mit Isofluran oder als Ausbluten im Rahmen der Perfusion mit Mikrofil unter subkutaner Vollnarkose.

3.1.2. Pharmazeutika

Isoflurane (Florane[®], Baxter, Deerfield Il, USA) Inhalation

Medetomidine (Dorbene[®], Pfizer, New York NY, USA) 0,5 mg/kg

Midazolam (Dormicum[®], Roche, Basel, Switzerland) 5 mg/kg

Fentanyl (Fentanyl-Janssen[®], Johnson and Johnson, New Brunswick, NJ, USA) 0,05 mg/kg

Atipamezole (Antisedan[®], Pfizer, New York NY, USA) 2,5 mg/kg

Flumazenil (Anexate[®], Roche, Basel, Switzerland) 0,5 mg/kg

Histoacryl® (B. Braun, Melsungen, Deutschland) 0,5 mg/kg

Tramadol (Grünenthal GmbH, Aachen, Deutschland) 0,5 mg/ml Trinkwasser

3.1.3. Operationsmaterial

MouseScrew RISystem, Davos Schweiz

Controlled cortical impact, Universitätsmedizin Mainz

3.1.4. Bildgebende Diagnostik

Röntgen

Kleintier Röntgengerät MX20; Faxitron Bioptics LLC, Tucson, AZ, USA; mit 35kV bei einer Durchleuchtungszeit von fünf Sekunden

Computertomographie

Perfusion: Microfil® Perfusion; carver flow tech inc Carver, MA USA

Micro-CT: Viva CT 80; Scanco Medical, Wangen-Brüttisellen, Schweiz

3.1.5. Bildbearbeitung und Auswertung

ImageJ NIH; Bethesda, MD, USA

Mimics Medical; Materialize, Leuven, Belgien

SPSS-Software (Version 23) für MicMicrosoft; IBM, Armonk, NY, USA

3.2. Methoden

3.2.1. Einteilung

Die Mäuse wurden in acht Gruppen, je nach Art des Eingriffs unterteilt (siehe Abbildung 7). In jeder dieser Gruppe wurden 15 Mäuse behandelt, wovon jeweils fünf Mäuse nach 5, 35 oder 56 Tagen abgesetzt und untersucht wurden. Hieraus ergaben sich 120

geplante Operationen. Die vorliegende Arbeit befasst sich ausschließlich mit der Versuchsgruppe nach Tenotomie.

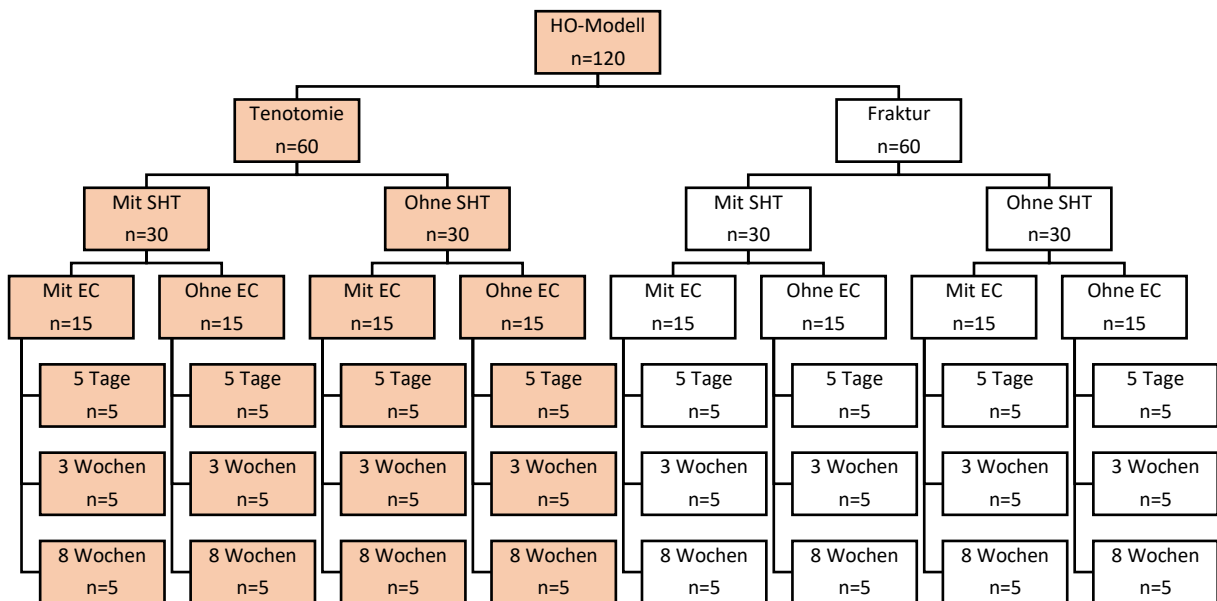


Abbildung 7: Einteilung der Versuchstiere im Studiendesign

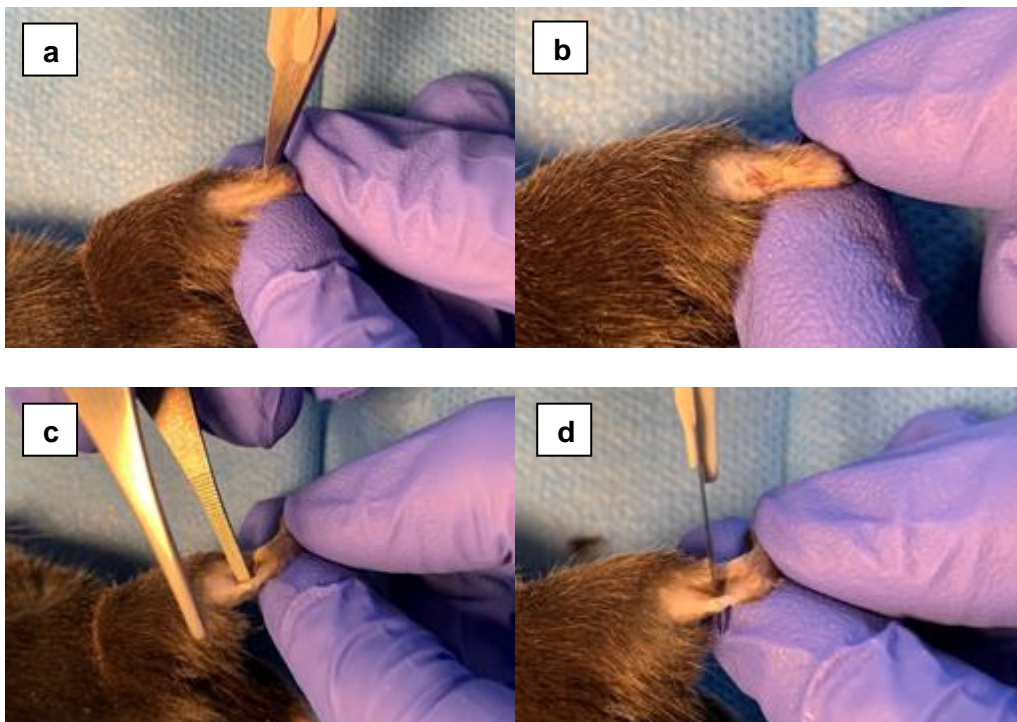
3.2.2. Narkose und perioperatives Management

Die Operationen wurden unter Vollnarkose durchgeführt. Zur Narkoseeinleitung wurde Isofluran inhalativ eingesetzt. Mit 0,05 mg/kg Fentanyl, 5 mg/kg Midazolam und 0,5 mg/kg Medetomidin in Form einer subkutanen Applikation wurde die Narkose aufrechterhalten. Die Kontrolle des Zwischenzehen- und Schwanzspitzenreflexes diente der Überprüfung der gewünschten Narkosetiefe. Sobald die Reflexe erloschen waren erhielten die Mäuse einen Augenschutz mit Dexpanthenol-Salbe. Längere operative Eingriffe wurden auf einer Wärmematte durchgeführt um ein Auskühlen der Maus zu verhindern. Durch systematische Ohrlochung konnte die spätere Zuordnung der Versuchstiere gewährleistet werden. Zur Antagonisierung der Narkose applizierten wir 2,5 mg/kg Atipamezol und 0,5 mg/kg Flumazenil subkutan. Während der Aufwachphase wurden die Mäuse unter eine Wärmelampe gelegt und nach eigenständiger Mobilisation in ihre Box umgesetzt. Zur postoperativen Schmerztherapie wurden 0,5 mg/ml des Opioid-Analgetikums Tramadol ins Trinkwasser appliziert. Eine antiinflammatorische Therapie erfolgte nicht. Der Gesundheitszustand der Mäuse wurde durch Prüfung und Dokumentation von

Gewicht, Verhalten und Mobilität, sowie Belastung des operierten Beines geprüft. Die Kontrollen erfolgten an Tag 1,2,3,5,7,10,14 sowie im weiteren Verlauf wöchentlich.

3.2.3.Tenotomie

Die Tenotomie der Achillessehne ist in der Literatur ein häufig genutztes Vorgehen zur Provokation von heterotoper Ossifikation im Mausmodell. Zur Operation wurde die Maus in Bauchlage gelagert und der rechte Unterschenkel und Fuß in Extension fixiert (siehe Abbildung 8a). Es erfolgte ein Hautschnitt lateral entlang der Achillessehne, welche daraufhin medial freigelegt und mit einem Schnitt durchtrennt wurde (siehe Abbildung 8b bis d). Eine Verletzung der benachbarten Sehne des M. tibialis posterior ist hierbei zu vermeiden. Das deutliche Auseinanderweichen der Sehnenanteile mit komplettem Verschwinden des proximalen Anteils weist auf eine vollständige Durchtrennung der Achillessehne hin (siehe Abbildung 8e). Abschließend wurde der Hautschnitt mit Einzelknopfnähten versorgt (siehe Abbildung 8f).



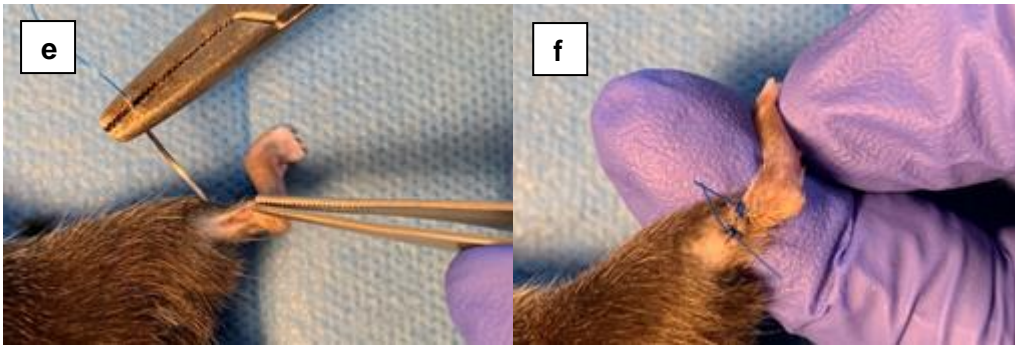
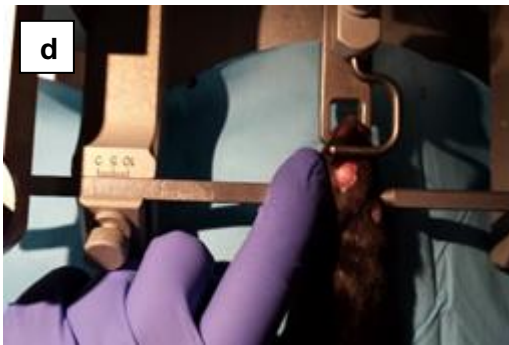
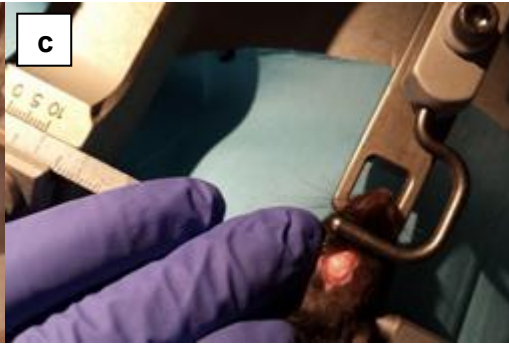
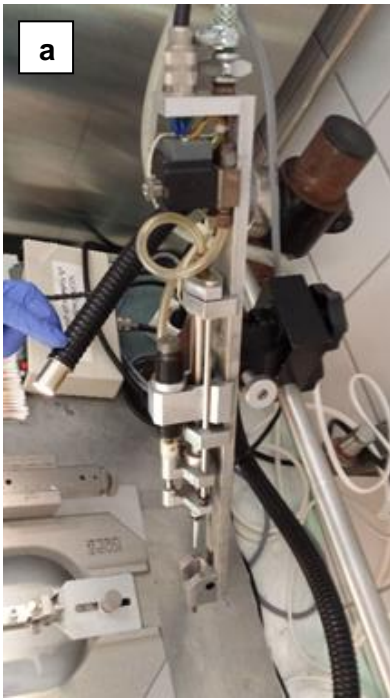


Abbildung 8: operative Tenotomie. a) laterale Schnittführung b) Sicht auf die Achillessehne c) Freipräparieren der Achillessehne d) Durchtrennung der Achillessehne e) Sichtkontrolle f) Verschluss durch Einzelknopfnähte

3.2.4. Schädel-Hirn-Trauma

Ziel des operativen Vorgehens war ein möglichst einheitliches, gedecktes Schädel-Hirn-Trauma ohne Eröffnung der Dura mater mit ausschließlicher Beteiligung der linken Hemisphäre zu provozieren. Hierzu wurde das Vorgehen mittels Trepanation und controlled cortical impact (CCI) gewählt (siehe Abbildung 9a). Die Maus wurde in Bauchlage in eine Fixations-Vorrichtung gebracht, die eine gute Stabilität des Kopfes durch Fixierung der Zähne und des Mastoides beidseitig erreicht (siehe Abbildung 9b). Über einen Hautschnitt entlang der Sagittalnaht wurde die linke Hemisphäre freigelegt, ein Abkratzen des Periostes mit dem Skalpell verhinderte das Einziehen und Verkleben in den Bohrer. Mittels eines glatten, 4 mm breiten Hohlbohrers konnte der Schnitttrand auf dem Schädel lateral der Sagittalnaht, zwischen Sutura coronalis und Sutura lambdoidea, markiert werden (siehe Abbildung 9c und d). Diese Markierung wurde mit einem feinen Diamant-Gravierbohrer bis zur Dura nachgefahren, sodass der Schädelknochen abgenommen werden konnte (siehe Abbildung 9d bis f). Die Maus wurde in der Fixierung unter eine controlled cortical impact-Vorrichtung verbracht. Nach Aufbringen von Paraffin auf die Dura Mater, um ein Verkleben und damit Einreißen der harten Hirnhaut zu verhindern, wurde die Führung des Bolzens aufgelegt und der Bolzen mittels Druckluft 1 mm tief und mit einer Geschwindigkeit von 6,91 m/s bis 7,05 m/s abgeschossen (siehe Abbildung 9g). Die Verweilzeit des Bolzens betrug hierbei stets 200 ms. Nach dem Trauma konnten eine Schwellung des Gehirns, sowie leichtere Blutungen beobachtet werden (siehe Abbildung 9h). Die Schädelplatte wurde der Dura wieder aufgesetzt und mit Histoacryl® fixiert (siehe Abbildung 9i-k). Der Verschluss der Haut erfolgte mittels Einzelknopfnähten.



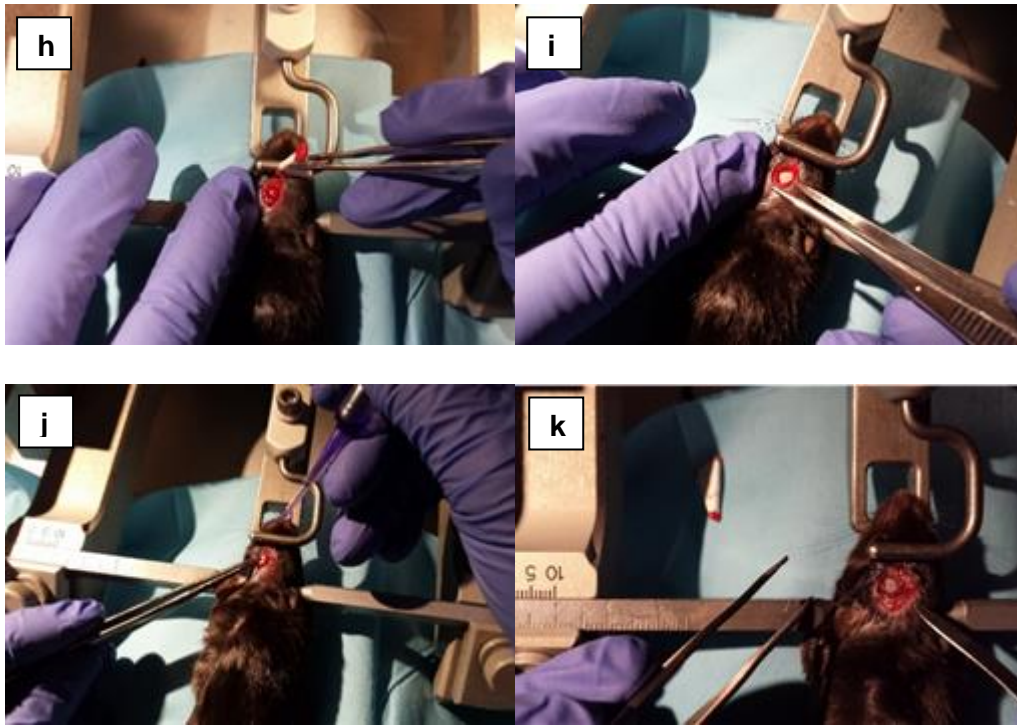


Abbildung 9: operative Beibringung eines Schädel-Hirn-Traumas a) controlled cortical impact b) Einspannen in Stabilisationsvorrichtung c) Hautschnitt und Markierung der Trepanationsstelle d) Freipräparierung e) Durchbohren der Trepanationsstelle f) Blick auf intakte Dura mater g) Positionierung des CCI-Gerätes h) Stillen der Blutung i) Aufbringung des abgenommenen Schädelknochens j) Fixierung mittels Gewebekleber k) Blick auf verschlossenes Schädeldach

3.2.5. Echinomycin-Injektion

Nach Protokoll wurde einem Anteil an Mäusen subkutan Echinomycin injiziert. Zur Stressreduktion erfolgte dies in der anhaltenden postoperativen Narkose, beziehungsweise im Versuchsverlauf unter inhalativer Narkose mit Isofloran. Mit einprozentiger Dimethylsulfoxid (DMSO)- Lösung wurde eine Verdünnung von 0,1 mg/ml angesetzt. Injiziert wurden 1µg pro Gramm Maus. Um eine Manipulation durch das Tier zu verhindern erfolgte die Verabreichung im Bereich des oberen Rückens.

3.2.6. Bildgebende Diagnostik

Röntgen

Röntgenbilder wurden sowohl im Rahmen der chirurgischen Eingriffe, als auch in der Verlaufskontrolle angefertigt. Waren die Mäuse hierbei nicht bereits narkotisiert erhielten sie eine inhalative Kurznarkose mit Isofluran. Für die Röntgenaufnahmen verwendeten wir 35kV bei einer Durchleuchtungszeit von 5 Sekunden.

Micro-CT und Perfusion

Um in den postmortalen Micro-CT-Aufnahmen die Gefäße sichtbar zu machen, wurde einem Teil der Mäuse Microfil® ins Gefäßsystem perfundiert. Hierzu wurden die Mäuse nach oben beschriebener Vorgehensweise tief narkotisiert und mittels Thorakotomie das Herz freigelegt. Über eine 16G Kanüle im linken Ventrikel wurde unter Zuhilfenahme eines Perfusors Microfil® mit einer Flussrate von 30 ml/h injiziert. Zum Abfließen des Blutes aus dem Gefäßsystem wurde ein Schnitt in den rechten Ventrikel gesetzt. Die gelungene Perfusion konnte über die sichtbare Gelbfärbung der Gefäße spät versorgter Organe, wie beispielsweise der Leber überprüft werden (siehe Abbildung 10). Anschließend erfolgte die Abtrennung der zu untersuchenden Körperteile. Nach Fixierung in Histofix® wurden Micro-CT Bilder sowohl vor als auch nach Dekalzifikation mit Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), angefertigt.

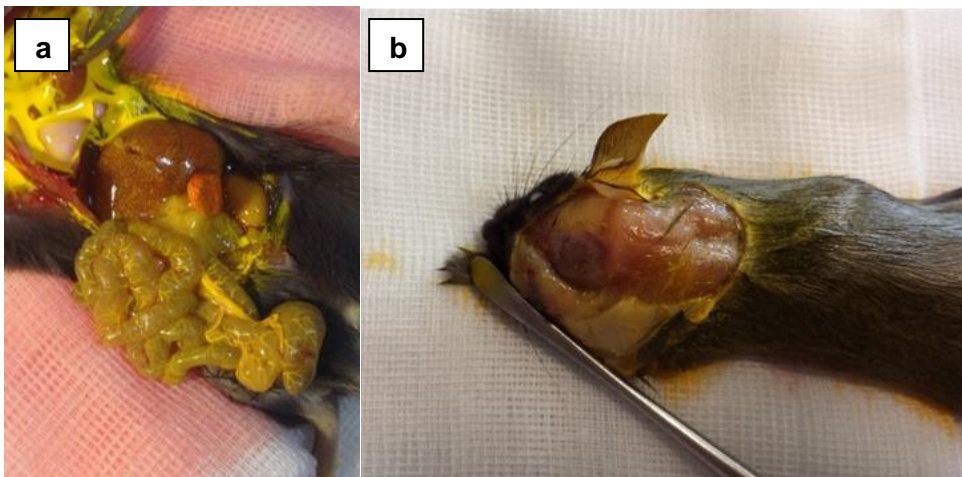


Abbildung 10: Tiere nach Perfusion mit Microfil® a) Situs b) Schädel

3.2.7. Digitale Auswertung

Röntgenbilder

Zur Auswertung der Röntgenbilder diente das Programm ImageJ. Um aus den vorliegenden JPEG Aufnahmen auswertbare Messungen gewinnen zu können, wurden zunächst alle Röntgenbilder der Studie, in denen Osteosynthesematerial sichtbar war, ausgemessen. Aus der geeignetsten Aufnahme wurde die bekannte Größe des Femurnagels auf die Menge der Pixel umgerechnet und somit eine Skala von 61,0936 pixel/mm für alle Röntgenaufnahmen erstellt (siehe Abbildung 11). Im

Anschluss wurden alle Röntgenbilder auf heterotope Ossifikation geprüft. Einer händischen Umrandung der Knochenneubildung und anschließenden Füllung konnte schließlich die Messung der Fläche durch das Programm folgen (siehe Abbildung 12).

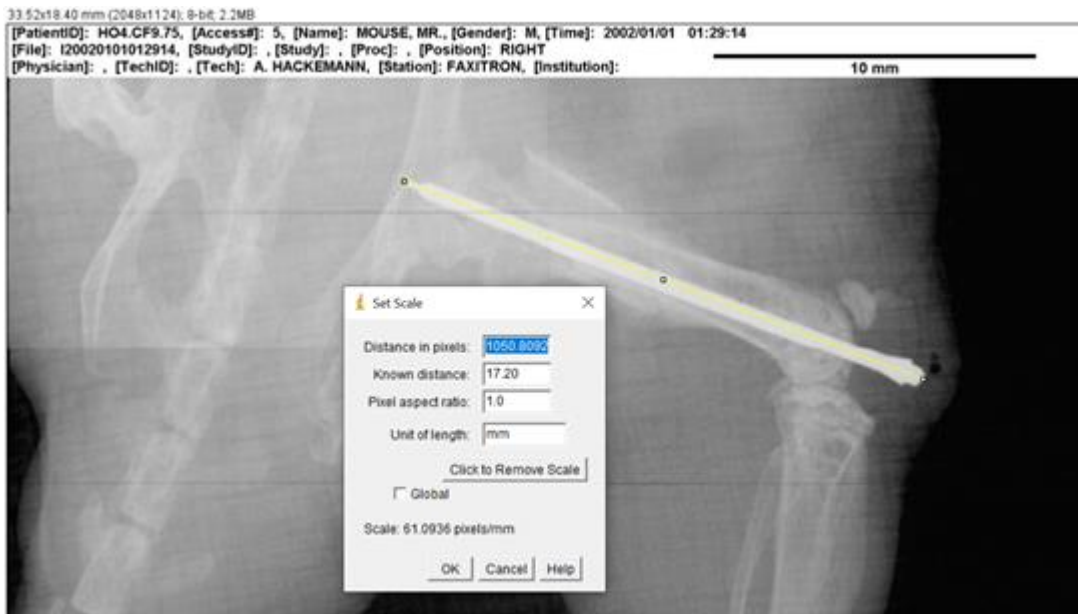


Abbildung 11: Erstellen einer Skalierung in Pixel/mm in ImageJ





Abbildung 12: Röntgen des Unterschenkels von Versuchstier 58 am 56. Tag post-OP a) nativ b) nach Bearbeitung und Ausmessung mittels ImageJ

Computertomographische Analyse

Die μ CT-Aufnahmen wurden unter Zuhilfenahme des Programms Materialise Mimics zu 3D Bildern rekonstruiert und Volumen- und Abstandsmessungen durchgeführt (siehe Abbildung 13). Zur Knochendarstellung diente eine automatisierte Detektion des Programms, bei der zugehörige Knochenteile markiert und ab 5039 Hounsfield unit (HU) codiert und rekonstruiert wurden. Die aufgrund der Kontrastmittelanreicherung mitdargestellten Gefäße erforderten eine händische Entfernung. Im Verlauf wurde die heterotope Ossifikation detektiert und einzeln markiert. Die dabei erfolgte Messung ergab das Volumen. Indem die HO-Anteile in einer zusätzlichen Untersuchung ab einem Minimum von 5000HU sowie ab einem Minimum von 9000HU markiert und rekonstruiert wurden, konnte durch einen Vergleich ein Rückschluss auf die unterschiedliche Dichte des neu gebildeten Knochens gezogen werden (siehe Abbildung 14). Die Gefäßdarstellung folgte der Dekalzifizierung der Beine mittels EDTA über ca. drei Wochen. Der Großteil des Knochens, oft mit Ausnahme der Fußknochen, wurde hierbei erfolgreich entfernt. Die Gefäßdarstellung erfolgte durch Markierung aller Anteile ab einer bestimmten Hounsfield unit, Thresholding, genannt. Hierbei wurde das Minimum auf 1500HU festgelegt, um eine Balance zwischen erfolgreicher Markierung der Gefäße bei einem Minimum an Artefakten zu erreichen. Ein endgültiges Entfernen der Artefakte erfolgte durch händische Markierung der Gefäße mit darauffolgender Darstellung aller damit

über sechs Pixel verbundenen, über das Thresholding ausgewählten Anteile (siehe Abbildung 15). Hiernach wurde erneut eine Messung des gesamten Gefäßvolumens berechnet. Für die Anzahl der im Bereich der HO vorhandenen Gefäße wurde von der Ferse eine vier mm lange Linie nach proximal eingezeichnet und die Gefäße in der transversalen Ebene auf Höhe des Durchtrennungsortes der Achillessehne gezählt (siehe Abbildung 16).

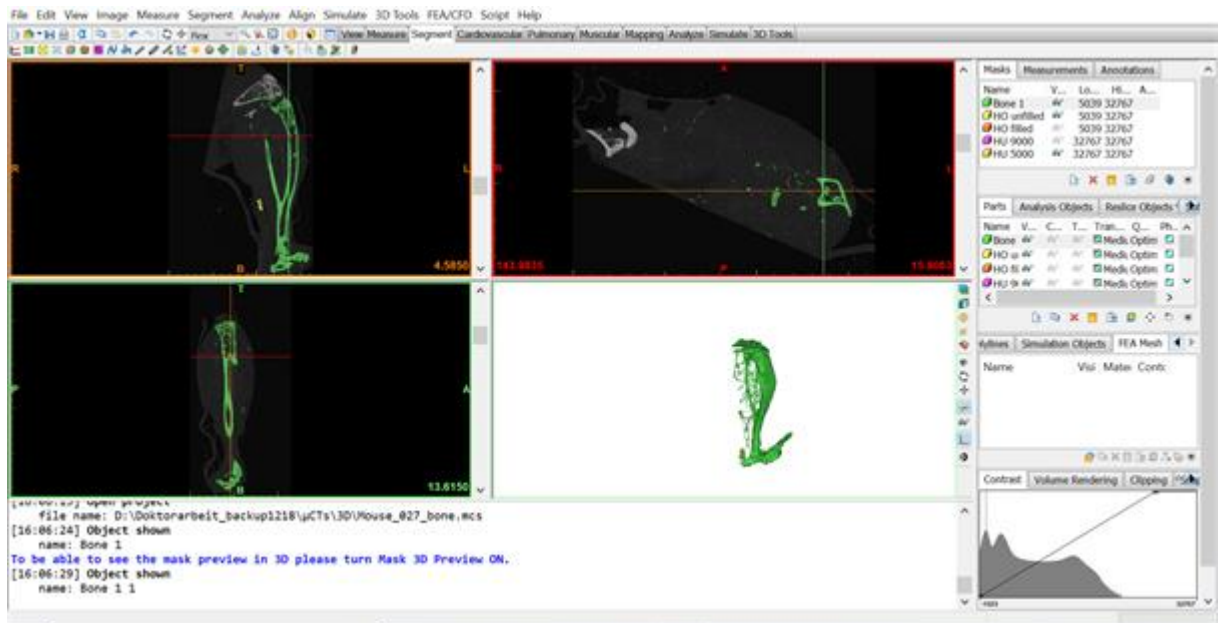


Abbildung 13: Schaltfläche Mimics Medical

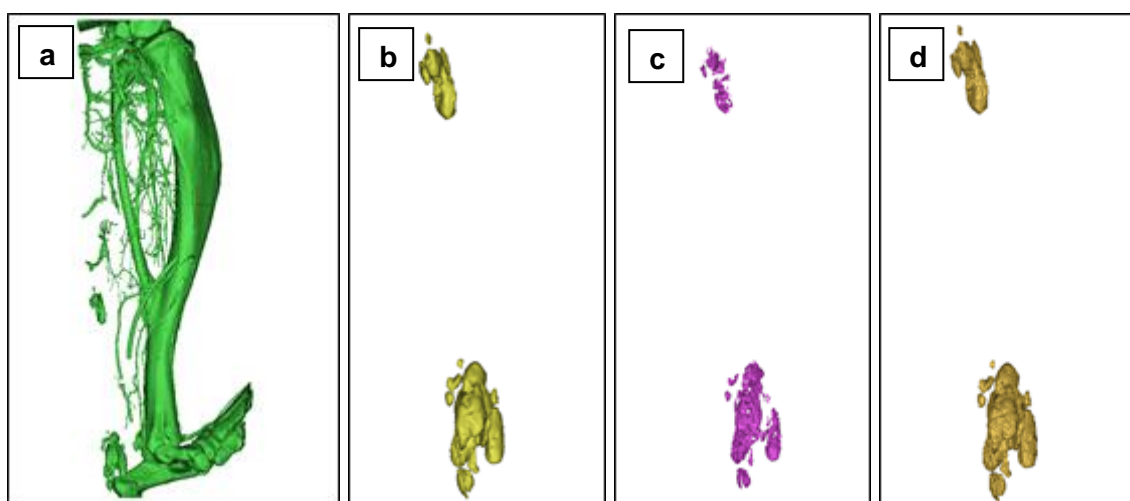


Abbildung 14: Unterschenkel von Versuchstier 27 nach Tag 56 post-OP a) 3D Rekonstruktion Knochen und Gefäße b) HO c) HO ab 9000 HU d) HO ab 5000 HU

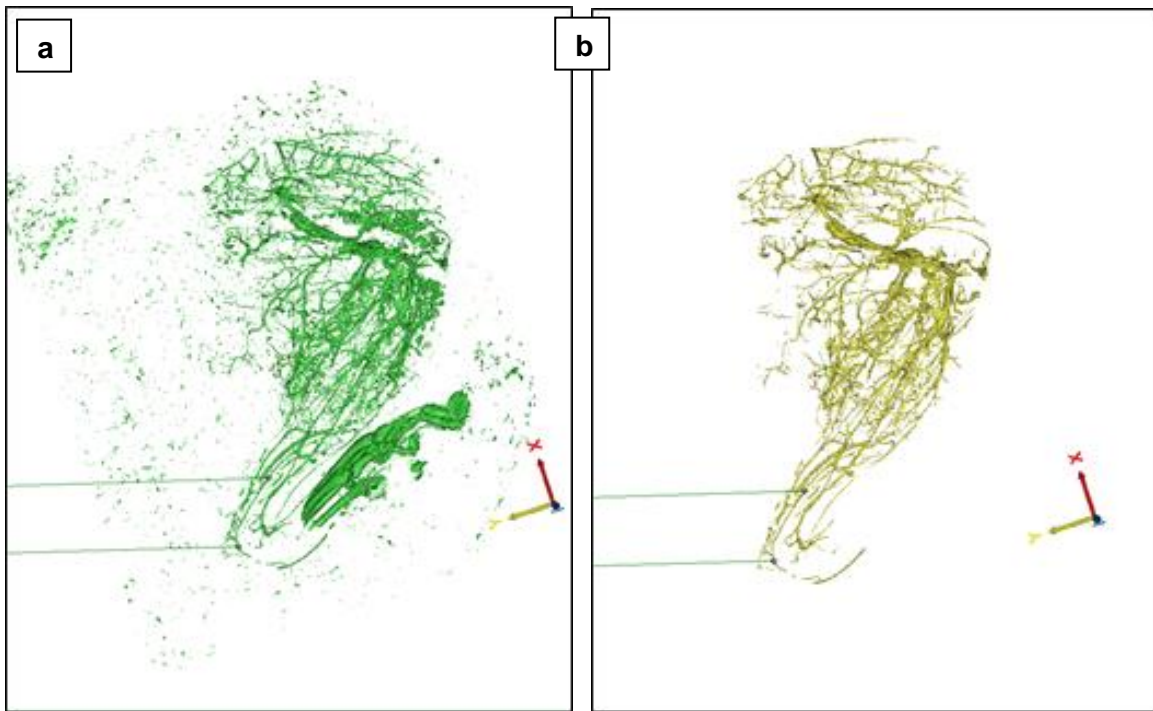


Abbildung 15: Gefäßrekonstruktion des Unterschenkels von Versuchstier 27 a) initiale Aufnahme b) nach Artefaktbereinigung



Abbildung 16: Gefäßmarkierung des Unterschenkels von Versuchstier 27 auf Höhe der Tenotomie

3.2.8. Statistische Analyse

Für die statistische Auswertung wurde neben einer deskriptiven Statistik eine Mann-Whitney-U Testung für unabhängige Stichproben verwendet. Das Signifikanzniveau wurde auf einen p-Wert $<0,05$ festgelegt. Zur Durchführung der statistischen Untersuchung diente die Software SPSS (Version 23) für Microsoft.

4. Ergebnisse

Im folgenden Kapitel werden die Ergebnisse der Studie dargelegt. Neben Komplikationen des Versuchsaufbaus werden auch die deskriptiven und statistischen Auswertungen präsentiert. Diese beziehen sich auf den Einfluss von Echinomycin und Schädel-Hirn-Trauma auf Größe und Dichte heterotoper Ossifikation sowie die Angiogenese im Bereich der Läsion.

Versuchsablauf

In dieser Studie wurden insgesamt 63 Mäuse operiert. Drei Mäuse verstarben, wobei zwei Tiere intraoperativ durch fragliche Eröffnung der Dura mater am Schädel-Hirn-Trauma und ein Tier nach Schädel-Hirn-Trauma am zweiten postoperativen Tag ohne klare Ursache verstarb. Die Versuchstiere wurden daraufhin ersetzt, sodass das Versuchsprotokoll entsprechend durchgeführt werden konnte.

Kam es zu einem postoperativen Gewichtsverlust, insbesondere bei Versuchstieren mit kombiniertem Schädel-Hirn-Trauma, konnte nach dem spätestens zweiten postoperativen Tag unter normalem Ess- und Trinkverhalten eine Gewichtsnormalisierung und im weiteren Verlauf eine Gewichtszunahme beobachtet werden.

Tenotomie

Die Versuchstiere konnten das Bein unmittelbar postoperativ belasten. Komplikationen wie Infektionen oder Wunddehiszenzen traten nicht auf. Bei einigen Tieren kam es direkt postoperativ zu einer Schwellung, welche sich in der Regel innerhalb eines Tages rückläufig zeigte. Spätere Komplikationen umfassten Schwellung und kleinere Wunden, die bei wenigen Tieren über mehrere Tage hinweg anhielten und am ehesten auf eine Fehlbelastung nach Tenotomie zurückzuführen sind.

Schädel-Hirn-Trauma

Das Zufügen des Schädel-Hirn-Traumas führte in zwei Fällen zu intraoperativem Versterben und waren mit ungewöhnlich starkem Trauma verbunden. Keines der Tiere zeigte bezüglich Mobilität und Verhalten neurologische Auffälligkeiten, welche auf das Schädel-Hirn-Trauma zurückzuführen wären. Allerdings entwickelte ein Tier im Verlauf an der Operationsstelle Abszesse, welche operativ revidiert und gespült werden

mussten. Hierbei wurden sowohl Narkose als auch postoperative Nachsorge entsprechend der üblichen Vorgangsweise durchgeführt.

Echinomycin-Injektion

Die Injektionen führten im Verlauf zunächst zu Verhärtungen an der Injektionsstelle, meist nach sieben bis vierzehn Tagen. Später bildeten sich verkrustete Ulzerationen aus, weshalb bei vier Tieren eine operative Revision erfolgen musste.

4.1. Einfluss von Schädel-Hirn-Trauma auf heterotope Ossifikation

4.1.1. Fläche im Röntgenbild

Zunächst soll der Einfluss von Schädel-Hirn-Trauma auf Bildung und Größe heterotoper Ossifikation bei Tenotomien untersucht werden, wobei im Folgenden die Fläche der HO im Röntgenbild zu verschiedenen Zeitpunkten verglichen wird. Hierzu werden die Tiere selektiert, die kein Echinomycin erhalten haben. Betrachtet man die Ergebnistabelle (siehe Tabelle 2) und die deskriptive Statistik (siehe Tabelle 3) fällt auf, dass in der reinen Tenotomiegruppe bereits drei Tiere nach 28 Tagen und alle Tiere nach 35 Tagen HO gebildet hatten. Die Flächen heterotoper Ossifikation zeigen sich bei einer Standardabweichung von 0,3 sehr ähnlich. Bei zusätzlichem Schädel-Hirn-Trauma wiesen die Tiere eine tendenziell spätere Bildung von heterotoper Ossifikation auf. Ein Versuchstier entwickelte keine ektope Knochenbildung, wohingegen ein Versuchstier eine besonders starke Ausprägung aufwies. Hieraus ergibt sich auch die hohe Standardabweichung von 1,33 zum Zeitpunkt von 56 Tagen. Um das prozentuale Wachstum zu vergleichen, werden die Tiere im Verhältnis von Tag 49 zu Tag 56 post-OP betrachtet, da hier alle Tiere, welche im Verlauf HO gebildet hatten, bereits ektope Knochenbildung im Röntgenbild manifestiert hatten. Mäuse ohne SHT zeigten eine Steigerung von 33,1%, Mäuse mit SHT (hierbei wurde das Tier ohne HO-Bildung herausgerechnet) von 64,9%. Vergleicht man die Fläche aller Versuchstiere nach Versuchsende wiesen die Tiere ohne begleitendes SHT 70,9% mehr HO auf als die Gruppe mit SHT.

Gruppe	Versuchstier	7d	14d	21d	28d	35d	49d	56d
Teno	26	0	0	0	0,186	0,756	1,410	1,618
	27	0	0	0	0	0,449	1,316	1,646
	28	0	0	0	0,089	0,408	1,277	1,849
	29	0	0	0	0	0,039	0,607	1,063
	30	0	0	0	0,059	0,434	1,331	1,729
Teno + SHT	86	0	0	0	0,069	0,594	2,172	3,275
	87	0	0	0	0	0,155	0,455	0,652
	88	0	0	0	0	0	0,077	0,249
	89	0	0	0	0	0	0,102	0,450
	90	0	0	0	0	0	0	0

Tabelle 2: Ergebnistabelle zum Einfluss von Schädel-Hirn-Trauma auf die Fläche heterotoper Ossifikation nach Tenotomie im Röntgenbild

SHT	Tage post-OP	N	Minimum	Maximum	Mittelwert	Standardabweichung
nein	Fläche_28d	5	0	0,186	0,067	0,077
	Fläche_35d	5	0,039	0,756	0,417	0,255
	Fläche_49d	5	0,607	1,410	1,188	0,328
	Fläche_56d	5	1,063	1,849	1,581	0,303
	Gültige Werte (Listenweise)	5				
ja	Fläche_28d	5	0	0,069	0,014	0,031
	Fläche_35d	5	0	0,594	0,150	0,257
	Fläche_49d	5	0	2,172	0,561	0,917
	Fläche_56d	5	0	3,275	0,925	1,336
	Gültige Werte (Listenweise)	5				

Tabelle 3: Deskriptive Statistik zum Einfluss Schädel-Hirn-Traumata auf die Fläche heterotoper Ossifikation nach Tenotomie im Röntgenbild

Betrachtet man die Verteilung der Flächen mittels Boxplots nach 35 sowie 56 Tagen (siehe Abbildung 19 und 20) sowie das Balkendiagramm (siehe Abbildung 21) über den zeitlichen Verlauf, so präsentiert sich auch hier eine größere Ausprägung der HO in den Gruppen ohne SHT. Auffallend sind zudem die sehr hohen Standardabweichungen in der Versuchsgruppe mit SHT. Dies liegt daran, dass Versuchstier 90 keine HO gebildet hat, das Tier 86 hingegen die stärkste des gesamten Versuchsaufbaus. Die folgenden Röntgenbilder zeigen dieses Tier im Vergleich zu Versuchstier 87, welches am nächsten am Mittelwert der Gruppe liegt (siehe Abbildung 17 und 18).

[PatientID]: HO4.CT9.87, [Access#]: 11, [Name]: MOUSE, MR., [Gender]: M, [Time]: 2002/01/01 00:43:31
[File]: I20020101004331, [StudyID]: , [Study]: , [Proc]: , [Position]: RIGHT
[Physician]: , [TechID]: , [Tech]: A. HACKEMANN, [Station]: FAXITRON, [Institution]:



Abbildung 17: Röntgenbild des Unterschenkels von Versuchstier 87, Gruppe: Tenotomie mit SHT, Pfeil: heterotope Ossifikation

[PatientID]: HO4.CT9.86, [Access#]: 11, [Name]: MOUSE, MR., [Gender]: M, [Time]: 2002/01/01 00:40:55
[File]: I20020101004055, [StudyID]: , [Study]: , [Proc]: , [Position]: RIGHT
[Physician]: , [TechID]: , [Tech]: A. HACKEMANN, [Station]: FAXITRON, [Institution]:



Abbildung 18: Röntgenbild des Unterschenkels von Versuchstier 86, Gruppe: Tenotomie mit SHT, Pfeile: heterotope Ossifikation

Die Boxplots in Abbildung 19 und 20 verstärken graphisch die Tendenz, dass Tiere mit begleitendem Schädel-Hirn-Trauma im Vergleich weniger Fläche an heterotoper Ossifikation im Röntgenbild präsentierten. Zu diesem Effekt trägt maßgeblich bei, dass

Versuchstier 86 als Ausreißer herausgerechnet wurde. Dieses Tier entstammt der SHT Gruppe und zeigte starke HO-Bildung. Man sieht zudem, dass die Gruppe mit begleitendem Schädel-Hirn-Trauma auch das Tier mit der geringsten Ausprägung von HO aufweist. In der Gruppe ohne Schädel-Hirn-Traumata wurde das Versuchstier mit ähnlich geringer HO jedoch als Ausreiser herausgerechnet. Durch diesen Effekt verstärkt sich optisch die geringere Bildung heterotoper Ossifikation im Röntgenbild. Im zeitlichen Verlauf (siehe Abbildung 21) sieht man eine deutlich abgeschwächte Kurve bezüglich der mittleren Fläche heterotoper Ossifikation unter begleitendem Schädel-Hirn-Trauma im Vergleich zu Tieren ohne.

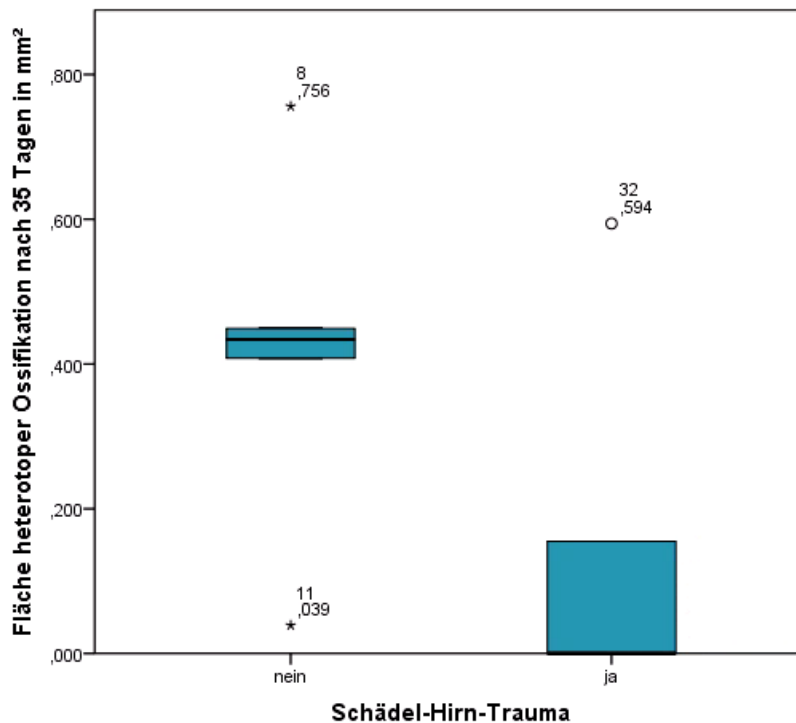


Abbildung 19: Boxplot zum Einfluss von Schädel-Hirn-Trauma auf die Fläche heterotoper Ossifikation nach Tenotomie im Röntgenbild nach 35 Tagen

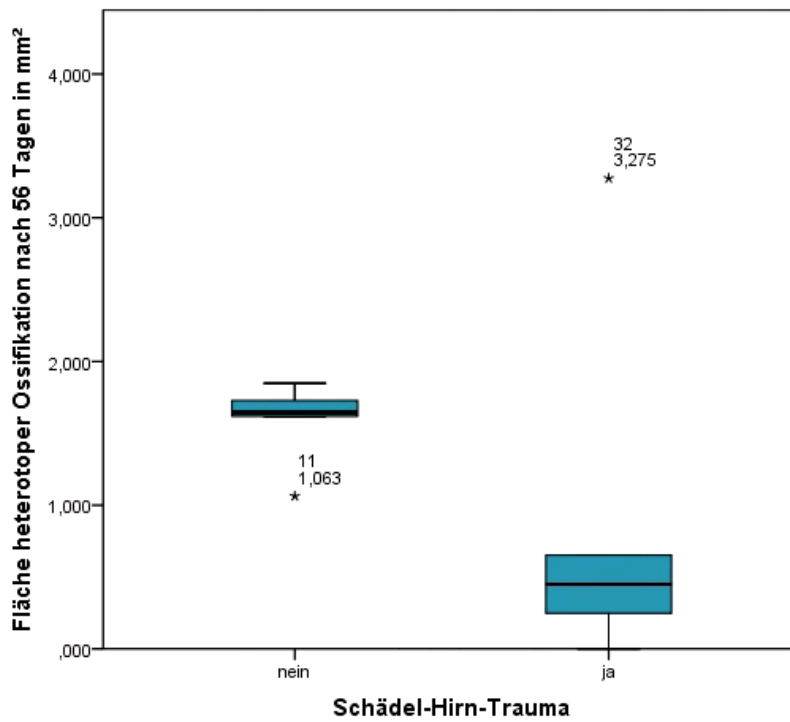


Abbildung 20: Boxplot zum Einfluss von Schädel-Hirn-Trauma auf die Fläche heterotoper Ossifikation nach Tenotomie im Röntgenbild nach 56 Tagen post-OP

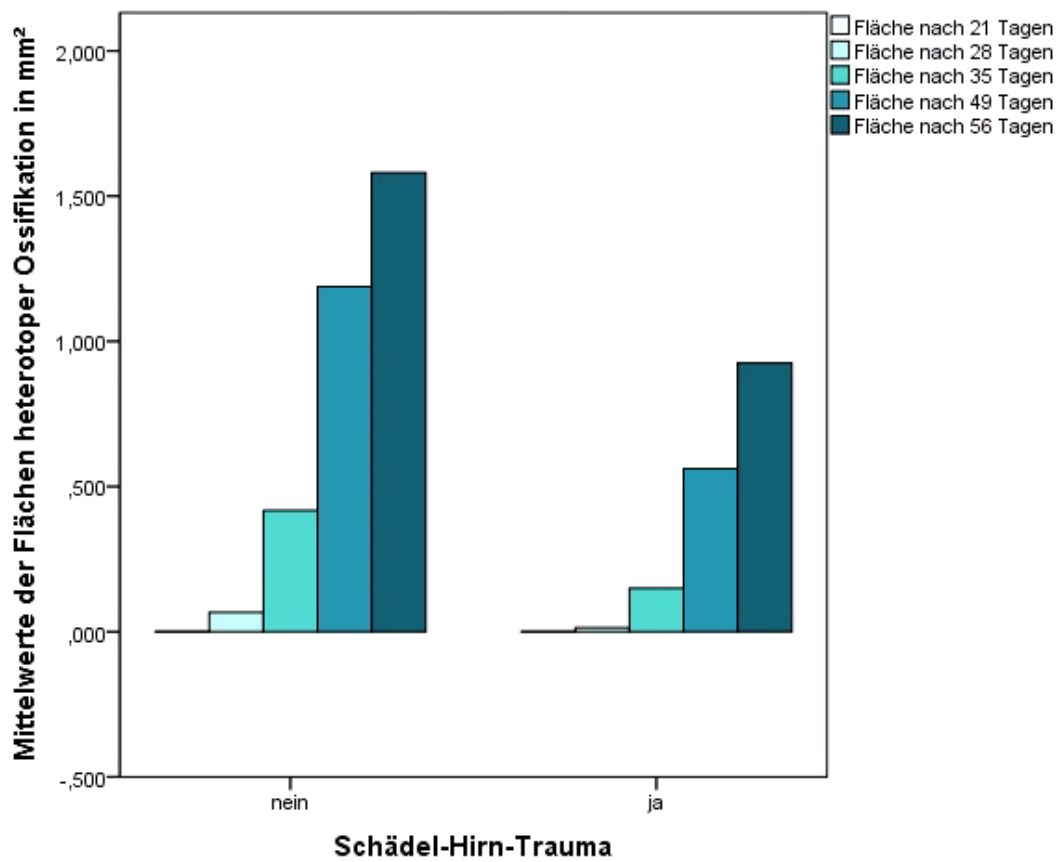


Abbildung 21: Balkendiagramm zum Einfluss von Schädel-Hirn-Trauma auf die Fläche heterotoper Ossifikation nach Tenotomie im Röntgenbild

Stellt man nun die Hypothese auf, dass Schädel-Hirn-Traumata keinen Einfluss auf Inzidenz, aber möglicherweise auf die Ausprägung haben, kann man über Entfernung aller Versuchstiere ohne heterotope Ossifikation aus der Statistik einen neuen Vergleich anstellen. Auch hier sind im Folgenden die Verteilung der Fläche nach 35 bzw. 56 Tagen im Boxplot (siehe Abbildung 22 und 23) sowie ein Balkendiagramm über die Mittelwerte des zeitlichen Verlaufs (siehe Abbildung 24) dargestellt. Hier zeigt sich eine Annäherung der beiden Gruppen bei weiterhin hoher Standardabweichung der Versuchstiere mit SHT. Zum Ende des Beobachtungszeitraumes wiesen Tiere ohne SHT eine 36,7% größere Fläche im Röntgenbild auf. Das Schädel-Hirn-Trauma hatte somit in dieser Studie einen hemmenden Einfluss auf Inzidenz und Ausprägung heterotoper Ossifikation.

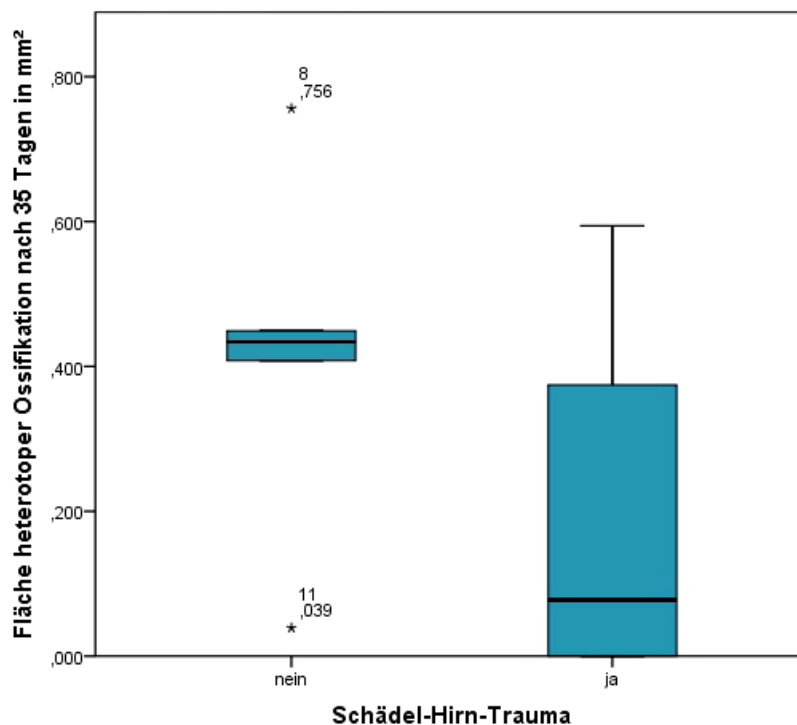


Abbildung 22: Boxplot zum Einfluss von Schädel-Hirn-Trauma auf die Fläche heterotoper Ossifikation nach Tenotomie im Röntgenbild nach 35 Tagen post-OP unter Ausschluss von Tieren ohne HO-Bildung

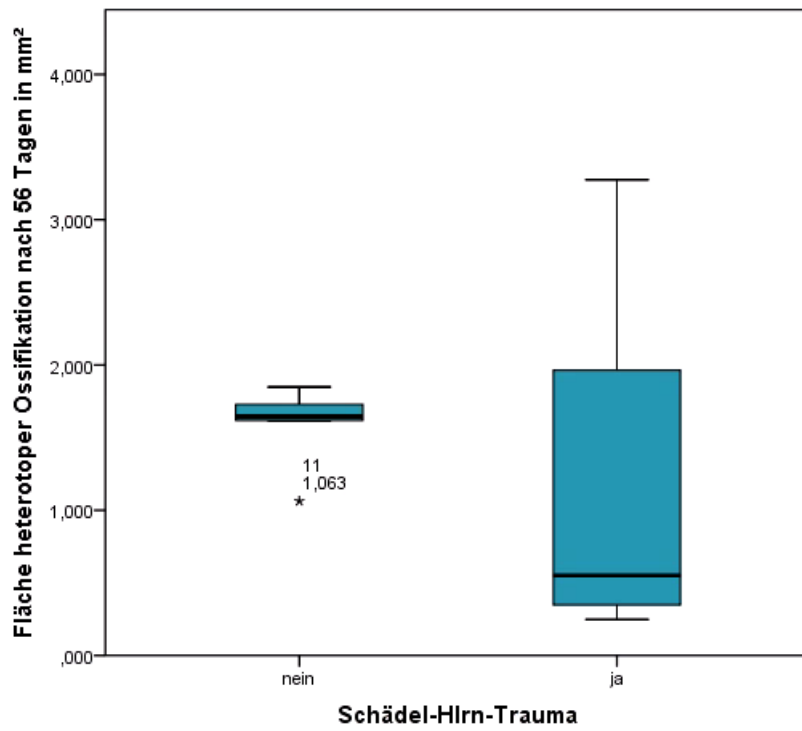


Abbildung 23: Boxplot zum Einfluss von Schädel-Hirn-Trauma auf die Fläche heterotoper Ossifikation nach Tenotomie im Röntgenbild nach 56 Tagen post-OP unter Ausschluss von Tieren ohne HO-Bildung

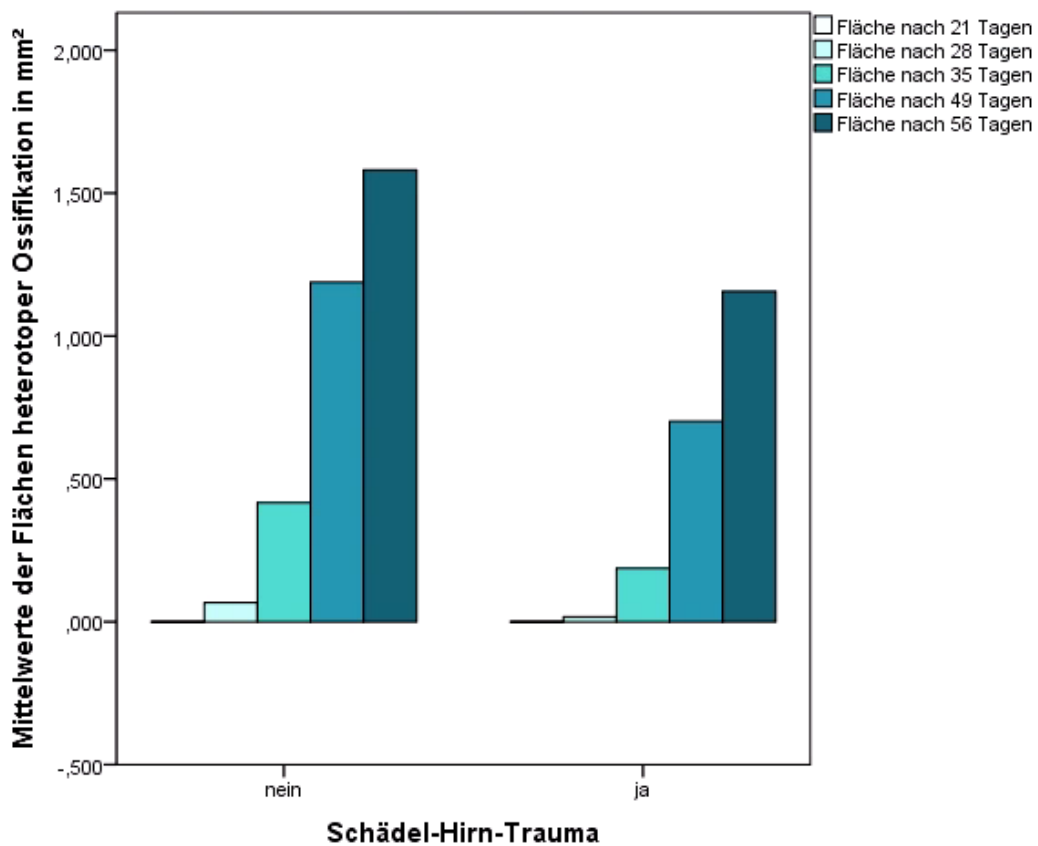


Abbildung 24: Balkendiagramm zum Einfluss von Schädel-Hirn-Trauma auf die Fläche heterotoper Ossifikation nach Tenotomie im Röntgenbild unter Ausschluss von Tieren ohne HO-Bildung

Eine statistische Untersuchung mittels Mann-Whitney-U-Test für zwei unabhängige Stichproben wurde durchgeführt. Unter Bildung von Rangsummen wird eine asymptotische und eine exakte Signifikanz ermittelt, wobei bei einem $n < 30$ der Fokus auf die exakte Signifikanz gelegt werden sollte. Die Nullhypothese nimmt an, dass es keinen Unterschied zwischen den beiden Gruppen gibt, wohingegen die Alternativhypothese einen signifikanten Unterschied der Ausprägung von HO unter den beiden Gruppen annimmt. Ein p von $< 0,05$ wird angenommen. Die folgende Statistik wird einmal ohne Ausschluss der Versuchstiere durchgeführt, die keine ektope Knochenbildung zeigten (siehe Tabelle 4), sowie einmal mit entsprechendem Ausschluss (siehe Tabelle 5). In Tabelle 4 wird sowohl bei 35 als auch bei 56 Tagen ein p von 0,151 erreicht, in Tabelle 5 von 0,286. In beiden Fällen wird die Nullhypothese angenommen. Es kann kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Versuchsgruppen festgestellt werden. Die p -Werte ohne das Herausrechnen von Tieren ohne HO Bildung haben nahezu eine Signifikanz erreicht bezüglich einer Hemmung heterotoper Ossifikation unter Schädel-Hirn-Traumata.

Ränge				
Tage post-OP	SHT	N	Mittlerer Rang	Rangsumme
Roe_FI_35	nein	5	7	35
	ja	5	4	20
	Gesamt	10		
Roe_FI_56	nein	5	7	35
	ja	5	4	20
	Gesamt	10		

Statistik für Test ^a		
	Roe_FI_35	Roe_FI_56
Mann-Whitney-U	5	5
Wilcoxon-W	20	20
Z	-1,586	-1,567
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	0,113	0,117
Exakte Signifikanz [2*(1-seitige Sig.)]	0,151 ^b	0,151 ^b

Tabelle 4: Mann-Whitney-U-Test zum Einfluss von Schädel-Hirn-Trauma auf die Fläche heterotoper Ossifikation nach Tenotomie im Röntgenbild

Ränge				
Tage post-OP	SHT	N	Mittlerer Rang	Rangsumme
Roe_FI_35	nein	5	6	30
	ja	4	3,75	15
	Gesamt	9		
Roe_FI_56	nein	5	6	30
	ja	4	3,75	15
	Gesamt	9		

Statistik für Test ^a		
	Roe_FI_35	Roe_FI_56
Mann-Whitney-U	5	5
Wilcoxon-W	15	15
Z	-1,23	-1,225
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	0,219	0,221
Exakte Signifikanz [2*(1-seitige Sig.)]	0,286 ^b	0,286 ^b

Tabelle 5: Mann-Whitney-U-Test zum Einfluss von Schädel-Hirn-Trauma auf die Fläche heterotoper Ossifikation nach Tenotomie im Röntgenbild unter Ausschluss der Tiere ohne HO-Bildung

4.1.2. Volumen und Dichte in der μ CT

Im Folgenden wird der Einfluss von Schädel-Hirn-Traumata auf Volumen und Dichte mithilfe der μ CT-Analysen betrachtet. Jeweils zwei Versuchstiere aus den verschiedenen Gruppen wurden zufällig ausgewählt und analysiert (siehe Tabelle 6). In beiden Versuchsgruppen gab es kein Tier, welches bereits nach fünf Tagen heterotop Ossifikation ausgebildet hat (Gruppen AT5 und CT5). Allerdings präsentierte Versuchstier 22, welches kein SHT erhalten hatte, bereits nach 21 Tagen HO. In der graphischen Darstellung zeigt sich, dass ein zusätzliches SHT keinen verstärkenden Effekt auf Volumen oder Dichte hatte (siehe Abbildung 25). Aufgrund der niedrigen Fallzahl sind diese Ergebnisse jedoch eingeschränkt zu beurteilen.

Versuchstier	Gruppe	SHT	Volumen HU> 9000	Volumen HU> 5000	Dichtefaktor
16	AT5	nein	0	0	
17	AT5		0	0	
21	AT3		0	0	
22	AT3		0,002	0,026	0,087
26	AT9		0,088	0,723	0,122
27	AT9		0,117	0,592	0,198
76	CT5	ja	0	0	
77	CT5		0	0	
82	CT3		0	0	
83	CT3		0	0	
86	CT9		0,055	0,628	0,087
88	CT9		0,005	0,046	0,097

Tabelle 6: Ergebnistabelle zum Einfluss von Schädel-Hirn-Trauma auf Volumen und Dichte heterotoper Ossifikation nach Tenotomie in der μ CT

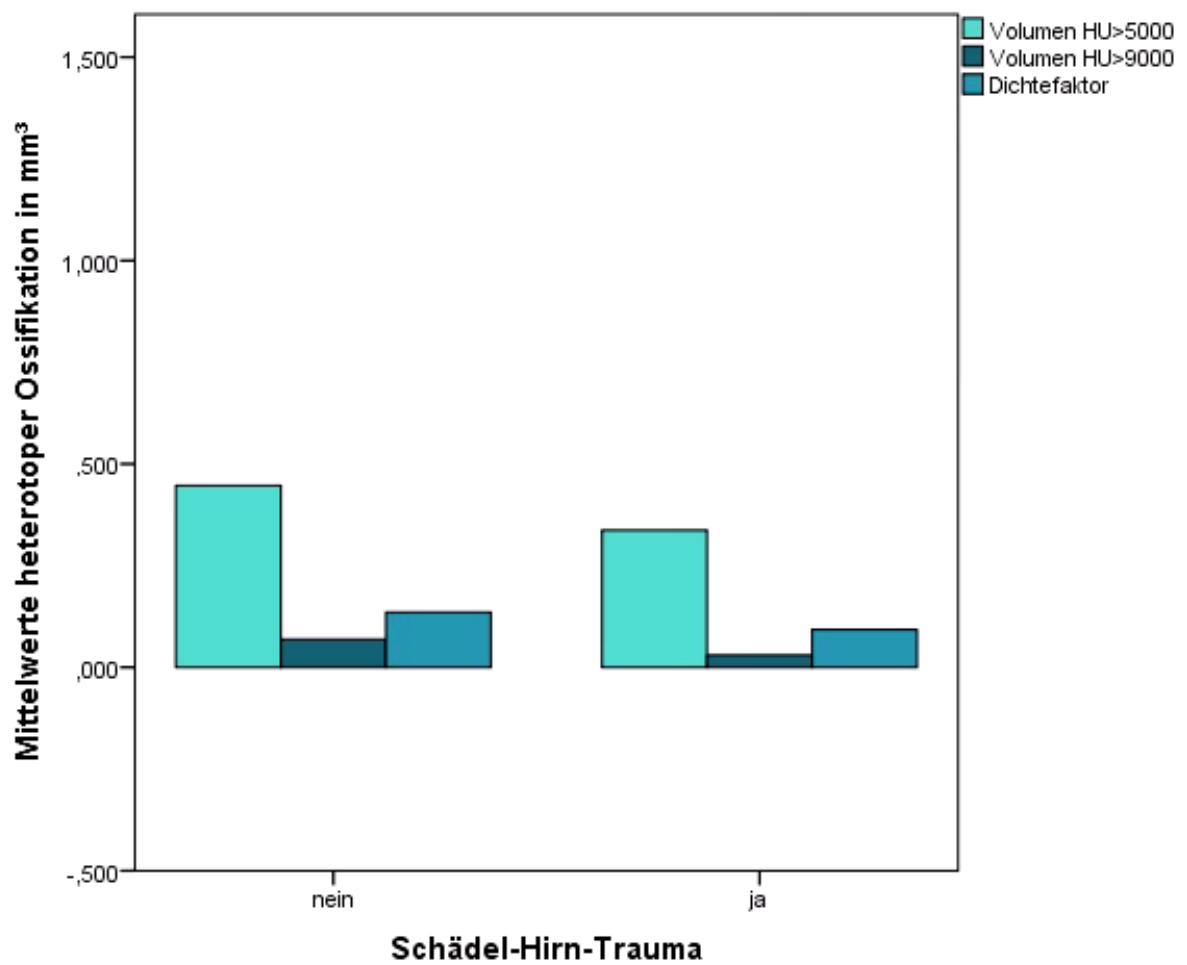


Abbildung 25: Balkendiagramm zum Einfluss von Schädel-Hirn-Trauma auf Volumen und Dichte heterotoper Ossifikation nach Tenotomie in der μ CT

4.1.3. Angiogenese in der μ CT

Neben der Analyse von Volumen und Dichte erfolgte die Messung der Gesamt-Gefäßvolumina (connectivity fill), sowie der Gefäßquerschnitte auf Höhe der Tenotomie (siehe Tabelle 7). Da bei einigen Versuchstieren zu Beginn die Füllung mit Kontrastmittel nur unzureichend gelang, wurden diese aus der Analyse herausgenommen.

Versuchstier	Gruppe	SHT	Connectivity Fill	GefäÙe im Querschnitt	Notizen
16	AT5	nein	2,009	10	unzureichende Füllung
17	AT5		0,347	1	
21	AT3		8,116	15	
22	AT3		8,652	14	
26	AT9		16,002	13	
27	AT9		6,435	11	
76	CT5	ja	0,294	0	unzureichende Füllung
77	CT5		3,936	9	
82	CT3		8,747	18	
83	CT3		7,836	24	
86	CT9		9,475	27	
88	CT9		12,914	21	

Tabelle 7: Ergebnistabelle zum Einfluss von Schädel-Hirn-Trauma auf Angiogenese nach Tenotomie in der μ CT

Aus den Ergebnissen der Tabelle 8 und 9 lässt sich ablesen, dass bei Versuchstieren mit begleitendem Schädel-Hirn-Trauma sehr ähnliche Ergebnisse bezüglich der Gesamtvolumina im Vergleich zur Gruppe ohne SHT erreicht wurden. Im Querschnitt weisen diese Tiere auf Höhe der Tenotomie circa die doppelte Anzahl an GefäÙen auf.

Deskriptive Statistik						
SHT	Tage post-OP	N	Minimum	Maximum	Mittelwert	Standardabweichung
nein	Angio_Vol_5d	1	2,009	2,009	2,009	-
	Angio_Vol_21d	2	8,116	8,652	8,384	0,379
	Angio_Vol_56d	2	6,435	16,002	11,218	6,764
	Gültige Werte (Listenweise)	0				
ja	Angio_Vol_5d	1	3,936	3,936	3,936	-
	Angio_Vol_21d	2	7,836	8,747	8,292	0,644
	Angio_Vol_56d	2	9,475	12,914	11,194	2,432
	Gültige Werte (Listenweise)	0				

Tabelle 8: Deskriptive Statistik zum Einfluss von Schädel-Hirn-Trauma auf die Gesamtvolumina der GefäÙe nach Tenotomie in der μ CT

Deskriptive Statistik						
SHT	Tage post-OP	N	Minimum	Maximum	Mittelwert	Standardabweichung
nein	Angio_cut_5d	1	10	10	10	-
	Angio_cut_21d	2	14	15	14,5	0,707
	Angio_cut_56d	2	11	13	12	1,414
	Gültige Werte (Listenweise)	0				
ja	Angio_cut_5d	1	9	9	9	-
	Angio_cut_21d	2	18	24	21	4,243
	Angio_cut_56d	2	21	27	24	4,243
	Gültige Werte (Listenweise)	0				

Tabelle 9: Deskriptive Statistik zum Einfluss von Schädel-Hirn-Trauma auf die Anzahl der Gefäße im Querschnitt nach Tenotomie in der μ CT

In den folgenden Abbildungen 26 bis 29 werden alle Tiere der 56 Tage Gruppe dargestellt bei denen eine CT-Untersuchung durchgeführt wurde. In der ersten Aufnahme sieht man die Gesamtaufnahme, gelb und mit Pfeil markiert stellt sich die heterotope Ossifikation dar. Das zweite Bild zeigt die reine Gefäßdarstellung des Unterschenkels und das letzte Bild einen Querschnitt der CT-Aufnahme auf Höhe der Tenotomie, gelb markiert sind die angeschnittenen und mit Kontrastmittel gefüllten Gefäße. Die Tiere 26 und 27 erlitten im Gegensatz zu den Tieren 86 und 88 kein zusätzliches Schädel-Hirn-Trauma. Im optischen Vergleich fällt auf, dass die beiden Tiere ohne SHT ausgeprägte heterotope Ossifikation gebildet haben (siehe Pfeile Abbildung 26-29), im Gesamtbild sowie im Querschnitt jedoch scheinbar weniger Gefäßbildung hatten. Versuchstier 86 zeigte ebenso viel HO-Bildung und begleitend auch sehr viele Gefäße. Im Querschnitt auf Höhe der Läsion weist dieses Tier im Vergleich zu den anderen die stärkste Angiogenese auf. Tier 88 hat zwar eine ausgeprägte Angiogenese im Gesamtbild sowie im Querschnitt, bildete insgesamt jedoch das geringste Knochenvolumen. Aus den Aufnahmen scheint das Schädel-Hirn-Trauma zu einer stärkeren Angiogenese zu führen, welche allerdings nicht zwingend von einer stärkeren ektopen Knochenbildung begleitet wird.

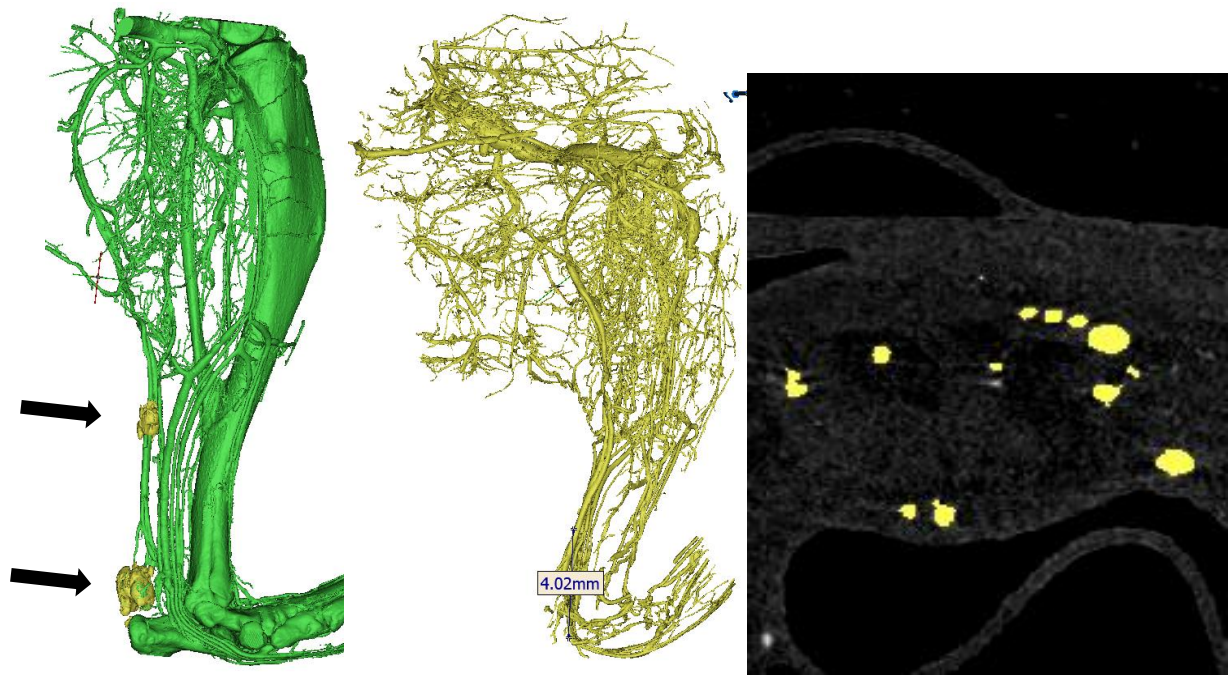


Abbildung 26: Versuchstier 26, Gruppe: Tenotomie ohne SHT; Pfeil: heterotope Ossifikation; Gefäßdarstellung und Querschnitt

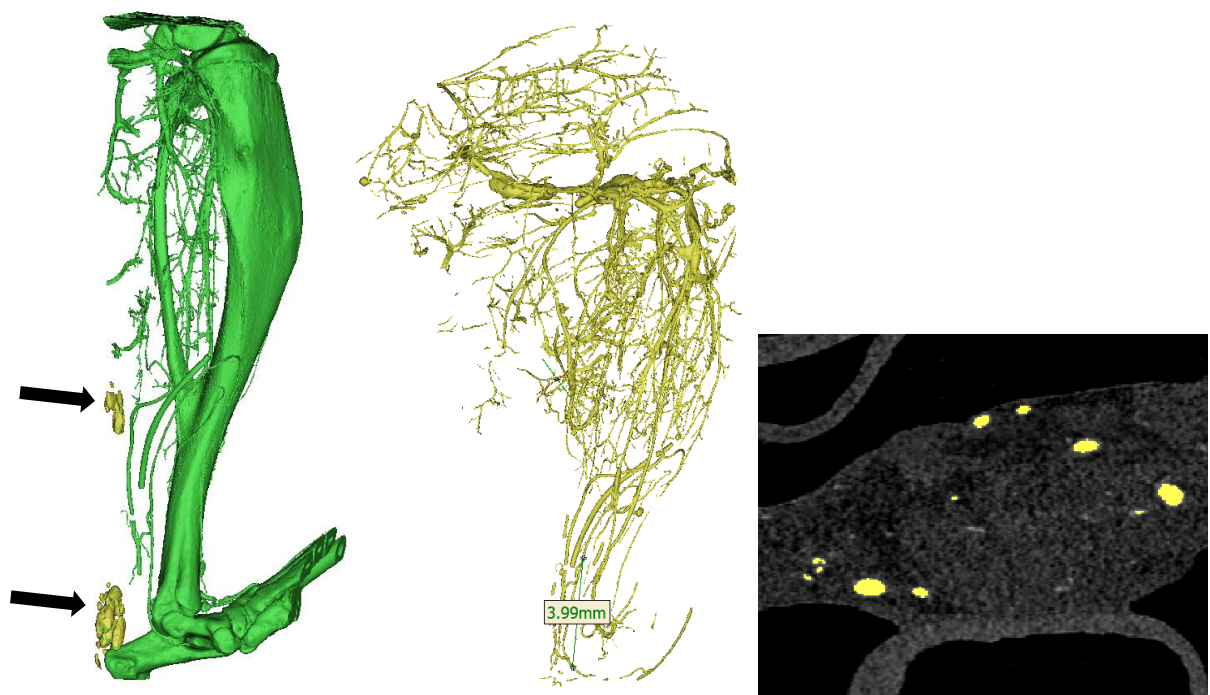


Abbildung 27: Versuchstier 27, Gruppe: Tenotomie ohne SHT; Pfeil: heterotope Ossifikation; Gefäßdarstellung und Querschnitt

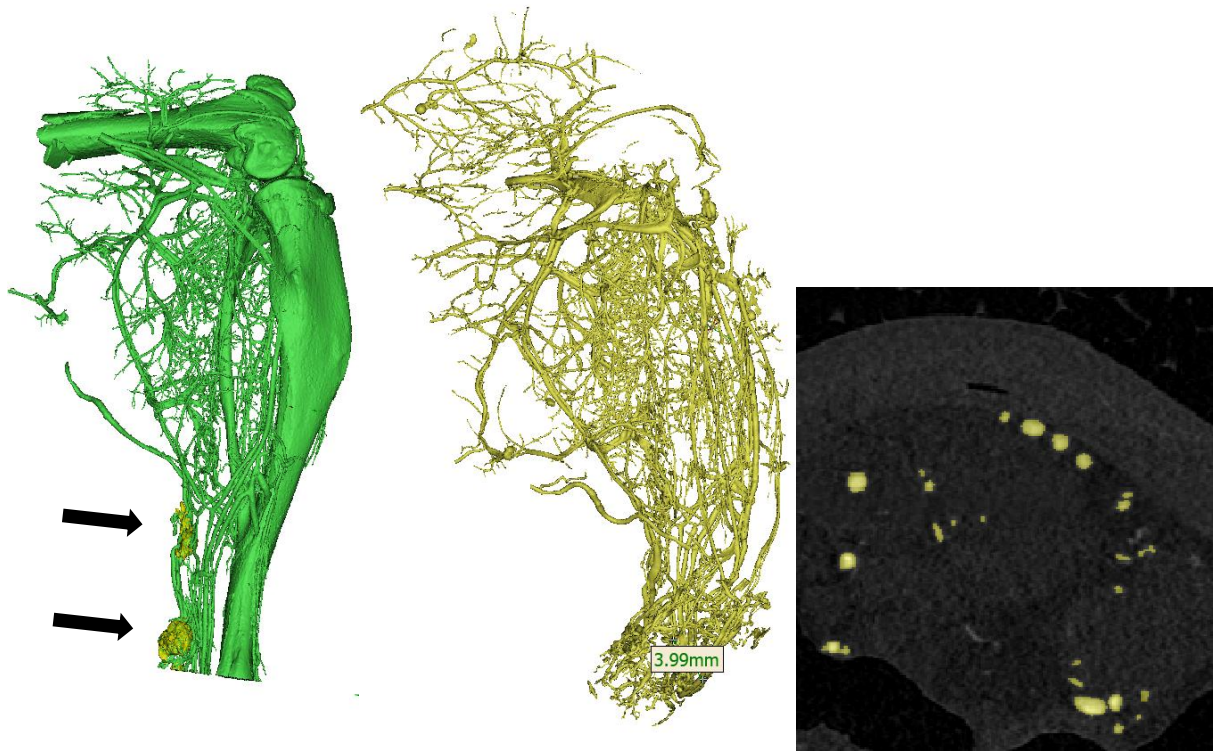


Abbildung 28: Versuchstier 86, Gruppe: Tenotomie mit SHT; Pfeil: heterotope Ossifikation; Gefäßdarstellung und Querschnitt

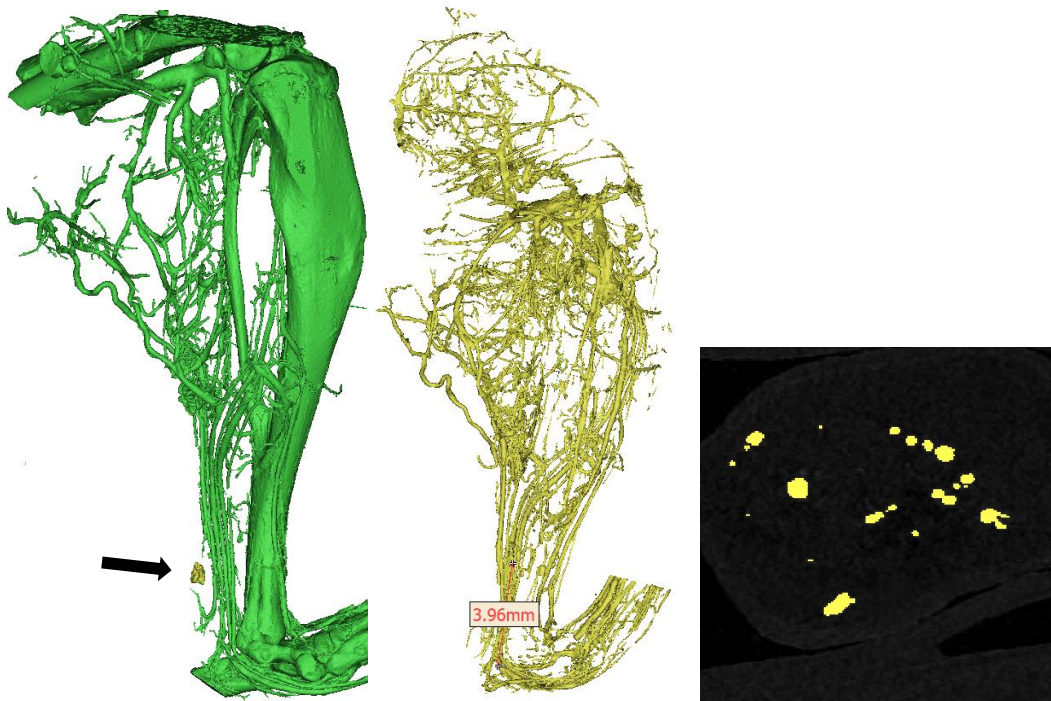


Abbildung 29: Versuchstier 88, Gruppe: Tenotomie mit SHT; Pfeil: heterotope Ossifikation; Gefäßdarstellung und Querschnitt

4.2. Einfluss von Echinomycin auf heterotope Ossifikation

4.2.1. Fläche im Röntgenbild

Der Einfluss von Echinomycin auf Tenotomien wird zunächst nur bei Tieren ohne zusätzliches Schädel-Hirn-Trauma dargestellt. In den Röntgenbildern konnte bei keinem Versuchstier vor Tag 28 heterotope Ossifikation diagnostiziert werden. Aufgrund technischer Schwierigkeiten konnte auf die Aufnahmen von Tag 28 der Behandlungsgruppe nicht mehr zurückgegriffen werden. Anhand der Tabelle 10 ist jedoch bereits zu erkennen, dass zwei der behandelten Mäuse am 35. Tag noch keine heterotope Ossifikation entwickelt hatten. Zum Versuchsende wiesen alle Versuchstiere HO auf.

Gruppe	Versuchstier	7d	14d	21d	28d	35d	49d	56d
Teno	26	0	0	0	0,186	0,756	1,410	1,618
	27	0	0	0	0	0,449	1,316	1,646
	28	0	0	0	0,089	0,408	1,277	1,849
	29	0	0	0	0	0,039	0,607	1,063
	30	0	0	0	0,059	0,434	1,331	1,729
Teno + EC	56	0	0	0	fehlt	0	0,644	1,132
	57	0	0	0	fehlt	0	0,273	0,386
	58	0	0	0	fehlt	0,103	0,540	0,492
	59	0	0	0	fehlt	0,094	0,750	0,753
	60	0	0	0	fehlt	0,143	0,900	1,040

Tabelle 10: Ergebnistabelle zum Einfluss von Echinomycin auf die Fläche heterotoper Ossifikation nach Tenotomie im Röntgenbild

Die Ergebnisse aus Tabelle 11 verdeutlichen, dass, bei geringer Standardabweichung, zu jedem Zeitpunkt in der Behandlungsgruppe geringere Flächen an ektopter Ossifikation gemessen wurden. Die Tiere ohne Echinomycingabe präsentierten röntgenologisch zum Versuchsende 48,1% mehr HO. Neben der niedrigeren Gesamtausprägung zeigt sich auch eine Abflachung des Wachstums unter Behandlung mit Echinomycin. Vergleicht man hier das prozentuale Wachstum zwischen Tag 49 und 56 postoperativ, dem Zeitpunkt, ab dem alle Tiere HO gebildet hatten, erhält man für die Kontrollgruppe einen Wert von 33,1%, für die Behandlungsgruppe von 22,4%. Eine Bildung heterotoper Ossifikation konnte somit zwar nicht verhindert, jedoch deutlich abgeschwächt werden.

Deskriptive Statistik						
EC	Tage post-OP	N	Minimum	Maximum	Mittelwert	Standardabweichung
nein	Fläche_28d	5	0	0,186	0,067	0,077
	Fläche_35d	5	0,039	0,756	0,417	0,255
	Fläche_49d	5	0,607	1,410	1,188	0,328
	Fläche_56d	5	1,063	1,849	1,581	0,303
	Gültige Werte (Listenweise)	5				
ja	Fläche_28d	0				
	Fläche_35d	5	0	0,143	0,068	0,065
	Fläche_49d	5	0,273	0,900	0,621	0,236
	Fläche_56d	5	0,386	1,132	0,761	0,327
	Gültige Werte (Listenweise)	0				

Tabelle 11: Deskriptive Statistik zum Einfluss von Echinomycin auf die Fläche heterotoper Ossifikation nach Tenotomie im Röntgenbild

Die Abbildungen 30 bis 32 verdeutlichen die verminderte Bildung von HO. Das Herausrechnen der Ausreiser in den Boxplots verstärkt diesen Effekt nochmals. Hier sieht man, dass nach 35 Tagen post-OP in der Behandlungsgruppe teilweise noch keine HO entstanden war, während die Kontrollgruppe bereits ausgeprägt HO aufwies. Zwar entwickelten die Tiere nach 56 Tagen alle HO, die Ausprägung mit Behandlung von Echinomycin zeigt sich im Boxplot allerdings deutlich gemindert. Betrachtet man das Balkendiagramm fällt eine Abschwächung des Wachstums insbesondere vom 49. auf den 56. postoperativen Tag auf. Hier zeigt sich kaum noch eine Größenprogredienz der ektopen Knochenbildung.

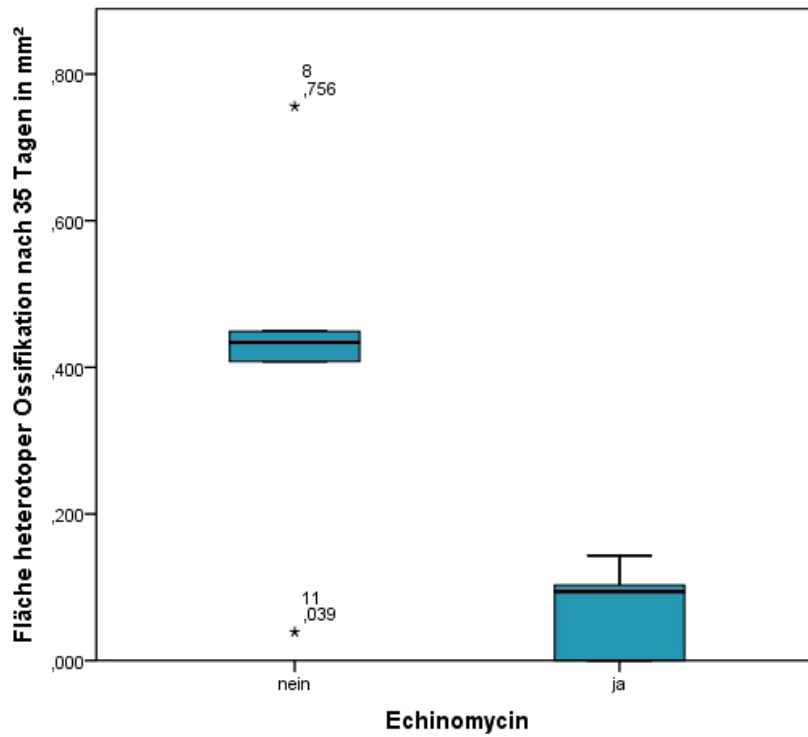


Abbildung 30: Boxplot zum Einfluss von Echinomycin auf die Fläche heterotoper Ossifikation nach Tenotomie im Röntgenbild nach 35 Tagen post-OP

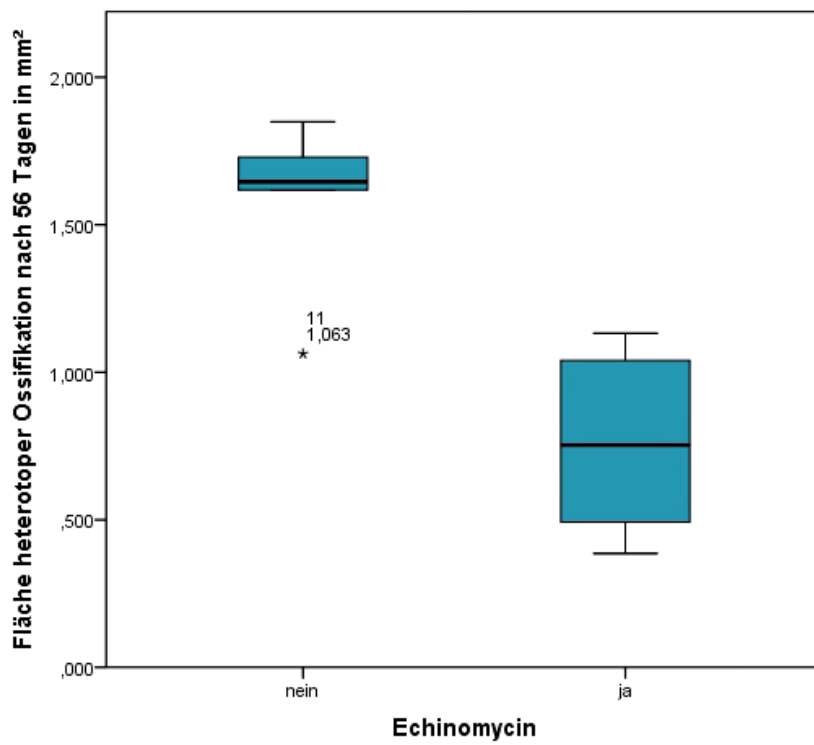


Abbildung 31: Boxplot zum Einfluss von Echinomycin auf die Fläche heterotoper Ossifikation nach Tenotomie im Röntgenbild nach 56 Tagen post-OP

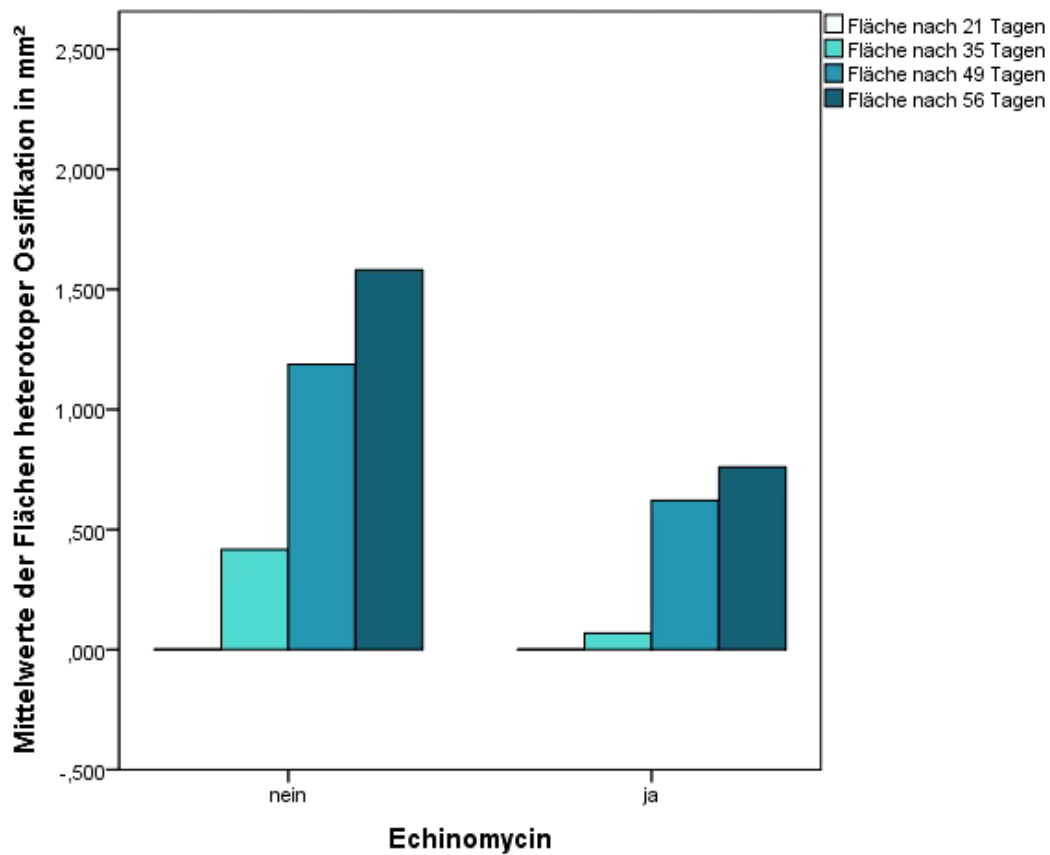


Abbildung 32: Balkendiagramm zum Einfluss von Echinomycin auf die Fläche heterotoper Ossifikation nach Tenotomie im Röntgenbild

Eine statistische Auswertung der unabhängigen Stichproben mittels Mann-Whitney-U-Test erfolgte mit einem gesetzten $p < 0,05$. Die Nullhypothese besagt, dass die Behandlung mit Echinomycin keinen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe aufweist. Liegt ein $p < 0,05$ vor, so wird diese verworfen und die Alternativhypothese angenommen, welche besagt, dass Echinomycin die Bildung heterotoper Ossifikation signifikant reduziert. Die Auswertung erfolgte sowohl für einen frühen Zeitpunkt nach 35 Tagen, sowie den letzten Zeitpunkt vor Absetzen der Versuchstiere nach 56 Tagen post-OP. Wie in Tabelle 12 zu sehen, wird die Nullhypothese nach 35 Tagen mit einem p von 0,056 angenommen, nach 56 Tagen mit einem p von 0,016 verworfen. Echinomycin wirkt sich damit im Verlauf signifikant auf die Flächenreduktion heterotoper Ossifikation im Röntgenbild aus.

Ränge				
Tage post-OP	EC	N	Mittlerer Rang	Rangsumme
Fläche_35d	nein	5	7,4	37
	ja	5	3,6	18
	Gesamt	10		
Fläche_56d	nein	5	7,8	39
	ja	5	3,2	16
	Gesamt	10		

Statistik für Test ^a		
	Fläche_35d	Fläche_56d
Mann-Whitney-U	3	1
Wilcoxon-W	18	16
Z	-1,991	-2,402
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	0,047	0,016
Exakte Signifikanz [2*(1-seitige Sig.)]	0,056 ^b	0,016 ^b

Tabelle 12: Mann-Whitney-U-Test zum Einfluss von Echinomycin auf die Fläche heterotoper Ossifikation nach Tenotomie im Röntgenbild

4.2.2. Volumen und Dichte in der μ CT

Zur Beurteilung der Dichte wurden zufällig zwei Tiere aus den jeweiligen Gruppen entsprechend des Versuchsprotokolls mittels μ CT-Analysen untersucht (siehe Tabelle 13). Bei Versuchstier 57 aus der Gruppe mit begleitender Gabe von Echinomycin kam es zu einer fehlerhaften Messung in der μ CT, was zu fehlerhaften Angaben der Hounsfield unit führte. Eine Bewertung kann daher nicht stattfinden. Bei dem verbliebenen Versuchstier der Behandlungsgruppe zeigte sich geringe HO. In einer manuellen Anfärbung der HO von Versuchstier 57 ergab sich eine Fläche von 0,12 mm² welche am ehesten dem Volumen bei 5000 HU entspricht. Aufgrund der Messungenauigkeit wird dieses Tier jedoch für die Berechnung ausgeschlossen. Die Tendenz würde jedoch eine niedrigere Bildung von HO in der Behandlungsgruppe stützen. Bedingt durch die geringe Fallzahl sind diese Beobachtungen nur eingeschränkt zu beurteilen.

Versuchstier	Gruppe	EC	volume HU 9000	Volume HU 5000	Dichtefaktor
16	AT5		0	0	
17	AT5		0	0	
21	AT3	nein	0	0	
22	AT3		0,002	0,026	0,087
26	AT9		0,088	0,723	0,122
27	AT9		0,117	0,592	0,198
46	BT5		0	0	
47	BT5		0	0	
53	BT3	ja	0	0	
55	BT3		0	0	
57	BT9		X	X	
58	BT9		0,015	0,171	0,088

Tabelle 13: Ergebnistabelle zum Einfluss von Echinomycin auf Volumen und Dichte heterotoper Ossifikation nach Tenotomie in der μ CT

Betrachtet man den Unterschied graphisch dargestellt zeigt sich eine starke Reduktion heterotoper Ossifikation durch den Einsatz von Echinomycin (siehe Abbildung 33). Bezüglich der Dichte weist das Tier mit Behandlung einen niedrigeren Dichtefaktor auf.

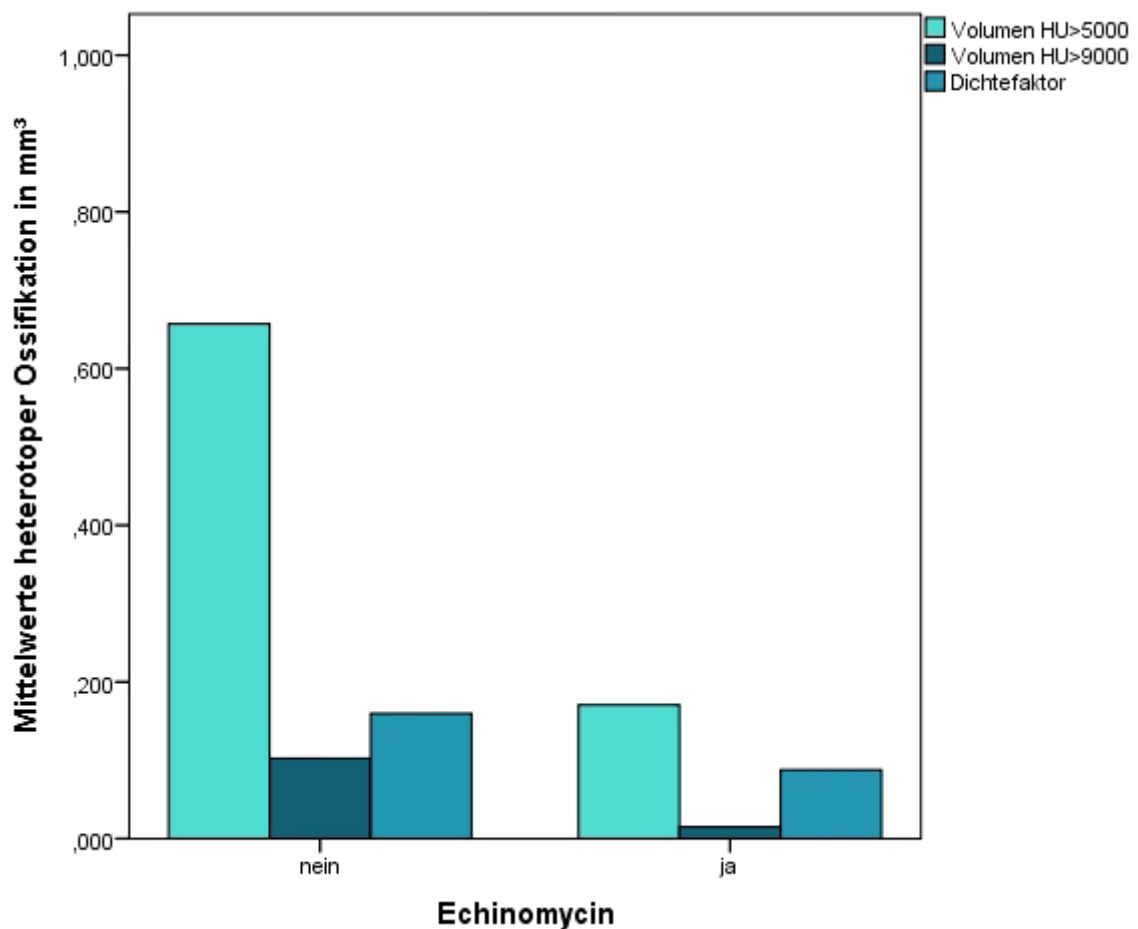


Abbildung 33: Balkendiagramm zum Einfluss von Echinomycin auf Volumen und Dichte heterotoper Ossifikation nach Tenotomie in der μ CT

4.2.3. Angiogenese in der μ CT

Entsprechend des Versuchsprotokolls wurden Gesamtvolumina der Gefäße (connectivity fill) sowie Gefäßanzahl auf Höhe der Tenotomie gemessen und zwischen den Versuchstieren mit und ohne Echinomycin verglichen (siehe Tabelle 14). Erneut mussten Tiere aufgrund der anfänglich unzureichenden Transfusion von Kontrastmittel aus der Analyse ausgeschlossen werden.

Versuchstier	Gruppe	EC	Connectivity Fill	Gefäße im Querschnitt	Notizen
16	AT5	nein	2,009	10	unzureichende Füllung
17	AT5		0,347	1	
21	AT3		8,116	15	
22	AT3		8,652	14	
26	AT9		16,002	13	
27	AT9		6,435	11	
46	BT5	ja	0,221	0	unzureichende Füllung
47	BT5		2,428	10	
53	BT3		12,996	25	
55	BT3		10,835	10	
57	BT9		21,590	12	
58	BT9		5,648	18	

Tabelle 14: Ergebnistabelle zum Einfluss von Echinomycin auf die Angiogenese nach Tenotomie in der μ CT

Die gemessenen Werte wiesen insbesondere ab dem Zeitpunkt der HO-Bildung starke Unterschiede auf und die Ergebnisse sind aufgrund der entsprechend hohen Standardabweichung nur eingeschränkt zu beurteilen. Insgesamt präsentierten die Tiere mit Gabe von Echinomycin leicht höhere Gesamt-Gefäßvolumina, sowie Gefäße im Querschnitt auf (siehe Tabelle 15 und 16).

Deskriptive Statistik						
EC	Tage post-OP	N	Minimum	Maximum	Mittelwert	Standardabweichung
nein	Angio_Vol_5d	1	2,009	2,009	2,009	-
	Angio_Vol_21d	2	8,116	8,652	8,384	0,379
	Angio_Vol_56d	2	6,435	16,002	11,218	6,764
	Gültige Werte (Listenweise)	0				
ja	Angio_Vol_5d	1	2,428	2,428	2,428	-
	Angio_Vol_21d	2	10,835	12,996	11,915	1,528
	Angio_Vol_56d	2	5,648	21,59	13,619	11,273
	Gültige Werte (Listenweise)	0				

Tabelle 15: Deskriptive Statistik zum Einfluss von Echinomycin auf die Gesamtvolumina der Gefäße nach Tenotomie in der μ CT

Deskriptive Statistik						
EC	Tage post-OP	N	Minimum	Maximum	Mittelwert	Standardabweichung
nein	Angio_cut_5d	1	10	10	10	-
	Angio_cut_21d	2	14	15	14,5	0,707
	Angio_cut_56d	2	11	13	12	1,414
	Gültige Werte (Listenweise)	0				
ja	Angio_cut_5d	1	10	10	10	-
	Angio_cut_21d	2	10	25	17,5	10,607
	Angio_cut_56d	2	12	18	15	4,243
	Gültige Werte (Listenweise)	0				

Tabelle 16: Deskriptive Statistik zum Einfluss von Echinomycin auf die Anzahl der Gefäße im Querschnitt nach Tenotomie in der μ CT

Die folgenden Abbildungen 34 bis 37 zeigen die μ CT-Aufnahmen aller Mäuse nach 56 Tagen postoperativ nach bildmorphologischer Aufarbeitung. Die erste Graphik zeigt die Gesamtaufnahme, die heterotope Ossifikation ist hierbei gelb und mit Pfeilen markiert. Die nächste Graphik stellt die reine Gefäßdarstellung nach Dekalzifizierung des Knochens dar, in der letzten Graphik die CT-Aufnahme im Querschnitt auf Höhe der Tenotomie. Gelb markiert sind hierbei die kontrastmittelgefüllten Gefäße. Versuchstier 34 und 35 erhielten kein Echinomycin und bildeten am stärksten heterotope Ossifikation aus. Tier 35 zeigte hierunter eine geringe Ausbildung von Gefäßen, sowohl insgesamt als auch im Querschnitt. Das Versuchstier 34 weist die stärkste HO-Bildung unter ausgeprägter Vaskularisierung auf. Betrachtet man die Tiere 36 und 37 welche Echinomycin erhalten hatten, so lässt sich beobachten, dass beide deutlich geringere Volumina an heterotoper Ossifikation ausgebildeten. Versuchstier 36 zeigt viele Gefäße im gesamten Unterschenkel, jedoch nur mäßig viele im Querschnitt. Es weist die geringste HO auf. Bei Tier 37 hingegen wurden sehr wenige Gefäße des Unterschenkels dargestellt, im Querschnitt auf Höhe der Tenotomie hingegen die größte Anzahl der hier untersuchten Fälle. Insgesamt lässt sich zeigen dass die Versuchstiere mit EC-Gabe geringere HO-Bildung, jedoch unterschiedliche Vaskularisationen aufzeigten.

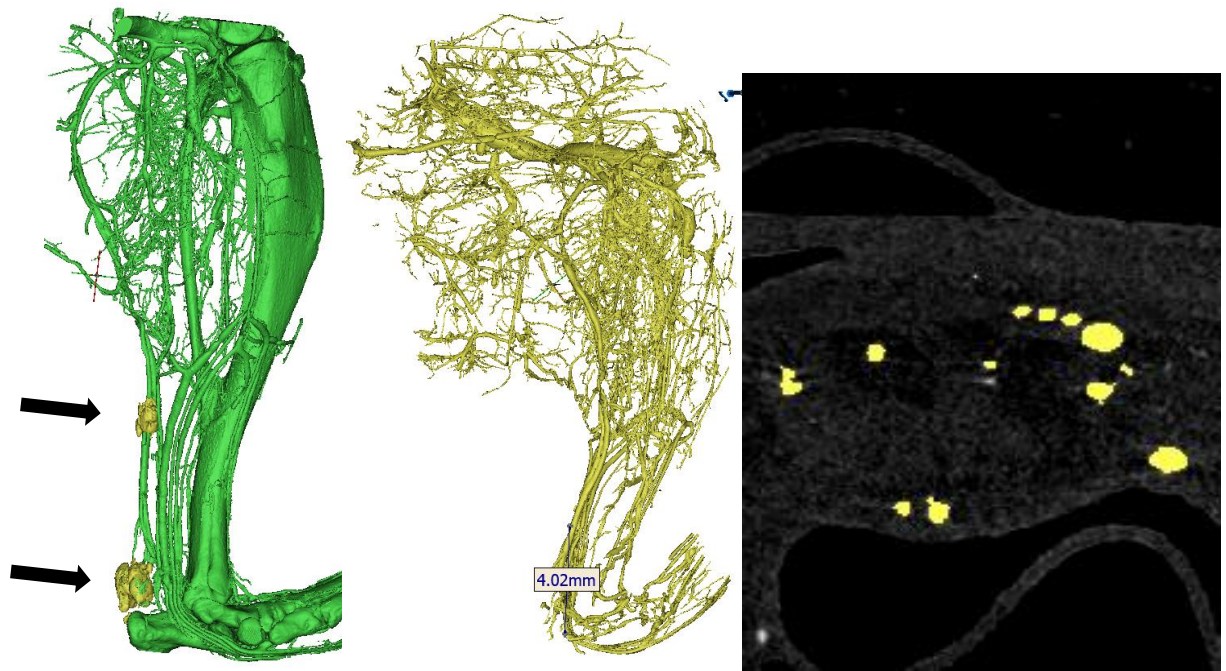


Abbildung 34: Versuchstier 26, Gruppe: Tenotomie ohne Echinomycin; Pfeil: heterotope Ossifikation; Gefäßdarstellung und Querschnitt

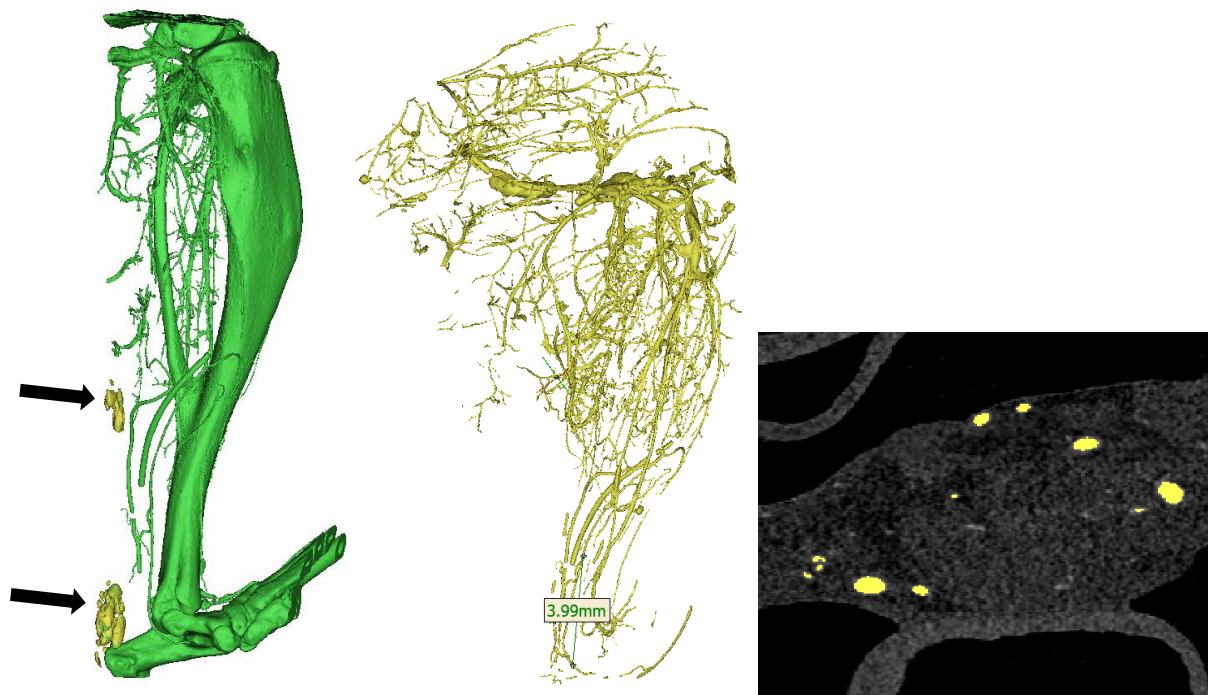


Abbildung 35: Versuchstier 27, Gruppe: Tenotomie ohne Echinomycin; Pfeil: heterotope Ossifikation; Gefäßdarstellung und Querschnitt

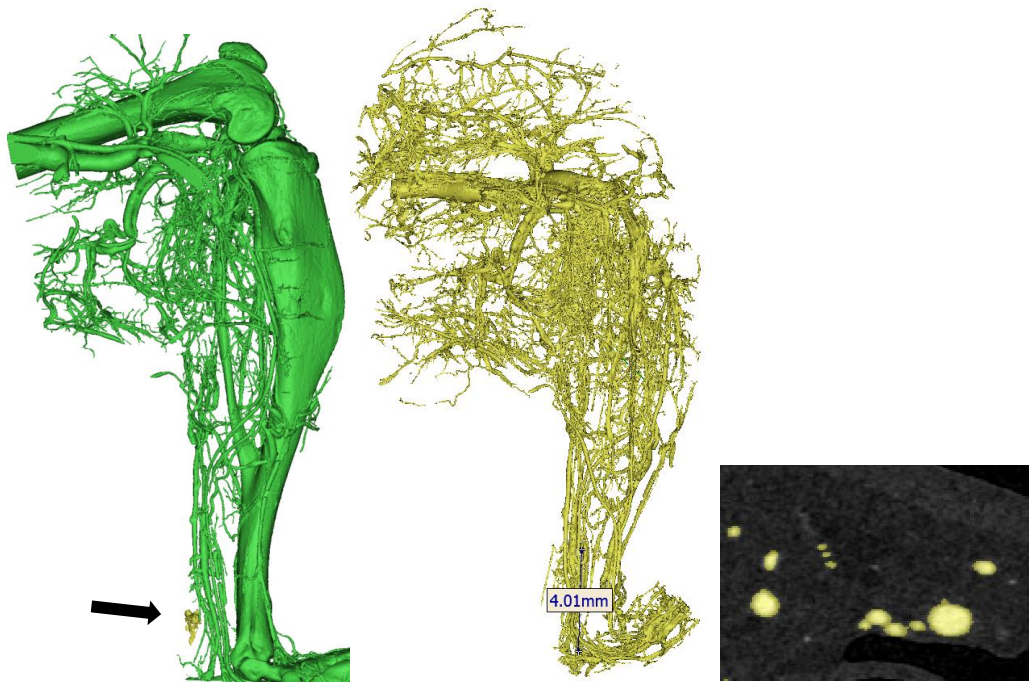


Abbildung 36: Versuchstier 57, Gruppe: Tenotomie mit Echinomycin; Pfeil: heterotope Ossifikation, Gefäßdarstellung und Querschnitt

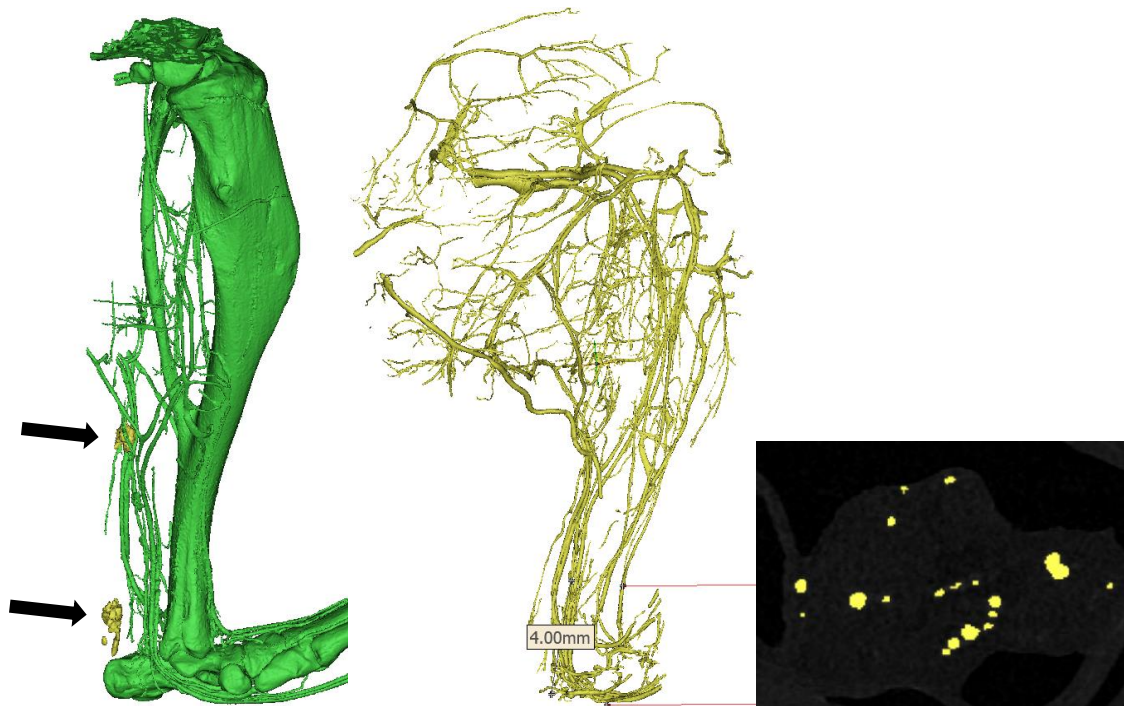


Abbildung 37: Versuchstier 58, Gruppe: Tenotomie mit Echinomycin; Pfeil: heterotope Ossifikation, Gefäßdarstellung und Querschnitt

4.3. Einfluss von Echinomycin auf heterotope Ossifikation unter Schädel-Hirn-Trauma

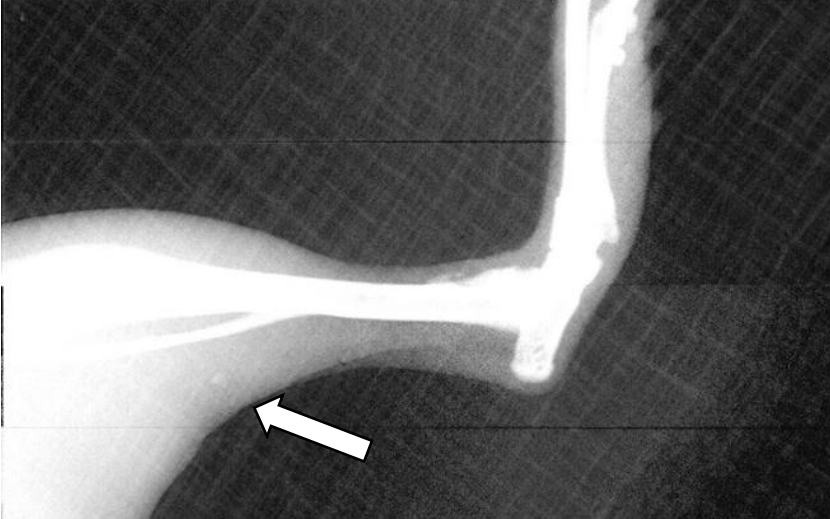
4.3.1. Fläche im Röntgenbild

Betrachtet man den folgenden Vergleich von Versuchstieren mit begleitendem Schädel-Hirn-Trauma zur Behandlungsgruppe mit zusätzlich wöchentlicher Gabe von Echinomycin, so lässt sich in Tabelle 17 herauslesen, dass ein Versuchstier bereits nach 21 Tagen ektope Knochenformationen aufwies. Dieses Tier stammt aus der Gruppe mit Echinomycin-Behandlung. Die erste Maus aus der Kontrollgruppe zeigte nach 28 Tagen die erste heterotope Ossifikation. Auffallend ist auch, dass in der Behandlungsgruppe Versuchstier 119 zunächst eine kleine Verdichtung im Röntgenbild entsprechend HO präsentierte, diese jedoch im Verlauf verschwand (siehe Abbildung 38). Dieses Tier entstammt der Gruppe mit EC-Gabe. Des Weiteren gab es in beiden Gruppen jeweils ein Versuchstier, welches im Verlauf keine heterotope Ossifikation gebildet hat.

Gruppe	Versuchstier	7d	14d	21d	28d	35d	49d	56d
Teno + SHT	86	0	0	0	0,069	0,594	2,172	3,275
	87	0	0	0	0	0,155	0,455	0,652
	88	0	0	0	0	0	0,077	0,249
	89	0	0	0	0	0	0,102	0,45
	90	0	0	0	0	0	0	0
Teno + SHT + EC	116	0	0	0	0	0	0,174	0,186
	117	0	0	0	0	0	0,189	0,490
	118	0	0	0,387	0,539	0,311	1,271	1,340
	119	0	0	0	0	0	0,054	0
	120	0	0	0	0	0	0	0

Tabelle 17: Ergebnistabelle zum Einfluss von Echinomycin auf die Fläche heterotoper Ossifikation nach Tenotomie mit begleitendem Schädel-Hirn-Trauma im Röntgenbild

[PatientID]: HO4.DT9.119, [Access#]: 10, [Name]: MOUSE, MR., [Gender]: M, [Time]: 2002/01/01 00:21:53
[File]: I20020101002153, [StudyID]: , [Study]: , [Proc]: , [Position]: RIGHT
[Physician]: , [TechID]: , [Tech]: A. HACKEMANN, [Station]: FAXITRON, [Institution]:



[PatientID]: HO4.DT9.119, [Access#]: 11, [Name]: MOUSE, MR., [Gender]: M, [Time]: 2002/01/01 00:22:48
[File]: I20020101002248, [StudyID]: , [Study]: , [Proc]: , [Position]: RIGHT
[Physician]: , [TechID]: , [Tech]: R. BURKHARDT, [Station]: FAXITRON, [Institution]:



Abbildung 38: Versuchstier 119, Gruppe: Tenotomie mit SHT und Echinomycin; oben: 49. Tag post-OP unten: 56. Tag post-OP; Pfeil: oben: HO, unten: keine HO mehr sichtbar

Aus den Ergebnissen der Tabelle 18 lässt sich in der Kontrollgruppe ein Mittelwert von $0,925 \text{ mm}^2$ mit einer hohen Standardabweichung berechnen, da ein Tier keine HO gebildet hatte, ein anderes Tier hingegen sehr stark. Die Standardabweichung in der Behandlungsgruppe liegt deutlich niedriger. Mit einem Maximum von $1,34 \text{ mm}^2$ und einem Mittelwert von $0,403 \text{ mm}^2$ zeigt sich eine geringere Ausprägung heterotoper Ossifikation. Zum Ende des Beobachtungszeitraumes wiesen die Tiere ohne Behandlung mit Echinomycin 43,6% mehr heterotopie Ossifikation auf. Betrachtet man die Mittelwerte im zeitlichen Verlauf, kann man eine deutlich flachere Zunahme der

ektopen Knochenbildung in der Behandlungsgruppe beobachten. Vergleicht man hierbei erneut die Zunahme zwischen Tag 49 und 56 post-OP stieg die Fläche in der Gruppe ohne Behandlung um 64,9% an, in der Behandlungsgruppe nur um 19,4%. Zusätzlich kam es zu einer zwischenzeitlichen Abnahme, was die Entwicklung des Versuchstieres mit der Nummer 119 widerspiegelt (siehe Abbildung 38). Die anderen Tiere in der Gruppe bildeten erst nach 49 Tagen heterotope Ossifikation aus.

Deskriptive Statistik						
EC	Tage post-OP	N	Minimum	Maximum	Mittelwert	Standardabweichung
nein	Fläche_21d	10	0	0	0	0
	Fläche_28d	5	0	0,069	0,014	0,031
	Fläche_35d	5	0	0,594	0,150	0,257
	Fläche_49d	5	0	2,172	0,561	0,917
	Fläche_56d	5	0	3,275	0,925	1,336
	Gültige Werte (Listenweise)	5				
ja	Fläche_21d	10	0	0,387	0,039	0,122
	Fläche_28d	5	0	0,539	0,108	0,241
	Fläche_35d	5	0	0,311	0,062	0,139
	Fläche_49d	5	0	1,271	0,338	0,528
	Fläche_56d	5	0	1,340	0,403	0,561
	Gültige Werte (Listenweise)	5				

Tabelle 18: Deskriptive Statistik zum Einfluss von Echinomycin auf die Fläche heterotoper Ossifikation nach Tenotomie mit begleitendem Schädel-Hirn-Trauma im Röntgenbild

Nach Herausrechnen der Ausreißer im Vergleich der Tage 35 und 56 post-OP in den Boxplots wird die geringere Bildung heterotoper Ossifikation, insbesondere in der frühen Phase mit der Gabe von Echinomycin deutlich (siehe Abbildung 39 und 40). In der graphischen Darstellung mittels Balkendiagramm wird sowohl die hohe Standardabweichung, insbesondere der Kontrollgruppe, als auch die zwischenzeitliche Abnahme der heterotopen Ossifikation in der Behandlungsgruppe deutlich (siehe Abbildung 41).

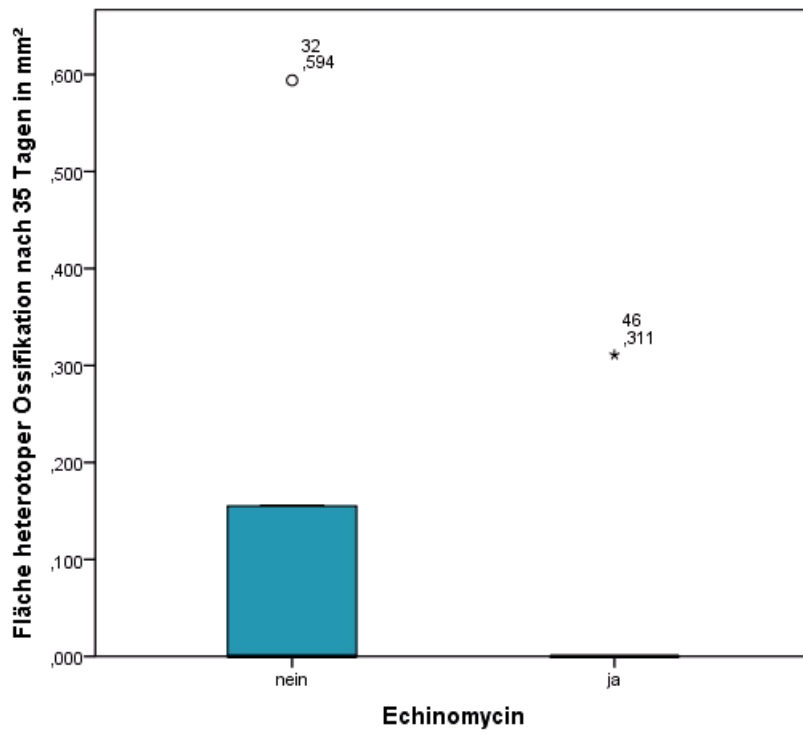


Abbildung 39: Boxplot zum Einfluss von Echinomycin auf die Fläche heterotoper Ossifikation nach Tenotomie mit begleitendem Schädel-Hirn-Trauma im Röntgenbild nach 35 Tagen post-OP

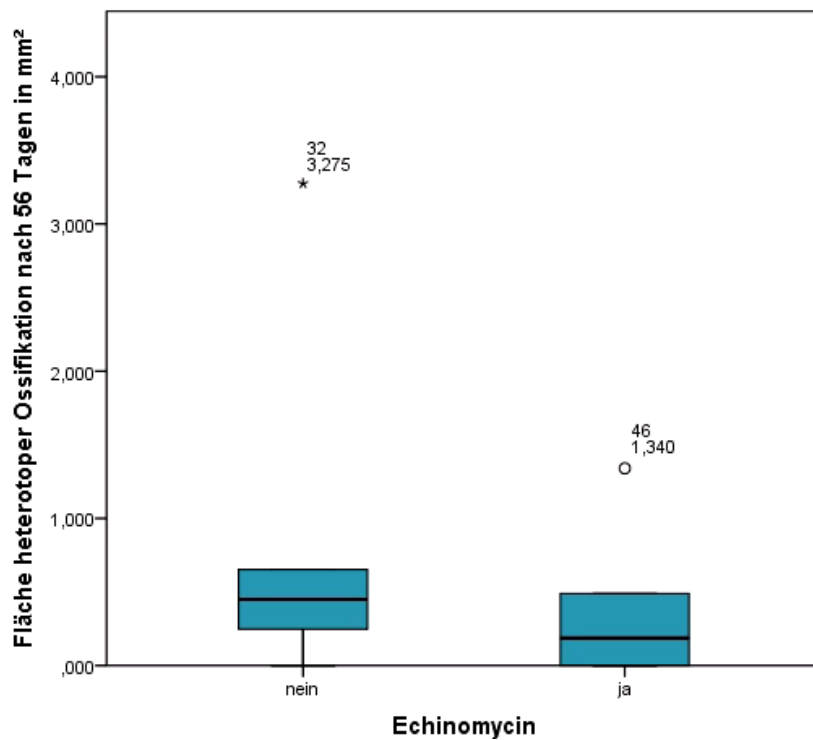


Abbildung 40: Boxplot zum Einfluss von Echinomycin auf die Fläche heterotoper Ossifikation nach Tenotomie mit begleitendem Schädel-Hirn-Trauma im Röntgenbild nach 56 Tagen post-OP

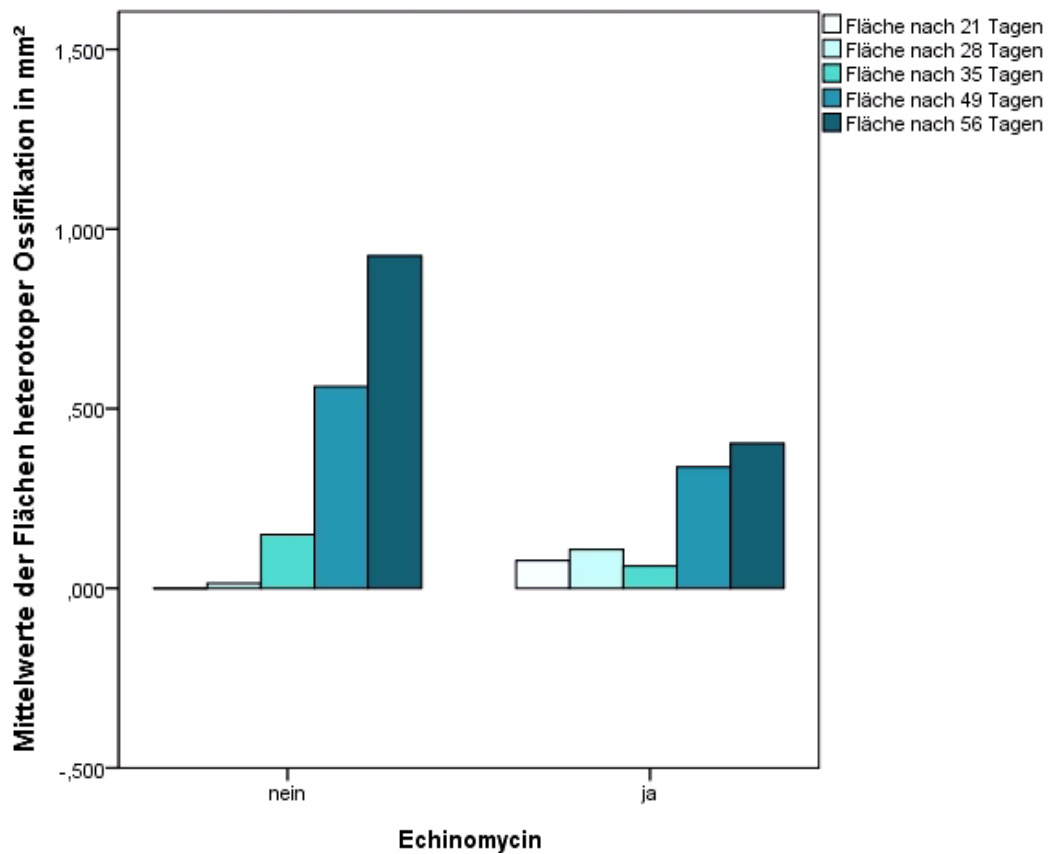


Abbildung 41: Balkendiagramm zum Einfluss von Echinomycin auf die Fläche heterotoper Ossifikation nach Tenotomie mit begleitendem Schädel-Hirn-Trauma im Röntgenbild

Führt man auch hier eine statistische Auswertung mit dem Mann-Whitney-U-Test durch, so gilt für die Nullhypothese, dass es keinen signifikanten Unterschied zwischen der Gruppe, die nur eine Tenotomie mit begleitendem SHT erhalten hatte und der Gruppe, welche zusätzlich mit Echinomycin therapiert wurde, gibt (siehe Tabelle 19). Auch hier wurde ein p von $<0,05$ als Signifikanzniveau festgelegt. Sowohl für die Fläche nach 35 Tagen mit einem p von 0.69 als auch nach 56 Tagen mit einem p von 0,548 wird die Nullhypothese beibehalten.

Ränge				
Tage post-OP	EC	N	Mittlerer Rang	Rangsumme
Fläche_35d	nein	5	6	30
	ja	5	5	25
	Gesamt	10		
Fläche_56d	nein	5	6,2	31
	ja	5	4,8	24
	Gesamt	10		

Statistik für Test ^a		
	Fläche_35d	Fläche_56d
Mann-Whitney-U	10	9
Wilcoxon-W	25	24
Z	-0,643	-0,740
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	0,521	0,459
Exakte Signifikanz [2*(1-seitige Sig.)]	0,690 ^b	0,548 ^b

Tabelle 19: Mann-Whitney-U-Test zum Einfluss von Echinomycin auf die Fläche heterotoper Ossifikation nach Tenotomie mit begleitendem Schädel-Hirn-Trauma im Röntgenbild

4.3.2. Volumen und Dichte in der μ CT

Betrachtet man in Tabelle 20 die Volumina und Dichten der gebildeten heterotopen Ossifikation in der μ CT, so fällt zunächst auf, dass eines der zufällig gewählten Versuchstiere der Behandlungsgruppe keine ektope Knochenbildung gebildet hat. Die beiden Tiere der Kontrollgruppe hatten eine sehr unterschiedlich starke Ausprägung von HO. Auffallend ist jedoch, dass in beiden Fällen die Dichte höher war als bei der Behandlungsgruppe. Die Volumina lagen für beide HU-Angaben unter Therapie mit Echinomycin deutlich niedriger. Graphisch spiegeln sich diese Ergebnisse in Abbildung 42 wider. Aufgrund der geringen Fallzahl sind diese Beobachtungen jedoch nur eingeschränkt beurteilbar.

Versuchstier	Gruppe	EC	Volumen > HU 9000	Volumen > HU 5000	Dichtefaktor	Notizen
76	CT5	nein	0	0		unzureichende Füllung
77	CT5		0	0		
82	CT3		0	0		
83	CT3		0	0		
86	CT9		0,055	0,628	0,087	
88	CT9		0,005	0,046	0,097	
107	DT5	ja	0	0		
110	DT5		0	0		
112	DT3		0	0		
113	DT3		0	0		
117	DT9		0,014	0,219	0,065	
119	DT9		0	0	0	

Tabelle 20: Ergebnistabelle zum Einfluss von Echinomycin auf Volumen und Dichte heterotoper Ossifikation nach Tenotomie mit Schädel-Hirn-Trauma in der μ CT

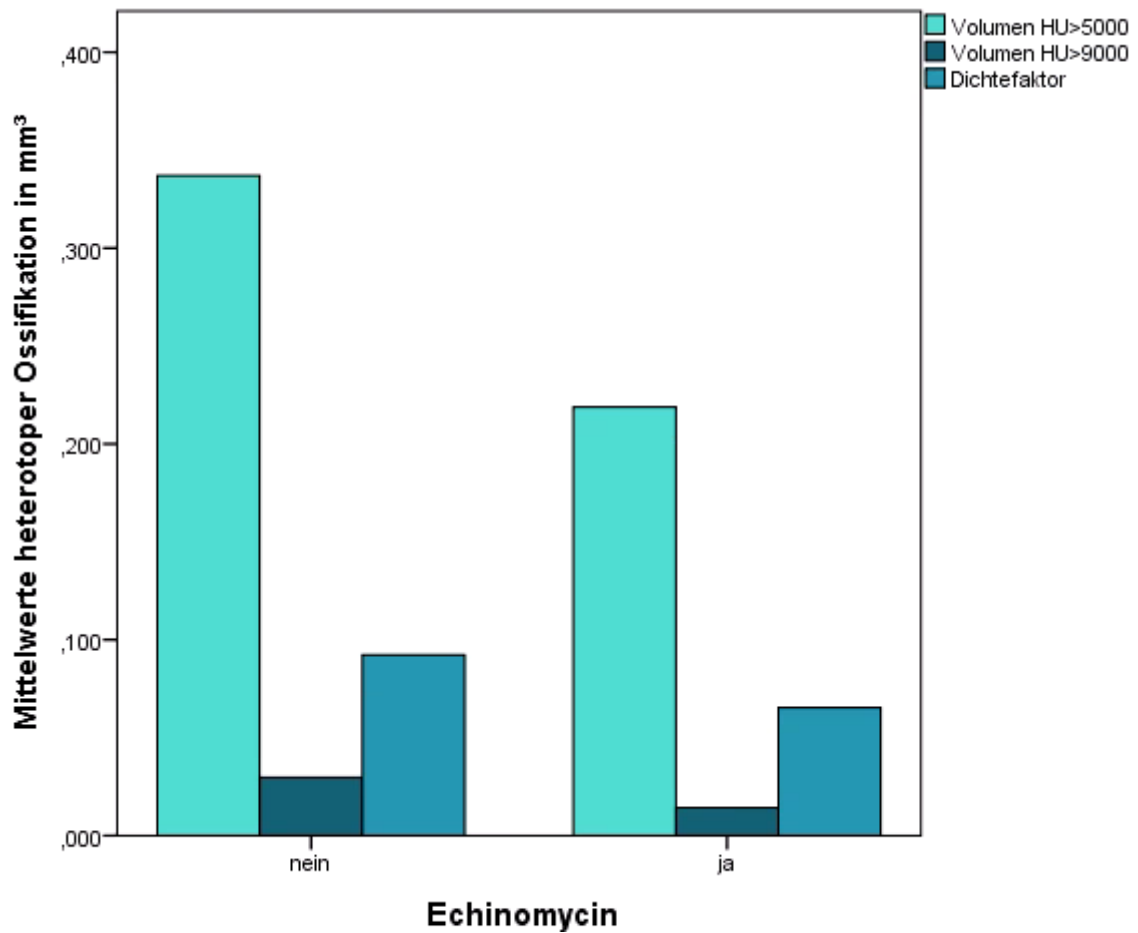


Abbildung 42: Balkendiagramm zum Einfluss von Echinomycin auf Volumen und Dichte heterotoper Ossifikation nach Tenotomie mit Schädel-Hirn-Trauma in der μ CT

4.3.3. Angiogenese in der μ -CT

Im Folgenden wurden die Tiere hinsichtlich der Angiogenese verglichen, wobei erneut ein Versuchstier aus der Analyse aufgrund *der* unzureichenden Füllung mit Kontrastmittel ausscheiden musste. Dieses Tier entstammt aus der Kontrollgruppe. In Tabelle 21 zeigt die einzelnen Werte der Versuchsgruppe aufgelistet.

Versuchstier	Gruppe	EC	Connectivity Fill	Gefäße im Querschnitt	Notizen
76	CT5	nein	0,294	0	unzureichende Füllung
77	CT5		3,936	9	
82	CT3		8,747	18	
83	CT3		7,836	24	
86	CT9		9,475	27	
88	CT9		12,914	21	
107	DT5	ja	5,463	10	
110	DT5		9,077	8	
112	DT3		5,915	16	
113	DT3		3,973	9	
117	DT9		8,127	14	
119	DT9		4,681	15	

Tabelle 21: Ergebnistabelle zum Einfluss von Echinomycin auf die Angiogenese heterotoper Ossifikation nach Tenotomie mit begleitendem Schädel-Hirn-Trauma in der μ CT

Aufgrund der niedrigen Fallzahlen sind auch diese Ergebnisse nur eingeschränkt zu beurteilen, allerdings zeigt sich in der Tendenz insbesondere zu späteren Zeitpunkten, dass Tiere mit Echinomycin-Behandlung weniger Gesamtvolumen an Gefäßen aufweisen. Betrachtet man hierbei in Tabelle 22 den Beobachtungszeitraum nach 56 Tagen, präsentierten die Tiere mit Schädel-Hirn-Trauma ohne Therapie 57,2% mehr HO. Auch im Querschnitt der Gefäße zeigt sich in Tabelle 24, dass Tiere ohne Behandlung im Schnitt fast zehn Gefäße mehr aufwiesen. Dies ist ein Hinweis auf Reduktion der Angiogenese unter Echinomycin-Gabe.

Deskriptive Statistik						
EC	Tage post-OP	N	Minimum	Maximum	Mittelwert	Standardabweichung
nein	Angio_Vol_5d	1	3,936	3,936	3,936	-
	Angio_Vol_21d	2	7,836	8,747	8,292	0,644
	Angio_Vol_56d	2	9,475	12,914	11,194	2,432
	Gültige Werte (Listenweise)	0				
ja	Angio_Vol_5d	2	5,463	9,077	7,270	2,555
	Angio_Vol_21d	2	3,973	5,915	4,944	1,373
	Angio_Vol_56d	2	4,681	8,127	6,404	2,437
	Gültige Werte (Listenweise)	0				

Tabelle 22: Deskriptive Statistik zum Einfluss von Echinomycin auf die Gesamtvolumina der Gefäße nach Tenotomie mit begleitendem Schädel-Hirn-Trauma in der μ CT

Deskriptive Statistik						
EC	Tage post-OP	N	Minimum	Maximum	Mittelwert	Standardabweichung
nein	Angio_cut_5d	1	9	9	9	-
	Angio_cut_21d	2	18	24	21	4,243
	Angio_cut_56d	2	21	27	24	4,243
	Gültige Werte (Listenweise)	0				
ja	Angio_cut_5d	2	8	10	9	1,414
	Angio_cut_21d	2	9	16	12,5	4,950
	Angio_cut_56d	2	14	15	14,5	0,707
	Gültige Werte (Listenweise)	0				

Tabelle 23: Deskriptive Statistik zum Einfluss von Echinomycin auf die Anzahl der Gefäße im Querschnitt nach Tenotomie mit begleitendem Schädel-Hirn-Trauma in der μ CT

Die folgenden Abbildungen 43 bis 46 zeigen die μ CT-Aufnahmen aller Mäuse der Versuchsgruppe nach 56 Tagen postoperativ nach bildmorphologischer Aufarbeitung. Die erste Graphik zeigt die Gesamtaufnahme, die heterotope Ossifikation ist hierbei gelb und mit Pfeilen markiert. Die nächste Graphik stellt die reine Gefäßdarstellung nach Dekalzifizierung des Knochens dar, in der letzten Graphik die CT-Aufnahme im Querschnitt auf Höhe der Tenotomie. Gelb markiert sind hierbei die kontrastmittelgefüllten Gefäße. Betrachtet man die Ergebnisse bildlich lässt sich ein deutlicher Unterschied wahrnehmen. Im Folgenden werden die Tiere aus der Gruppe der 56 Tage alten Mäuse miteinander verglichen. Es handelt sich um die Tiere 86 und 88, die kein Echinomycin erhalten haben sowie um Tier 117 und 119. Betrachtet man zunächst die Bildung heterotoper Ossifikation so fällt auf, dass Tier 86 aus der Gruppe ohne Echinomycin-Behandlung sowohl die stärkste Ausprägung von HO aufwies als auch die meisten Gefäße ausgebildet hatte. Versuchstier 88 bildete zwar nur eine kleine ektope Knochenformation auf, zeigte jedoch auch im Vergleich zur Behandlungsgruppe viele Gefäße auf. Die beiden Tiere aus der Behandlungsgruppe zeigten weniger Gefäßvolumina sowie eine geringere Anzahl an Gefäßen im Querschnitt. Tier 117 bildete hierunter ausgeprägte HO, während Tier 119 keine ausbildete.

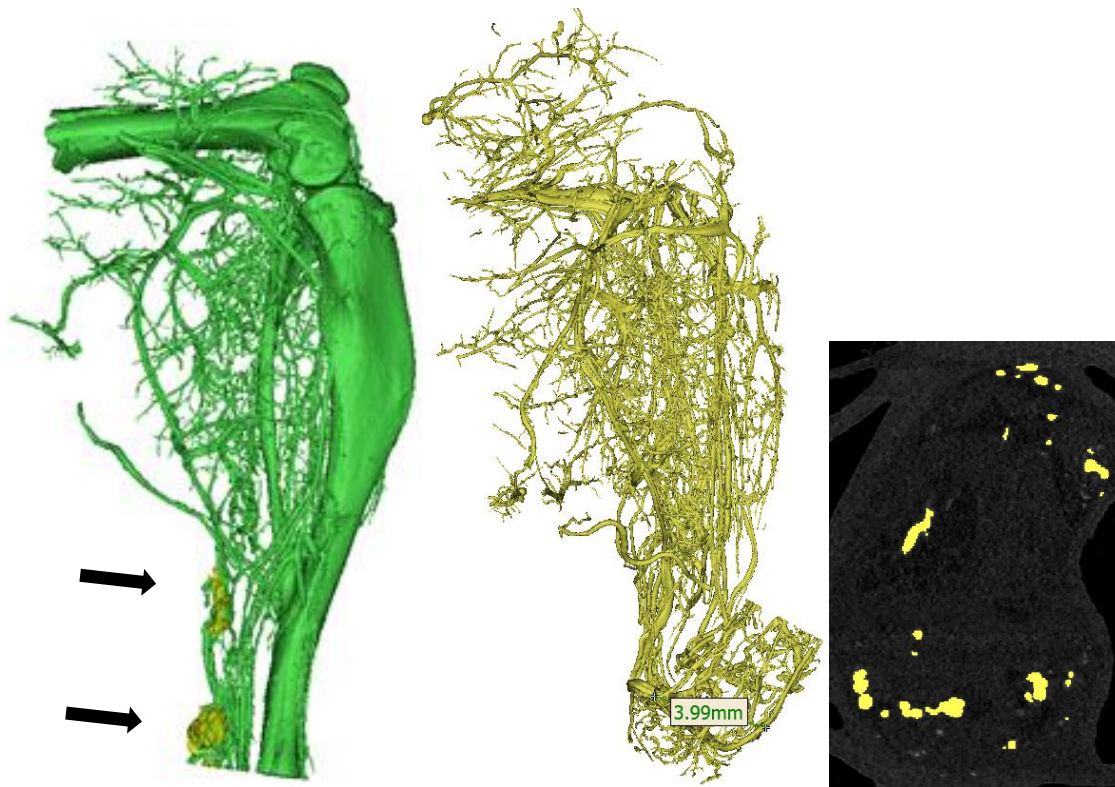


Abbildung 43: Versuchstier 86, Gruppe: Tenotomie mit Schädel-Hirn-Trauma ohne Echinomycin; Pfeil: heterotope Ossifikation; Gefäßdarstellung und Querschnitt

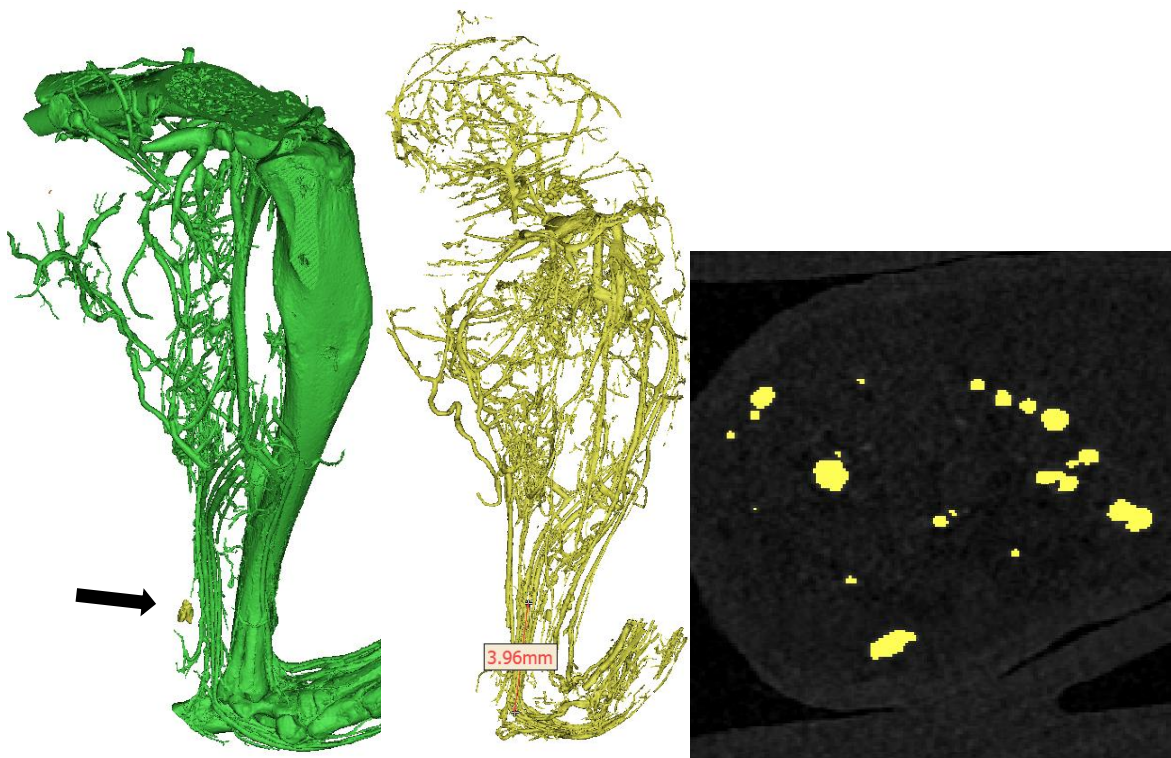


Abbildung 44: Versuchstier 88, Gruppe: Tenotomie mit Schädel-Hirn-Trauma ohne Echinomycin; Pfeil: heterotope Ossifikation; Gefäßdarstellung und Querschnitt

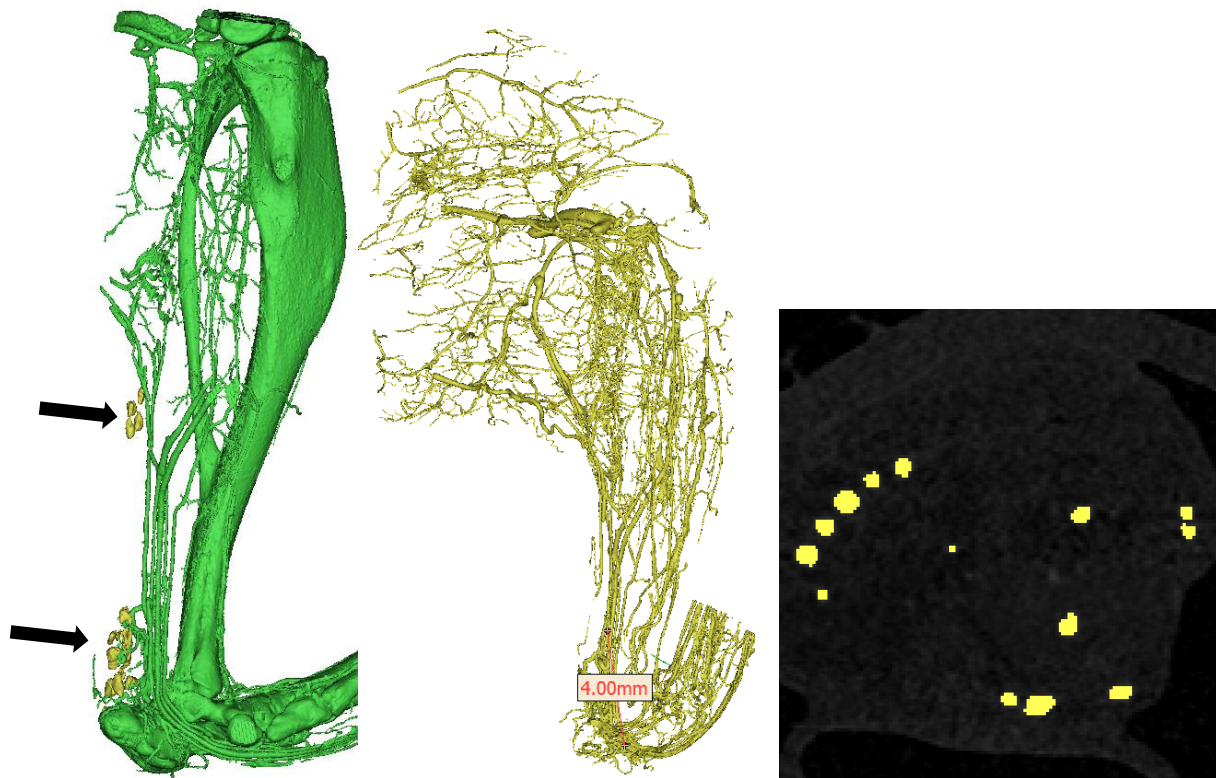


Abbildung 45: Versuchstier 117, Gruppe: Tenotomie mit Schädel-Hirn-Trauma und Echinomycin; Pfeil: heterotope Ossifikation; Gefäßdarstellung und Querschnitt

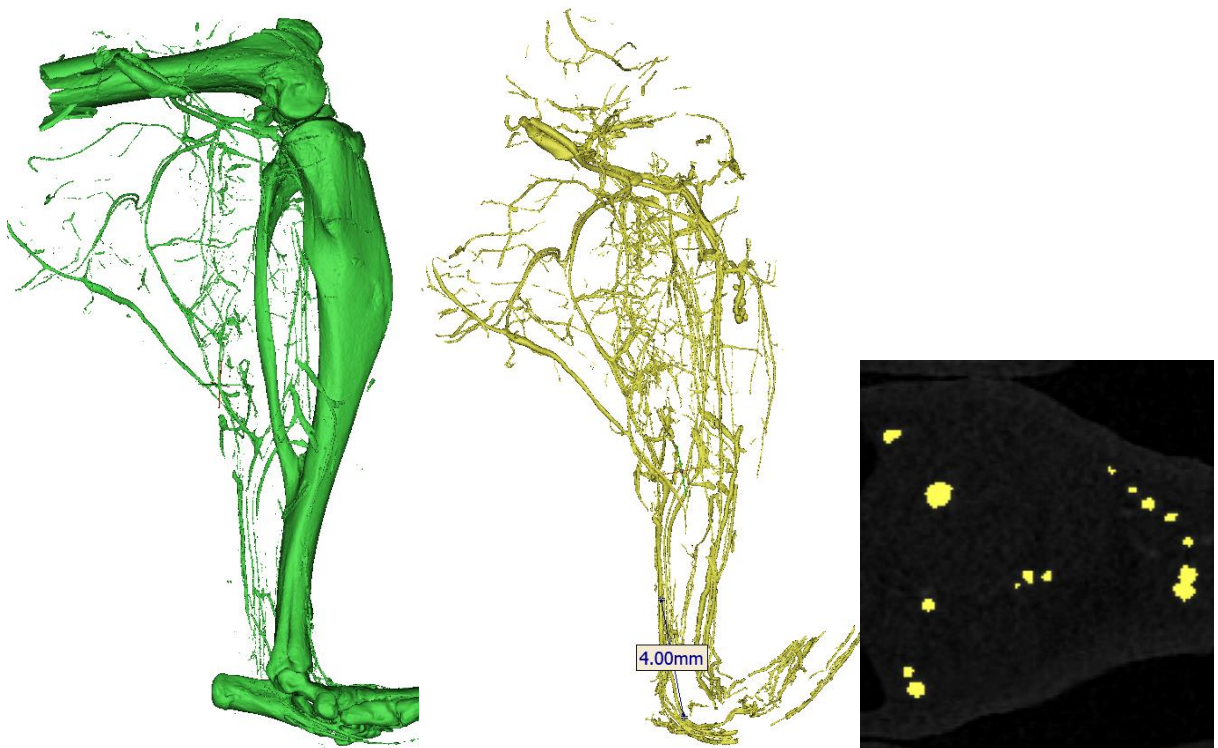


Abbildung 46: Versuchstier 119, Gruppe: Tenotomie mit Schädel-Hirn-Trauma mit Echinomycin; Pfeil: heterotope Ossifikation; Gefäßdarstellung und Querschnitt

5. Diskussion

5.1. Methoden und Vorgehensweise

Nachfolgend werden die einzelnen Methoden hinsichtlich der Gütekriterien Objektivität, Reliabilität sowie Validität beurteilt sowie im Kontext der aktuellen Forschung betrachtet.

5.1.1. Versuchsaufbau

Im Rahmen der Versuche wurden insgesamt 60 Tiere operiert. Bezüglich der Beurteilung heterotoper Ossifikation konnten abschließend nur die Tiere ausgewertet werden, welche erst nach 56 Tagen abgesetzt wurden. Dies lag zum einen an der späten Bildung heterotoper Ossifikation zum anderen wurde der Aufbau zusätzlichen Proteinanalysen angepasst, welche nicht Bestandteil der vorliegenden Dissertation sind. Die Bildung der drei Untergruppen ermöglicht zum einen die Untersuchung der Faktoren Echinomycin, Schädel-Hirn-Trauma sowie deren Kombination, verringert jedoch die Fallzahl deutlich. Hierdurch lassen sich Tendenzen und die Eignung der einzelnen Vorgehensweisen sehr breit darstellen, die statistische Auswertbarkeit sinkt hingegen.

5.1.2. Achillessehnen -Tenotomie

Schon seit vielen Jahren wird die Methode der Achillessehnen-Tenotomie zur Provokation heterotoper Ossifikation genutzt (118, 119). Heute ist das Modell mehrfach weiterentwickelt. Mit einer Inzidenz von 60% nach fünf Wochen und 100% nach zehn Wochen bei Mäusen zeichnet sich dieses Modell als effektiv, kostengünstig und leicht durchzuführen aus (120). Häufig verwendet wird es, um präventive Maßnahmen und Therapien zu Reduktion oder Vermeidung heterotoper HO zu prüfen. Allerdings ist HO im Bereich der Achillessehne beim Menschen eher selten, der Pathomechanismus der Entstehung ungeklärt und das Modell daher für Studien bezüglich der Übertragbarkeit auf den Menschen nur eingeschränkt geeignet (157). Auch im Rahmen dieser Studie zeigte sich die Durchführung als einfach und effektiv. Als auswertbar erwiesen sich allerdings nur die Tiere mit acht Wochen

Beobachtungszeitraum. Die Tiere mit Absetzzeitpunkt von fünf Tagen zeigten keinerlei heterotope Ossifikation, aus der Gruppe der Tiere mit 21 Tagen bildete nur ein Tier HO. Von den 20 Tieren die einen Beobachtungszeitraum von 56 Tagen hatten konnte bei insgesamt 17 HO nachgewiesen werden. Von den drei Tieren ohne heterotope Ossifikation stammen zwei aus der Behandlungsgruppe mit Echinomycin.

5.1.3. Controlled cortical impact

Seit über 100 Jahren werden Modelle entwickelt, um ein reproduzierbares Schädel-Hirn-Trauma hervorzurufen. Neben Traumata, die durch das Fallenlassen eines Gewichtes, einer Sprengung oder Druck durch Flüssigkeitskompression hervorgerufen werden, gibt es das controlled cortical impact Modell. Hierbei wird über eine stabile Konstruktion ein Kolben auf die freigelegte Hirnhaut aufgebracht und ein Bolzen pneumatisch ausgelöst. Neuere Entwicklungen nutzen einen elektromagnetischen Mechanismus, welcher den Versuchsaufbau vereinfacht. Die Parameter Tiefe, Verweildauer sowie Kraft können bei beiden Mechanismen reguliert und reproduzierbar angewendet werden (158). Diese vielfach gut bewährte Methode haben wir für unsere Versuche genutzt und konnten nahezu identische Parameter bezüglich des ausgelösten SHT messen. Die Prozedur erfordert jedoch eine zusätzliche Kraniotomie, weshalb der Zeitaufwand mit 30-60 min pro Versuchstier nötig ist. In Rahmen unserer Studie verstarben 2 Tiere während der Prozedur. Hierbei fand ein Wechsel des Operateurs statt. Wir vermuten hierbei ein tieferes Aufdrücken des Kolbens mit Verletzung der Dura mater und empfehlen den Versuchsablauf so zu gestalten, dass eine Person das controlled cortical impact Gerät anwendet. So kann das Auflegen des Kolbens auf die Dura mater identischer gestaltet werden und die Versuchsergebnisse bleiben unverfälscht.

5.1.4. Echinomycin-Injektion

Die Injektion mit Echinomycin subkutan zeigte sich als unkompliziertes und für die Tiere maßgeblich stressfreies Verfahren, da wir für den Zeitpunkt die Nachwirkphase der Inhalationsnarkotika nach Röntgenkontrolle nutzen konnten. Die Dosierung wurde nach entsprechender Literaturrecherche verwendet. Die LD50, also die Dosierung bei

der 50% der Tiere verstirbt liegt bei Mäusen bei 12,3 mg/kg Körpergewicht (159). Bei einer Dosierung von 10 mg/kg Körpergewicht wurden vermehrt Leberschädigungen nachgewiesen, eine Dosis von 5 mg/kg Körpergewicht zeigte sich unauffällig (160). Wir lehnten unser Vorgehen einer Studie von Zimmerman et al. aus dem Jahre 2013 an und nutzen eine Dosierung von 0,3 mg/kg Körpergewicht, verdünnt in DMSO als Trägerlösung. Zimmerman et al. führte an zehn Tieren die Injektion subcutan interscapulär über vier Wochen einmal täglich durch und beschrieb hierbei keine Auffälligkeiten (161). Im Gegensatz zu der von ihm beschriebenen Komplikationslosigkeit bildeten 55% unserer Tiere Verhärtungen und Krusten, 12% Ulzerationen an der Einstichstelle, welche einer chirurgischen Intervention bedurften. Zwar erhielten unsere Tiere teilweise eine längere Behandlungsdauer mit Echinomycin als in der oben genannten Studie, die Komplikationen traten jedoch in der Regel bereits innerhalb der ersten 4 Wochen auf. Da das Versuchsprotokoll identisch war beziehen sich diese Zahlen auf die gesamte Studie, einschließlich der Tiere mit Fraktur, welche in dieser Doktorarbeit nicht behandelt wurden.

5.1.5. Bildanalyse

Röntgen und ImageJ

Röntgenaufnahmen sind eine klassische Methode, um Knochen sicher darstellen zu können. In Bezug auf den vorliegenden Versuch liegen die Vorteile insbesondere in der Möglichkeit der in vivo Bildgebung. Hierdurch konnte eine Verlaufskontrolle der einzelnen Versuchstiere ermöglicht werden. Da die HO nur in einer Ebene dargestellt wurde und eine exakt identische Platzierung des Versuchstieres nicht gewährleistet werden konnte sind die Röntgenbilder im Vergleich zu den μ CT-Analysen ungenauer und ermöglichen keine Messung des HO Volumens. Neuere Röntgengeräte sind in der Lage die Berechnungen der Größe, welche hier mit ImageJ durchgeführt wurden, selbst durchzuführen. Allgemein lässt sich zusammenfassen, dass diese Methode valide HO messen kann.

μ CT-Aufnahmen

Die Anfertigung von μ CT-Aufnahmen erfordert eine umfassende Gerätetechnik mit entsprechender Expertise, oder wie in unserem Falle die Kooperation mit anderen Instituten oder Kliniken. Steht diese allerdings zur Verfügung erhält der Untersucher

sehr anschauliche Aufnahmen der heterotopen Ossifikation und kann diese sehr genau hinsichtlich des Volumens abmessen und statistisch vergleichen. Zudem ist eine Aussage über die Knochenstruktur selbst möglich. Durch die Angabe der Hounsfield-Einheiten können Rückschlüsse auf Dichte und damit Stärke des Knochengewebes gezogen werden.

Das Befüllen des Gefäßsystems mit Microfil® bedarf einiger Übung, sodass auch in unserem Versuchsablauf Tiere mit unzureichendem Ergebnis aus der Statistik herausgenommen werden mussten. Auch unter Tieren mit gutem Ergebnis konnte man in den CT-Aufnahmen sehen, dass nicht alle Gefäße perfundiert wurden und insbesondere kleinere Gefäße daher nicht mitberechnet wurden. Das Ergebnis selbst liefert darüber hinaus jedoch gut vergleichbare quantitative Zahlen und die Einschränkungen betreffen alle Versuchsgruppen. Mit einer entsprechend hohen Zahl an Versuchstieren verliert dieser Fehler an Stärke und man gewinnt sehr gute Untersuchungsergebnisse. Um verlässliche Statistiken über Angiogenese an festgelegten Stellen durchzuführen steht ansonsten nur noch die histologische Schnittbildzählung zur Verfügung, welche in ihrer Durchführung ähnlich aufwendig ist und keine 3D Bilder erzeugen kann. In beiden Fällen kann keine dynamische Messung erzeugt werden, da die Aufnahmen ausschließlich postmortal durchführbar sind.

Abschließend lässt sich zusammenfassen, dass μ CT-Aufnahmen zwar nicht unkompliziert und völlig unabhängig von den Fähigkeiten des Untersuchers sind, in ihren Ergebnissen jedoch qualitativ sehr hochwertige Ergebnisse bezüglich HO und Angiogenese liefern. Eine Weiterentwicklung des Systems mit neuen Füllmethoden und Aufnahmetechniken könnte dies in Zukunft deutlich vereinfachen.

5.2. Einfluss von Schädel-Hirn-Trauma auf heterotope Ossifikation

5.2.1. Pathophysiologie

Traumata, welche das zentrale und periphere Nervensystem betreffen führen zu einer Schädigung der Blut-Hirn-Schranke und lösen einen entzündlichen Prozess, Neuroinflammation genannt, aus, bei dem Entzündungszellen wie Neutrophile, Lymphozyten und Makrophagen freigesetzt werden (134, 152, 153). Zusätzlich setzen

zerstörte Zellen eine Vielzahl an Mediatoren, wie Wachstumsfaktoren und Zytokine frei (134).

Substanz P

Substanz P ist ein Neuropeptid, welches von Neuronen, Makrophagen, Eosinophilen, Lymphozyten und dendritischen Zellen sowohl im zentralen als auch peripheren Nervensystem exprimiert werden kann (162). Neuere Studien haben Substanz P im Rahmen der Pathogenese von HO identifiziert (38, 163). Es bindet an Neurokininrezeptoren, wobei insbesondere der Neurokininrezeptor-1, welcher von allen Skelettzellen exprimiert wird, eine zentrale Rolle in der Differenzierung von Chondro- und Osteoblasten spielt (164, 165). Die Spiegel von Substanz P zeigten sich bei Patienten nach neurogenem Trauma erhöht, eine Erhöhung konnte ebenso in knorpeligen Vorläuferstufen von neurogener HO gemessen werden (163, 166, 167). Dieser Pathomechanismus wird gestützt durch Studien, welche nachweisen konnten, dass durch Blockierung der Rezeptorbildung, bzw. -aktivität die Bildung heterotoper Ossifikation deutlich reduziert werden konnte (163). Neben der Wirkung über Neurokininrezeptor zeigte sich auch eine Erhöhung von Mastzellen entlang von Neuronen während der Expression von Substanz P (38). Dies legt nahe, dass eine Mastzellenaktivierung durch Substanz P stattfindet. Eine Supprimierung von Mastzellen, bzw. deren Degranulation konnte in Studien ebenso neurogene HO verringern, was auf einen osteoinduktiven Effekt der freigesetzten Stoffe hindeutet (163). Inhibition des Substanz P Signalweges zeigte bei nicht neurogener HO jedoch einen höheren Effekt als bei neurogener HO, was nahelegt, dass weitere Signalwege einen größeren Einfluss auf die Bildung heterotoper Ossifikation nach neurogenem Trauma haben (22, 163, 168). Diskutiert werden hierbei insbesondere Serotonin, welches im Knochenumbau eine relevante Rolle spielt, sowie dessen Stimulation von braunem Fettgewebe. Dieses wiederum schafft eine hypoxische Umgebung, woraufhin Induktion beispielsweise über HIF-1 α zu vermehrter Vaskularisierung und Bildung von HO führt (38, 169).

Makrophagen

Neben der Aktivierung von Osteoklasten und dem damit verbundenen Knochenabbau scheinen einige Untergruppen von Makrophagen auch eine Aktivierung von Osteoblasten und Mineralisierung von Knochen zu bewirken (170). Auch hinsichtlich der Bildung heterotoper Ossifikation wurden Makrophagen bereits als verstärkender

Faktor erkannt (171). Inaktivierung von Makrophagen zeigte insbesondere in Modellen mit neurogenem Trauma eine starke Reduzierung heterotoper Ossifikation. Daher kann angenommen werden, dass die Neuroinflammation einer der stärksten Signalwege der Pathogenese neurogener HO ist (38, 163, 171). Die Wirkweise von Makrophagen wird in der Stimulation von oncostatin M (OSM) und BMP-2 vermutet. Die Expression von OSM wurde bisher während der Differenzierung von Osteoblasten, sowie während Osteoblastenaktivität verstärkt gemessen (172). Die Signalkaskade über BMP-2 und sein osteoinduktiver Effekt wurden bereits vielfach erforscht und sind in Kapitel 3.1.2 genauer dargestellt.

HIF-1 α

Der hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) spielt insbesondere über die Expression von VEGF eine zentrale Rolle im Zwischenspiel von Angio- und Chondrogenese (55). Sang et al. verglichen die Konzentration von HIF-1 α bei Patienten mit Fraktur eines langen Röhrenknochens zu Patienten mit Fraktur und begleitendem Schädel-Hirn-Trauma. Sowohl im Serum, als auch im Frakturhämatom konnten in der Gruppe mit begleitendem SHT signifikant höhere Werte für HIF-1 α gemessen werden (155).

Inwiefern neurogene Traumata weitere Signalkaskaden betreffen ist aktuell noch Inhalt weiterer Forschungen. Dies gilt ebenso für die Interaktion der verschiedenen Kaskaden untereinander.

Studienbezug

Viele der Signalkaskaden zur Entstehung neurogener HO beeinflussen direkt oder indirekt die Expression von HIF-1 α . Geht man davon aus, dass diese Kaskade einen entscheidenden Faktor zur vermehrten HO-Bildung bei begleitendem Schädel-Hirn-Trauma darstellt, so sollte sich im Rahmen dieser Studie widerspiegeln, dass sowohl Vaskularisation als auch HO Bildung unter begleitendem SHT nach Tenotomie zunahm. Dieser Effekt sollte schließlich im zweiten Versuchsteil durch die Gabe von Echinomycin abgemildert werden.

5.2.2. Fläche, Volumen und Dichte

Retrospektive klinische Studien geben einen Hinweis auf eine erhöhte Inzidenz von HO nach neurogenem Trauma. Bargellesi et al. beispielsweise untersuchten

retrospektiv und multizentrisch Patienten mit schwerem Schädel-Hirn-Trauma. Hierbei zeigten von den 689 Patienten 13,6% heterotope Ossifikation von Gelenken. Diffuses Trauma, männliches Geschlecht, lange Komazeiten, die Notwendigkeit des Einsatzes maschineller Beatmung sowie Spastiken erhöhten das Risiko für HO (76). Eine Studie von Forsberg et al. untersuchte 243 Patienten nach Explosionstraumata. Hierbei entwickelten 86% der Patienten mit SHT heterotope Ossifikation. In der Gruppe mit vergleichbaren Traumata, jedoch ohne SHT wiesen 68% heterotope Ossifikation auf (29). Vergleicht man diese Werte mit der Inzidenz unserer Studie, so zeigten die Tiere mit begleitendem Schädel-Hirn-Trauma und ohne die Gabe von Echinomycin nach 56 Tagen eine Inzidenz von 80% (vier von fünf Tiere). Dies entspricht am ehesten der Auftretenswahrscheinlichkeit aus der Studie von Forsberg et al. nach Explosionstraumata. Sie liegt deutlich höher als die Ergebnisse von Bargellesi et al.

Es existieren nur sehr wenige Studien, die in Tierversuchen die Bildung heterotoper Ossifikation nach Traumata eines zusätzlichen neurogenen Traumas gegenüberstellen. Ein Beispiel ist die Arbeit von Scherbel et al. welche Ratten mittels Flüssigkeitsdruck ein Schädel-Hirn-Trauma zufügten und die Inzidenz und Bildung von BMP nach Tibiafraktur untersuchten. Hierbei wurden die Tiere jedoch nach 2 Tagen abgesetzt, sodass zwar bei den Tieren mit SHT erhöhte Konzentrationen von BMP-2 und 4 nachgewiesen wurden, jedoch die eventuelle Bildung heterotoper Ossifikation nicht beobachtet werden konnte (173). Unser Versuchsaufbau wurde so konzipiert, dass wir erstmalig in der Lage waren heterotope Ossifikation nach peripherem Trauma unter begleitendem Schädel-Hirn-Trauma zu erzeugen und das Knochenwachstum im Vergleich zur Studie von Scherbel et al. auch in ihrer Entwicklung untersuchen konnten.

Am vergleichbarsten mit unseren Daten ist die Studie von Anthonissen et al. welcher an Ratten die Bildung heterotoper Ossifikation nach operativem Hüfteingriff mit und ohne begleitendes Schädel-Hirn-Trauma untersuchte. Die 40 Tiere wurden hierbei in vier Gruppen eingeteilt. Isolierter Hüfteingriff, Hüfteingriff mit moderatem SHT, schwerem SHT und ausschließlich schwerem SHT ohne operativen Eingriff. Wie in unserer Studie verwendete er ein controlled cortical impact zum Erzeugen des neurogenen Traumas und untersuchte das OP-Gebiet später mittels μ CT-Analyse. Die Gruppen wurden visuell nach Brooker Klassifikation eingeteilt. Hierbei wird das Auftreten von heterotoper Ossifikation nach Ausprägung und Lage innerhalb der Hüfte

eingeteilt bis zur vollständigen Ankylose. Die Ratten zeigten unter begleitetem SHT ausgeprägtere Grade, steigend mit der Stärke des Schädel- Hirn-Traumas (174).

Diese Tendenz konnte in der vorliegenden Studie nicht bestätigt werden, hier wiesen Tiere ohne begleitendes Schädelhirntrauma eine stärkere Ausprägung und Auftretenswahrscheinlichkeit auf. Die berechnete Fläche der HO im Röntgenbild lag nach SHT im Mittelwert nach 56 Tagen bei 0,93 mm², ohne SHT bei 1,58 mm². Auch in den μ CT-Analysen zeigte sich kein Hinweis auf eine Zunahme von Dichte oder Volumen nach neurogenem Trauma. Allerdings muss man hierbei ergänzen, dass aufgrund der geringen Fallzahl die Ergebnisse limitiert zu betrachten sind. Das Tier mit der stärksten Ausprägung entstammte aus der Gruppe der SHT Tiere. Betrachtet man allerdings die Zunahme der HO über die Zeit so lässt sich berechnen, dass die Zunahme der HO bei Tieren mit SHT mit 64,9% deutlich höher liegt als bei Tieren ohne SHT (33,1%). Es besteht also die Möglichkeit, dass der Versuchsendpunkt von 56 Tagen zu früh gewählt wurde und sich im Verlauf eine stärkere HO in der SHT Gruppe gebildet hätte.

5.2.3. Angiogenese

Die Angiogenese ist ein wichtiger Faktor in der Entwicklung von Knochen. Die Neovaskularisierung innerhalb der primären und sekundären Ossifikationszentren ermöglicht erst die Entwicklung von Knochenbildung über enchondrale Ossifikation. Sie bedingt die Reifung der Chondrozyten und Invasion der Osteoblasten in die Ossifikationszentren. Die Signalkaskade über HIF-1 α und VEGF bedingen die Neovaskularisation sowie zusätzlich Überleben und Wachstum von Chondrozyten. Ohne Gefäßbildung können notwendige Zellen und Faktoren der Signalkaskaden nicht transportiert werden (156).

Da neurogene Schädigungen über eine vermehrte Bildung von HIF-1 α proangiogenetisch wirken könnte sich hier eine mögliche Ätiologie mit behandelbarem Angriffspunkt darstellen. Daher wurde in der vorliegenden Studie über μ CT-Analysen mit begleitender gefäßfüllender Kontrastmittelgabe untersucht, ob sich im Gebiet des peripheren Traumas bei begleitendem SHT mehr Gefäße darstellen ließen. Zwar zeigten sich bei den beiden jeweils untersuchten Tieren beider Gruppen nur leichte Abweichungen bezüglich der Gesamtvolumina an Gefäßen im Unterschenkel, die

Anzahl der Gefäße im Querschnitt auf Höhe des Traumas lag bei Tieren mit SHT jedoch doppelt so hoch. Bei der sehr geringen Zahl an Untersuchungen sollte dieses Ergebnis jedoch eher als Tendenz und als mögliches Untersuchungsverfahren für zukünftige, umfassendere Untersuchung angesehen werden. Sie sind allerdings ein Hinweis auf eine mögliche Pathogenese.

5.3. Einfluss von Echinomycin auf heterotope Ossifikation

5.3.1. Pathophysiologie

Echinomycin (NSC-13502) zählt zu den potentesten Inhibitoren von HIF-1 und hemmt hierüber auch VEGF, welcher wiederum zu den potentesten Aktivatoren der Angiogenese zählt (103). Neben der Proliferation und Hemmung der Apoptose von Endothelzellen sorgt VEGF durch Migration dieser Zellen zur Induktion der Tubulogenese und erhöht die vaskuläre Permeabilität (175, 176). Diese Vorgänge werden respektive im Rahmen von Hypoxien durch gesteigerte Freisetzung von HIF-1 verstärkt. Im Rahmen von pathologischer Angiogenese fördert VEGF außerdem die Mobilisierung von Entzündungszellen, wodurch wiederum proangiogenetische Faktoren freigesetzt werden (175).

Eine Hemmung von HIF-1 α zeigte im Mausmodell eine schmalere Knochenbildung mit dünnerer Kortikalis (177). Dies legt nahe, dass auch bei der Osteogenese im Rahmen von heterotoper Ossifikation die Angiogenese eine zentrale Rolle spielt. Eine Studie von Cocks et al untersuchte die unterschiedlichen Stadien der Gefäße während der Bildung von ektopem Knochen im Mausmodell. Hierbei präsentierten sich in der frühen Phase, die durch (myo-)fibroblastische Zellinvasion geprägt ist, eine reiche Zahl an dünnwandigen Kapillaren. Im weiteren Verlauf in der es zur Bildung von Lamellenknochen kam, nahm die Zahl der Gefäße ab, ihr Kaliber nahm jedoch deutlich zu (178). Proteinanalysen während der Entwicklung heterotoper Ossifikation konnten sowohl HIF-1 α als auch VEGF nachweisen, ebenso wie andere proangiogene und osteoinduktive Faktoren (179). Aufgrund der verschiedenen Studiendesigns zeigten sich die Konzentrationen zu unterschiedlichen Zeitpunkten sehr variabel. In einigen Studien zeigten sie sich bereits 48h nach dem HO auslösenden Ereignis, in anderen erst zum Zeitpunkt nach der Chondrogenese, wenn Gefäße zum Zwecke der Mineralisierung in das Knorpelgewebe eindringen (54, 180, 181). Diese Ergebnisse

legen nahe, dass eine Inhibition von VEGF über HIF-1 α mittels Echinomycin eine mögliche Therapieoption zur Verhinderung oder Abschwächung heterotoper Ossifikation darstellen könnte.

5.3.2. Fläche, Volumen und Dichte

Abgesehen von Grundlagenforschung auf molekularer Ebene ist die Studienlage bezüglich der Wirkung von Echinomycin auf heterotope Ossifikation sehr begrenzt. Zimmermann et al. waren bisher die einzigen, die im Mausmodell mittels Achillessehnenotomie und subcutaner EC-Injektion heterotope Ossifikation verglichen. Hierbei verwendeten sie männliche Mäuse der Gattung CD1 und teilten jeweils 10 davon in die Behandlungs- oder Kontrollgruppe ein. Alle Tiere erhielten eine Tenotomie der Achillessehne, bei der Hälfte der Tiere wurde zudem 0,3 mg pro Kilogramm Körpergewicht subcutan interscapulär appliziert. Dies erfolgte einmal wöchentlich über 4 Wochen. Nach 10 Wochen wurden die Tiere abgesetzt und histologisch sowie mittels μ CT-Analysen untersucht. Nach 10 Wochen zeigten die Tiere der Kontrollgruppe in 90%, in der Behandlungsgruppe mit EC in 75% der Fälle heterotope Ossifikation. Bei der Betrachtung des Volumens fiel auf, dass Echinomycin zu einer Reduktion von 90% von einem mittleren Volumen von 0,976 mm² in der Kontrollgruppe zu 0,092 mm² in der Behandlungsgruppe führte. Histologisch konnte eine Reduktion von HIF-1 α im lokalen Gewebe bei der Behandlungsgruppe festgestellt werden (161).

Die hier vorliegende Studie nutzte ein ähnliches Design, allerdings wurden die Tiere in mehrere Gruppen eingeteilt und auch eine dynamische Messung mittels wöchentlicher Röntgenbilder durchgeführt, die letzten Tiere wurden bereits nach 8 Wochen abgesetzt. In beiden Gruppen zeigten alle 5 Tiere nach diesem Endpunkt heterotope Ossifikation. Zwar lag die Reduktion nicht wie bei oben genannter Studie bei 90%, sondern bei 48,1% graphisch sowie rechnerisch zeigt sich jedoch ein Abflachen des Wachstums zwischen den letzten beiden Untersuchungszeitpunkten. Die Bildung heterotoper Ossifikation konnte somit auch hier nicht verhindert werden, aber die Tendenz der mildereren Ausprägung konnten wir bestätigen mit einem p von 0,016. Zusätzlich zur oben genannten Studie entwickelten wir mittels μ CT ein Verfahren, bei dem neben dem Volumen auch ein Rückschluss auf die Dichte der heterotopen Ossifikation, basierend auf unterschiedliche Hounsfield-Einheiten untersucht wurde.

Unter den Tieren für die μ CT-Untersuchung, die nach 35 Tagen post-OP abgesetzt wurden, zeigte nur eines der vier Tiere heterotope Ossifikation. Es entstammte der Kontrollgruppe. Aufgrund der niedrigen Fallzahlen sind die Ergebnisse zwar nur eingeschränkt zu beurteilen, allerdings liefern sie ein Hinweis darauf, dass neben dem Volumen der heterotopen Ossifikation auch die Dichte deutlich geringer ist. Dies stützt die pathophysiologischen Vermutungen, dass die Angiogenese einen essenziellen Faktor darstellt, um proangiogenetische Faktoren an den Ort des Traumas gelangen zu lassen sowie die Versorgung des wachsenden Knochens zu gewährleisten.

5.3.3. Angiogenese

Um die Hypothese besser bewerten zu können, dass Echinomycin über Hemmung der Angiogenese der physiologische Hintergrund der Verminderung heterotoper Ossifikation darstellt ist es nötig im gleichen Versuchsaufbau auch die Angiogenese zu überprüfen. Bisher ist in der Literatur keine vergleichbare Studie durchgeführt worden. Wir untersuchten die gleichen Tiere im Anschluss an die primäre CT-morphologische Bildgebung nach chemischer Auflösung der Knochenbestandteile des Beines. Zurück blieben Aufnahmen der mittels Kontrastmittel angefärbten Gefäße. Über die Untersuchung von je zwei Versuchstieren beider Gruppen zum Zeitpunkt nach 5, 21 und 56 Tagen ließ sich darstellen, dass eine Zunahme der Gefäße sowohl an Volumen als auch an Anzahl auf Höhe des Traumas stattfand. Hier zeigt sich, dass ein Trauma proangiogenetische Faktoren ausschüttet und physiologischerweise zu Neovaskularisation führt. Zum Zeitpunkt von fünf Tagen zeigen die Tiere in den Vergleichsgruppen sehr ähnliche Werte, allerdings konnte aufgrund von Ausschlüssen nur jeweils ein Tier betrachtet werden. Im Verlauf nahm die Vaskularisation bei den Tieren der Kontrollgruppe weniger stark zu als bei den Tieren mit Behandlung. Dies widerspricht der obigen Hypothese. Aufgrund der hohen Standardabweichungen bei sehr geringen Fallzahlen sollte eine Studie folgen, welche diese Idee aufgreift und mittels höherer Anzahl an Untersuchungen eine verwertbare statistische Aussage treffen kann. Die Methode selbst zeigte sich hierfür als geeignet.

5.4. Einfluss von Echinomycin auf heterotope Ossifikation mit Schädel-Hirn-Trauma

Betrachtet man die Überlegungen zur Pathogenese der beiden vorherigen Versuche lässt sich in Kürze zusammenfassen, dass Schädel-Hirn-Traumata durch gesteigerte Angiogenese heterotope Ossifikation verstärkt und Echinomycin über Hemmung der Angiogenese heterotope Ossifikation vermindert. Dies legt nahe, dass Echinomycin eine geeignete Therapie sei, um die gesteigerte ektopische Knochenbildung nach neurogenen Traumata zu unterbinden. Im Folgenden wurde daher der Effekt von Echinomycin auf heterotope Ossifikation bei Tieren untersucht, die zusätzlich ein Schädel-Hirn-Trauma erlitten hatten. Die Tiere mit zusätzlicher EC-Gabe werden als Behandlungsgruppe bezeichnet. Es wurde bisher noch keine Studie durchgeführt, die diesen Effekt behandelt.

5.4.1. Fläche, Volumen und Dichte

Betrachtet man zunächst die Fläche in der Auswertung der Röntgenbilder so zeigten die Tiere ohne Behandlung 43,6% mehr heterotope Ossifikation und auch die Kurve der Zunahme über die Zeit war deutlich flacher. Bei der geringen Fallzahl ergab sich ein p von 0,548 und somit zwar keine klare Signifikanz, jedoch eine Tendenz dahingehend, dass Echinomycin den pathogenetischen Effekt neurogener Traumata abmildern könnte. In der μ CT-Analyse zeigte eines der beiden Tiere der Behandlungsgruppe keine heterotope Ossifikation auf, das andere ein Volumen von $0,22 \text{ mm}^2$ bei Messungen über 5000 Hounsfield unit, was zwischen den Volumina der beiden Tiere in der Kontrollgruppe ($0,05 \text{ mm}^2$ und $0,63 \text{ mm}^2$) liegt. Interessant ist hierbei jedoch der Unterschied zwischen den Werten über 5000 und über 9000 HU. Das Tier welches HO in der Behandlungsgruppe entwickelt hatte zeigte einen niedrigeren Dichtefaktor als die Kontrollgruppe auf. Dies kann ein Hinweis darauf sein, dass heterotope Ossifikation, wenn sie nicht verhindert werden kann zumindest abgemildert wird. Dies kann beispielsweise durch verringerte Zufuhr von Stoffen durch geringere Gefäßbildung erklärt werden. Ob die Angiogenese jedoch wirklich beeinträchtigt wird ist im nächsten Kapitel untersucht worden.

5.4.2. Angiogenese

In den vorausgegangenen Untersuchungen zeigte sich bei begleitendem Schädel-Hirn-Trauma eine erhöhte Anzahl an Gefäßen im Untersuchungsgebiet. Eine Abschwächung der Angiogenese konnte im Vergleich von Tenotomien mit oder ohne Echinomycin nicht widerspiegelt werden. Dies kann zum einen auf den Versuchsaufbau mit einer zu geringen Fallzahl zurückgeführt werden, oder auf eine fehlende Wirksamkeit von Echinomycin. Im Gegensatz zu dieser vorherigen Untersuchung sieht man hingegen einen deutlichen Effekt von Echinomycin auf die Angiogenese bei Tieren mit begleitendem Schädel-Hirn-Trauma. Sowohl die Gesamtvolumina im Unterschenkel als auch die lokale Anzahl an Gefäßen auf Höhe des Traumas lag in der Behandlungsgruppe deutlich niedriger. Die Gesamtvolumina im Unterschenkel konnte um circa 57% gesenkt werden. Auch wiesen die Tiere im Querschnitt nur 14,5 statt 24 Gefäße auf. Diese Untersuchungen könnten ein Hinweis darauf sein, dass die überschießende Angiogenese und damit verbundene Ausbildung heterotoper Ossifikation nach begleitendem Schädel-Hirn-Trauma effektiv durch Echinomycin abgemildert werden kann. Das Studiendesign selbst ist dazu geeignet dies wiederzugeben, eine nachfolgende Studie mit höheren Fallzahlen sollte jedoch zwingend erfolgen, um den Effekt statistisch nachweisen zu können.

6. Ergebnis

Zum Abschluss kann man zusammenfassen, dass die Erforschung von heterotoper Ossifikation noch in den Anfängen steht. Neben den molekularen Mechanismen ist auch eine geeignete Therapie noch zum Großteil unerforscht, obgleich die klinische Relevanz bei ausgeprägter Beeinträchtigung der Patienten zunehmend in den Fokus der Wissenschaft rückt. Diese Studie leistet einen Beitrag hinsichtlich eines geeigneten Forschungsprotokolls, bei dem nachweislich und sicher heterotope Ossifikation hervorgerufen wird, ein reproduzierbares neurogenes Trauma zugefügt und mittels geeigneter Diagnostik eine aussagefähige Statistik erhoben werden kann. Die Applikation von Echinomycin zeigte sich nicht komplikationsfrei, insbesondere nach längerer Applikationszeit, weshalb hierhingehend alternative Methoden anzustreben sind. Auch das Füllen der Gefäße mit Microfil® gestaltete sich nicht problemlos. Hier könnten sich bessere Stoffe oder Herangehensweisen eignen oder das Übertragen des Protokolls auf größere Versuchstiere mit entsprechend größeren und damit leichter füllbaren Gefäßvolumina. Inwieweit sich die Therapie schließlich auf den Menschen übertragen lässt und ob sie für alle geeignet ist oder tatsächlich nur bei Patienten mit erhöhtem Risiko durch Schädel-Hirn-Trauma gilt es in Zukunft zu eruieren. Auch mögliche Nebenwirkungen durch Echinomycin durch Hemmung von Angiogenese an Orten, an denen sie stattfinden sollte, muss vor einer klinischen Anwendung geprüft werden. Parallel gilt es selbstverständlich immer alternative Therapien zu entwickeln. Hierbei wäre es insbesondere wünschenswert, wenn die Grundlagenforschung bezüglich der molekularen Mechanismen heterotoper Ossifikation und dem Einfluss der Angiogenese weiter vorangetrieben wird. Denn nur bei umfassendem Verständnis der Pathomechanismen einer Erkrankung kann am Ende eine geeignete Therapie entwickelt werden. Dies wird jedoch im Hinblick auf die heterotope Ossifikation vermutlich noch Jahre medizinischer Forschung in Anspruch nehmen.

7. Danksagung

(in der elektronischen Version entfernt)

8. Curriculum Vitae

(in der elektronischen Version entfernt)

9. Literaturverzeichnis

1. Patin G. Lettres Choisies: Dans lesquelles sont contenuës Plusieurs Particularités Historiques sur la Vie & la Mort des Sçavans de ce Siécle, sur leurs Ecrits & plusieurs autres choses curieuses depuis l'an 1645. jusqu'en 1672. ... Et divisées en Trois Volumes: Du Laurens; 1691.
2. Paterson DC. Myositis ossificans circumscripta. Report of four cases without history of injury. The Journal of bone and joint surgery British volume. 1970;52(2):296-301.
3. Thomson JE. Myositis Ossificans (Circumscripta) in the Ligamentum Nuchae. Annals of surgery. 1934;100(2):279-83.
4. Cope R. Heterotopic ossification. Southern medical journal. 1990;83(9):1058-64.
5. Zimmermann SM, Schwitter LW, Scheyerer MJ, Jentsch T, Simmen HP, Werner CM. Prevention of heterotopic ossification: an experimental study using a plasma expander in a murine model. BMC surgery. 2016;16(1):29.
6. An HS, Ebraheim N, Kim K, Jackson WT, Kane JT. Heterotopic ossification and pseudoarthrosis in the shoulder following encephalitis. A case report and review of the literature. Clinical orthopaedics and related research. 1987(219):291-8.
7. Sakellariou VI, Grigoriou E, Mavrogenis AF, Soucacos PN, Papagelopoulos PJ. Heterotopic ossification following traumatic brain injury and spinal cord injury: insight into the etiology and pathophysiology. Journal of musculoskeletal & neuronal interactions. 2012;12(4):230-40.
8. Kan L, Kessler JA. Evaluation of the cellular origins of heterotopic ossification. Orthopedics. 2014;37(5):329-40.
9. Pacifici M, Shore EM. Common mutations in ALK2/ACVR1, a multi-faceted receptor, have roles in distinct pediatric musculoskeletal and neural orphan disorders. Cytokine & growth factor reviews. 2016;27:93-104.
10. Cohen RB, Hahn GV, Tabas JA, Peeper J, Levitz CL, Sando A, et al. The natural history of heterotopic ossification in patients who have fibrodysplasia ossificans progressiva. A study of forty-four patients. The Journal of bone and joint surgery American volume. 1993;75(2):215-9.
11. Al Kaissi A, Kenis V, Ben Ghachem M, Hofstaetter J, Grill F, Ganger R, et al. The Diversity of the Clinical Phenotypes in Patients With Fibrodysplasia Ossificans Progressiva. Journal of clinical medicine research. 2016;8(3):246-53.
12. Kaplan FS, Zasloff MA, Kitterman JA, Shore EM, Hong CC, Rocke DM. Early mortality and cardiorespiratory failure in patients with fibrodysplasia ossificans progressiva. The Journal of bone and joint surgery American volume. 2010;92(3):686-91.
13. Pignolo RJ, Shore EM, Kaplan FS. Fibrodysplasia ossificans progressiva: diagnosis, management, and therapeutic horizons. Pediatric endocrinology reviews : PER. 2013;10 Suppl 2:437-48.
14. Birjandinejad A, Taraz-Jamshidi MH, Hosseinian SH. Total Ankylosis of the Upper Left Limb: A Case of Progressive Osseous Heteroplasia. The archives of bone and joint surgery. 2016;4(3):285-8.
15. Happle R. Progressive osseous heteroplasia is not a Mendelian trait but a type 2 segmental manifestation of GNAS inactivation disorders: A hypothesis. European journal of medical genetics. 2016;59(5):290-4.
16. Mariani M, Rigante D, Guerriero C, Ricci F, Sani I, Rossodivita A. Progressive osseous heteroplasia in a 7-year-old girl with osteoma cutis and autoimmune

- thyroiditis: the importance of investigating GNAS mutations. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology : JEADV*. 2016;30(5):905-7.
17. Lin MH, Numbenjapon N, Germain-Lee EL, Pitukcheewanont P. Progressive osseous heteroplasia, as an isolated entity or overlapping with Albright hereditary osteodystrophy. *Journal of pediatric endocrinology & metabolism : JPEM*. 2015;28(7-8):911-8.
 18. Kaplan FS, Glaser DL. Thoracic insufficiency syndrome in patients with fibrodysplasia ossificans progressiva. *Clinical Reviews in Bone and Mineral Metabolism*. 2005;3(3):213-6.
 19. Bedi A, Zbeda RM, Bueno VF, Downie B, Dolan M, Kelly BT. The incidence of heterotopic ossification after hip arthroscopy. *The American journal of sports medicine*. 2012;40(4):854-63.
 20. Brooker AF, Bowerman JW, Robinson RA, Riley LH, Jr. Ectopic ossification following total hip replacement. Incidence and a method of classification. *The Journal of bone and joint surgery American volume*. 1973;55(8):1629-32.
 21. Egli S, Woo A. Risk factors for heterotopic ossification in total hip arthroplasty. *Archives of orthopaedic and trauma surgery*. 2001;121(9):531-5.
 22. Genet F, Jourdan C, Schnitzler A, Lautridou C, Guillemot D, Judet T, et al. Troublesome heterotopic ossification after central nervous system damage: a survey of 570 surgeries. *PloS one*. 2011;6(1):e16632.
 23. Hayashi D, Gould ES, Ho C, Caruana DL, Komatsu DE, Yang J, et al. Severity of heterotopic ossification in patients following surgery for hip fracture: a retrospective observational study. *BMC musculoskeletal disorders*. 2019;20(1):348.
 24. Higo T, Mawatari M, Shigematsu M, Hotokebuchi T. The incidence of heterotopic ossification after cementless total hip arthroplasty. *The Journal of arthroplasty*. 2006;21(6):852-6.
 25. Spinarelli A, Patella V, Petrera M, Abate A, Pesce V, Patella S. Heterotopic ossification after total hip arthroplasty: our experience. *Musculoskeletal surgery*. 2011;95(1):1-5.
 26. Zhu Y, Zhang F, Chen W, Zhang Q, Liu S, Zhang Y. Incidence and risk factors for heterotopic ossification after total hip arthroplasty: a meta-analysis. *Archives of orthopaedic and trauma surgery*. 2015;135(9):1307-14.
 27. Foruria AM, Augustin S, Morrey BF, Sánchez-Sotelo J. Heterotopic ossification after surgery for fractures and fracture-dislocations involving the proximal aspect of the radius or ulna. *The Journal of bone and joint surgery American volume*. 2013;95(10):e66.
 28. Hong CC, Nashi N, Hey HW, Chee YH, Murphy D. Clinically relevant heterotopic ossification after elbow fracture surgery: a risk factors study. *Orthopaedics & traumatology, surgery & research : OTSR*. 2015;101(2):209-13.
 29. Forsberg JA, Pepek JM, Wagner S, Wilson K, Flint J, Andersen RC, et al. Heterotopic ossification in high-energy wartime extremity injuries: prevalence and risk factors. *The Journal of bone and joint surgery American volume*. 2009;91(5):1084-91.
 30. Daniels CM, Pavey GJ, Arthur J, Noller M, Forsberg JA, Potter BK. Has the Proportion of Combat-Related Amputations That Develop Heterotopic Ossification Increased? *Journal of orthopaedic trauma*. 2018;32(6):283-7.
 31. Orchard GR, Paratz JD, Blot S, Roberts JA. Risk Factors in Hospitalized Patients With Burn Injuries for Developing Heterotopic Ossification—A Retrospective Analysis. *Journal of Burn Care & Research*. 2015;36(4):465-70.
 32. Cholok D, Chung MT, Ranganathan K, Ucer S, Day D, Davis TA, et al. Heterotopic ossification and the elucidation of pathologic differentiation. *Bone*. 2018;109:12-21.

33. Pavey GJ, Qureshi AT, Hope DN, Pavlicek RL, Potter BK, Forsberg JA, et al. Bioburden Increases Heterotopic Ossification Formation in an Established Rat Model. *Clinical orthopaedics and related research*. 2015;473(9):2840-7.
34. Forsberg JA, Potter BK, Polfer EM, Safford SD, Elster EA. Do inflammatory markers portend heterotopic ossification and wound failure in combat wounds? *Clinical orthopaedics and related research*. 2014;472(9):2845-54.
35. LARSON JM, MICHALSKI JP, COLLACOTT EA, ELTORAI D, McCOMBS CC, MADORSKY JB. INCREASED PREVALENCE OF HLA-B27 IN PATIENTS WITH ECTOPIC OSSIFICATION FOLLOWING TRAUMATIC SPINAL CORD INJURY. *Rheumatology*. 1981;20(4):193-7.
36. Peterson JR, De La Rosa S, Sun H, Eboda O, Cilwa KE, Donneys A, et al. Burn injury enhances bone formation in heterotopic ossification model. *Annals of surgery*. 2014;259(5):993-8.
37. Qureshi AT, Crump EK, Pavey GJ, Hope DN, Forsberg JA, Davis TA. Early Characterization of Blast-related Heterotopic Ossification in a Rat Model. *Clinical Orthopaedics and Related Research®*. 2015;473(9):2831-9.
38. Salisbury E, Rodenberg E, Sonnet C, Hipp J, Gannon FH, Vadakkan TJ, et al. Sensory nerve induced inflammation contributes to heterotopic ossification. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2011;112(10):2748-58.
39. Lees-Shepard JB, Goldhamer DJ. Stem cells and heterotopic ossification: Lessons from animal models. *Bone*. 2018;109:178-86.
40. Park I-H, Zhao R, West JA, Yabuuchi A, Huo H, Ince TA, et al. Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors. *Nature*. 2008;451(7175):141-6.
41. Urist MR. Bone: formation by autoinduction. *Science (New York, NY)*. 1965;150(3698):893-9.
42. Urist MR, Mikulski A, Lietze A. Solubilized and insolubilized bone morphogenetic protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1979;76(4):1828-32.
43. Salazar VS, Gamer LW, Rosen V. BMP signalling in skeletal development, disease and repair. *Nature Reviews Endocrinology*. 2016;12(4):203-21.
44. Lo KWH, Ulery BD, Ashe KM, Laurencin CT. Studies of bone morphogenetic protein-based surgical repair. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2012;64(12):1277-91.
45. Miyazono K, Maeda S, Imamura T. BMP receptor signaling: Transcriptional targets, regulation of signals, and signaling cross-talk. *Cytokine & growth factor reviews*. 2005;16(3):251-63.
46. Guo X, Wang X-F. Signaling cross-talk between TGF- β /BMP and other pathways. *Cell Research*. 2009;19(1):71-88.
47. Hatsell SJ, Idone V, Wolken DMA, Huang L, Kim HJ, Wang L, et al. ACVR1R206H receptor mutation causes fibrodysplasia ossificans progressiva by imparting responsiveness to activin A. *Sci Transl Med*. 2015;7(303):303ra137-303ra137.
48. Hino K, Ikeya M, Horigome K, Matsumoto Y, Ebise H, Nishio M, et al. Neofunction of ACVR1 in fibrodysplasia ossificans progressiva. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2015;112(50):15438-43.
49. Perl A. Activation of mTOR (mechanistic target of rapamycin) in rheumatic diseases. *Nat Rev Rheumatol*. 2016;12(3):169-82.
50. Valer JA, Sánchez-de-Diego C, Gámez B, Mishina Y, Rosa JL, Ventura F. Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase α (PI3K α) prevents heterotopic ossification. *EMBO Mol Med*. 2019;11(9):e10567-e.

51. Guan Y, Yang X, Yang W, Charbonneau C, Chen Q. Mechanical activation of mammalian target of rapamycin pathway is required for cartilage development. *The FASEB Journal*. 2014;28(10):4470-81.
52. Sinha S, Uchibe K, Usami Y, Pacifici M, Iwamoto M. Effectiveness and mode of action of a combination therapy for heterotopic ossification with a retinoid agonist and an anti-inflammatory agent. *Bone*. 2016;90:59-68.
53. Haase VH. The VHL tumor suppressor: master regulator of HIF. *Curr Pharm Des*. 2009;15(33):3895-903.
54. Dilling CF, Wada AM, Lazard ZW, Salisbury EA, Gannon FH, Vadakkan TJ, et al. Vessel formation is induced prior to the appearance of cartilage in BMP-2-mediated heterotopic ossification. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 2010;25(5):1147-56.
55. Fan L, Li J, Yu Z, Dang X, Wang K. The hypoxia-inducible factor pathway, prolyl hydroxylase domain protein inhibitors, and their roles in bone repair and regeneration. *BioMed research international*. 2014;2014:239356.
56. Amarilio R, Viukov S, Sharir A, Eshkar-Oren I, Johnson R, Zelzer E. Amarilio, R, Viukov, SV, Sharir, A, Eshkar-Oren, I, Johnson, RS and Zelzer, E. HIF1alpha regulation of Sox9 is necessary to maintain differentiation of hypoxic prechondrogenic cells during early skeletogenesis. *Development* 134: 3917-3928. *Development (Cambridge, England)*. 2007;134:3917-28.
57. Robins JC, Akeno N, Mukherjee A, Dalal RR, Aronow BJ, Koopman P, et al. Hypoxia induces chondrocyte-specific gene expression in mesenchymal cells in association with transcriptional activation of Sox9. *Bone*. 2005;37(3):313-22.
58. Wang Y, Wan C, Deng L, Liu X, Cao X, Gilbert SR, et al. The hypoxia-inducible factor alpha pathway couples angiogenesis to osteogenesis during skeletal development. *The Journal of clinical investigation*. 2007;117(6):1616-26.
59. Rosenberg AE. Pseudosarcomas of soft tissue. *Archives of pathology & laboratory medicine*. 2008;132(4):579-86.
60. Hoch B, Montag A. Reactive bone lesions mimicking neoplasms. *Seminars in diagnostic pathology*. 2011;28(1):102-12.
61. Meyers C, Lisiecki J, Miller S, Levin A, Fayad L, Ding C, et al. Heterotopic Ossification: A Comprehensive Review. *JBMR plus*. 2019;3(4):e10172.
62. Tyler P, Saifuddin A. The imaging of myositis ossificans. *Seminars in musculoskeletal radiology*. 2010;14(2):201-16.
63. Kransdorf MJ, Meis JM. From the archives of the AFIP. Extraskelatal osseous and cartilaginous tumors of the extremities. *Radiographics : a review publication of the Radiological Society of North America, Inc*. 1993;13(4):853-84.
64. Shehab D, Elgazzar AH, Collier BD. Heterotopic ossification. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine*. 2002;43(3):346-53.
65. Zagarella A, Impellizzeri E, Maiolino R, Attolini R, Castoldi MC. Pelvic heterotopic ossification: when CT comes to the aid of MR imaging. *Insights into imaging*. 2013;4(5):595-603.
66. McCarthy EF, Sundaram M. Heterotopic ossification: a review. *Skeletal radiology*. 2005;34(10):609-19.
67. O'Brien EJ, Frank CB, Shrive NG, Hallgrímsson B, Hart DA. Heterotopic mineralization (ossification or calcification) in tendinopathy or following surgical tendon trauma. *International journal of experimental pathology*. 2012;93(5):319-31.
68. Lacout A, Jarraya M, Marcy PY, Thariat J, Carlier RY. Myositis ossificans imaging: keys to successful diagnosis. *The Indian journal of radiology & imaging*. 2012;22(1):35-9.
69. Cvitanic O, Sedlak J. Acute myositis ossificans. *Skeletal radiology*. 1995;24(2):139-41.

70. Wang Q, Zhang P, Li P, Song X, Hu H, Li X, et al. Ultrasonography Monitoring of Trauma-Induced Heterotopic Ossification: Guidance for Rehabilitation Procedures. *Frontiers in neurology*. 2018;9:771.
71. Dey D, Wheatley BM, Cholok D, Agarwal S, Yu PB, Levi B, et al. The traumatic bone: trauma-induced heterotopic ossification. *Translational research : the journal of laboratory and clinical medicine*. 2017;186:95-111.
72. Ranganathan K, Peterson J, Agarwal S, Oluwatobi E, Loder S, Forsberg JA, et al. Role of gender in burn-induced heterotopic ossification and mesenchymal cell osteogenic differentiation. *Plastic and reconstructive surgery*. 2015;135(6):1631-41.
73. Zanotti S, Kalajzic I, Aguila HL, Canalis E. Sex and genetic factors determine osteoblastic differentiation potential of murine bone marrow stromal cells. *PloS one*. 2014;9(1):e86757.
74. van Kampen PJ, Martina JD, Vos PE, Hoedemaekers CW, Hendricks HT. Potential risk factors for developing heterotopic ossification in patients with severe traumatic brain injury. *The Journal of head trauma rehabilitation*. 2011;26(5):384-91.
75. Citak M, Suero EM, Backhaus M, Aach M, Godry H, Meindl R, et al. Risk factors for heterotopic ossification in patients with spinal cord injury: a case-control study of 264 patients. *Spine*. 2012;37(23):1953-7.
76. Bargellesi S, Cavasin L, Scarponi F, De Tanti A, Bonaiuti D, Bartolo M, et al. Occurrence and predictive factors of heterotopic ossification in severe acquired brain injured patients during rehabilitation stay: cross-sectional survey. *Clinical rehabilitation*. 2017:269215517723161.
77. Dizdar D, Tiftik T, Kara M, Tunc H, Ersoz M, Akkus S. Risk factors for developing heterotopic ossification in patients with traumatic brain injury. *Brain injury*. 2013;27(7-8):807-11.
78. Neal BC, Rodgers A, Clark T, Gray H, Reid IR, Dunn L, et al. A systematic survey of 13 randomized trials of non-steroidal anti-inflammatory drugs for the prevention of heterotopic bone formation after major hip surgery. *Acta orthopaedica Scandinavica*. 2000;71(2):122-8.
79. Barbato M, D'Angelo E, Di Loreto G, Menna A, Di Francesco A, Salini V, et al. Adherence to routine use of pharmacological prophylaxis of heterotopic ossification after total hip arthroplasty: results from an Italian multicenter, prospective, observational survey. *Journal of orthopaedics and traumatology : official journal of the Italian Society of Orthopaedics and Traumatology*. 2012;13(2):63-7.
80. Raisz LG. Potential impact of selective cyclooxygenase-2 inhibitors on bone metabolism in health and disease. *The American journal of medicine*. 2001;110 Suppl 3A:43s-5s.
81. Vasileiadis GI, Sioutis IC, Mavrogenis AF, Vlasis K, Babis GC, Papagelopoulos PJ. COX-2 inhibitors for the prevention of heterotopic ossification after THA. *Orthopedics*. 2011;34(6):467.
82. Dimmen S, Nordsletten L, Madsen JE. Parecoxib and indomethacin delay early fracture healing: a study in rats. *Clinical orthopaedics and related research*. 2009;467(8):1992-9.
83. Lanas A, Garcia-Rodriguez LA, Arroyo MT, Gomollon F, Feu F, Gonzalez-Perez A, et al. Risk of upper gastrointestinal ulcer bleeding associated with selective cyclooxygenase-2 inhibitors, traditional non-aspirin non-steroidal anti-inflammatory drugs, aspirin and combinations. *Gut*. 2006;55(12):1731-8.
84. Schmidt M, Lamberts M, Olsen AM, Fosboll E, Niessner A, Tamargo J, et al. Cardiovascular safety of non-aspirin non-steroidal anti-inflammatory drugs: review and position paper by the working group for Cardiovascular Pharmacotherapy of the European Society of Cardiology. *European heart journal*. 2016;37(13):1015-23.

85. Varga Z, Sabzwari SRA, Vargova V. Cardiovascular Risk of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs: An Under-Recognized Public Health Issue. *Cureus*. 2017;9(4):e1144.
86. Kneitz C, Tony HP, Krüger K. [NSAIDs and COX-2-inhibitors: current status]. *Der Internist*. 2006;47(5):533-4, 6-8, 40.
87. Rivera JC, Hsu JR, Noel SP, Wenke JC, Rathbone CR. Locally Delivered Nonsteroidal Antiinflammatory Drug: A Potential Option for Heterotopic Ossification Prevention. *Clinical and translational science*. 2015;8(5):591-3.
88. Sautter-Bihl ML, Liebermeister E, Nanassy A. Radiotherapy as a local treatment option for heterotopic ossifications in patients with spinal cord injury. *Spinal cord*. 2000;38(1):33-6.
89. Coventry MB, Scanlon PW. The use of radiation to discourage ectopic bone. A nine-year study in surgery about the hip. *The Journal of bone and joint surgery American volume*. 1981;63(2):201-8.
90. Ayers DC, Pellegrini VD, Jr., Evarts CM. Prevention of heterotopic ossification in high-risk patients by radiation therapy. *Clinical orthopaedics and related research*. 1991(263):87-93.
91. Ellerin BE, Helfet D, Parikh S, Hotchkiss RN, Levin N, Nisce L, et al. Current therapy in the management of heterotopic ossification of the elbow: a review with case studies. *American journal of physical medicine & rehabilitation*. 1999;78(3):259-71.
92. Popovic M, Agarwal A, Zhang L, Yip C, Kreder HJ, Nousiainen MT, et al. Radiotherapy for the prophylaxis of heterotopic ossification: a systematic review and meta-analysis of published data. *Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology*. 2014;113(1):10-7.
93. Milakovic M, Popovic M, Raman S, Tsao M, Lam H, Chow E. Radiotherapy for the prophylaxis of heterotopic ossification: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology*. 2015;116(1):4-9.
94. Archdeacon MT, d'Heurle A, Nemeth N, Budde B. Is preoperative radiation therapy as effective as postoperative radiation therapy for heterotopic ossification prevention in acetabular fractures? *Clinical orthopaedics and related research*. 2014;472(11):3389-94.
95. Liu JZ, Frisch NB, Barden RM, Rosenberg AG, Silverton CD, Galante JO. Heterotopic Ossification Prophylaxis After Total Hip Arthroplasty: Randomized Trial of 400 vs 700 cGy. *The Journal of arthroplasty*. 2017;32(4):1328-34.
96. Schaeffer MA, Sosner J. Heterotopic ossification: treatment of established bone with radiation therapy. *Archives of physical medicine and rehabilitation*. 1995;76(3):284-6.
97. Lee CH, Shim SJ, Kim HJ, Yang H, Kang YJ. Effects of Radiation Therapy on Established Neurogenic Heterotopic Ossification. *Annals of rehabilitation medicine*. 2016;40(6):1135-9.
98. Jang SH, Shin SW, Ahn SH, Cho IH, Kim SH. Radiation therapy for heterotopic ossification in a patient with traumatic brain injury. *Yonsei medical journal*. 2000;41(4):536-9.
99. Cipriano C, Pill SG, Rosenstock J, Keenan MA. Radiation therapy for preventing recurrence of neurogenic heterotopic ossification. *Orthopedics*. 2009;32(9).
100. Vavken P, Castellani L, Sculco TP. Prophylaxis of heterotopic ossification of the hip: systematic review and meta-analysis. *Clinical orthopaedics and related research*. 2009;467(12):3283-9.
101. Strauss JB, Chen SS, Shah AP, Coon AB, Dickler A. Cost of radiotherapy versus NSAID administration for prevention of heterotopic ossification after total hip

- arthroplasty. *International journal of radiation oncology, biology, physics*. 2008;71(5):1460-4.
102. Park JY, Chang J-H, Bae KS, Lee KH, Choi SJ, Park JY, et al. NF- κ B-dependency and consequent regulation of IL-8 in echinomycin-induced apoptosis of HT-29 colon cancer cells. *Cell Biology International*. 2008;32(10):1207-14.
103. Kong D, Park EJ, Stephen AG, Calvani M, Cardellina JH, Monks A, et al. Echinomycin, a small-molecule inhibitor of hypoxia-inducible factor-1 DNA-binding activity. *Cancer research*. 2005;65(19):9047-55.
104. Vanden Bossche L, Vanderstraeten G. Heterotopic ossification: a review. *Journal of rehabilitation medicine*. 2005;37(3):129-36.
105. van Kuijk AA, Geurts AC, van Kuppevelt HJ. Neurogenic heterotopic ossification in spinal cord injury. *Spinal cord*. 2002;40(7):313-26.
106. Almangour W, Schnitzler A, Salga M, Debaud C, Denormandie P, Genet F. Recurrence of heterotopic ossification after removal in patients with traumatic brain injury: A systematic review. *Annals of physical and rehabilitation medicine*. 2016;59(4):263-9.
107. Chalidis B, Stengel D, Giannoudis PV. Early excision and late excision of heterotopic ossification after traumatic brain injury are equivalent: a systematic review of the literature. *Journal of neurotrauma*. 2007;24(11):1675-86.
108. Agarwal S, Loder S, Cholok D, Li J, Breuler C, Drake J, et al. Surgical Excision of Heterotopic Ossification Leads to Re-Emergence of Mesenchymal Stem Cell Populations Responsible for Recurrence. *Stem cells translational medicine*. 2017;6(3):799-806.
109. Macheras GA, Lepetsos P, Leonidou A, Anastasopoulos PP, Galanakis SP, Tsiridis E. Results from the surgical resection of severe heterotopic ossification of the hip: a case series of 26 patients. *European journal of orthopaedic surgery & traumatology : orthopedie traumatologie*. 2017;27(8):1097-102.
110. Denormandie P, de l'Escalopier N, Gatin L, Grelier A, Genet F. Resection of neurogenic heterotopic ossification (NHO) of the hip. *Orthopaedics & traumatology, surgery & research : OTSR*. 2017.
111. Ono K, Wada S. [Regulation of calcification by bisphosphonates]. *Clinical calcium*. 2004;14(6):60-3.
112. Yutani Y, Ohashi H, Nishimura N, Yamano Y. Clinical effect of etidronate disodium (EHDP) on heterotopic ossification following total hip arthroplasty. *Osaka city medical journal*. 1995;41(2):63-73.
113. Vasileiadis GI, Sakellariou VI, Kelekis A, Galanos A, Soucacos PN, Papagelopoulos PJ, et al. Prevention of heterotopic ossification in cases of hypertrophic osteoarthritis submitted to total hip arthroplasty. Etidronate or Indomethacin? *Journal of musculoskeletal & neuronal interactions*. 2010;10(2):159-65.
114. Ceserani R, Colombo M, Olgiate VR, Pecile A. Calcitonin and prostaglandin system. *Life sciences*. 1979;25(21):1851-5.
115. Gunal I, Eren A, Gurer F, Seber S. Calcitonin inhibits heterotopic bone formation in rats. *International journal of tissue reactions*. 1995;17(2):87-91.
116. Gunal I, Hazer B, Seber S, Gokturk E, Turgut A, Kose N. Prevention of heterotopic ossification after total hip replacement: a prospective comparison of indomethacin and salmon calcitonin in 60 patients. *Acta orthopaedica Scandinavica*. 2001;72(5):467-9.
117. Baird EO, Kang QK. Prophylaxis of heterotopic ossification - an updated review. *Journal of orthopaedic surgery and research*. 2009;4:12.
118. Buck RC. Regeneration of tendon. *The Journal of Pathology and Bacteriology*. 1953;66(1):1-18.

119. Jones RW. Ossification of the Achilles Tendon. *British Medical Journal*. 1932;2(3750):943-.
120. McClure J. The effect of diphosphonates on heterotopic ossification in regenerating Achilles tendon of the mouse. *The Journal of pathology*. 1983;139(4):419-30.
121. Michelsson JE, Granroth G, Andersson LC. Myositis ossificans following forcible manipulation of the leg. A rabbit model for the study of heterotopic bone formation. *The Journal of bone and joint surgery American volume*. 1980;62(5):811-5.
122. Michelsson JE, Pettilä M, Valtakari T, Leivo I, Aho HJ. Isolation of bone from muscles prevents the development of experimental callus-like heterotopic bone. A study of the interaction of bone and muscle in new bone formation. *Clinical orthopaedics and related research*. 1994(302):266-72.
123. Tsailas PG, Babis GC, Nikolopoulos K, Soucacos PN, Korres DS. The effectiveness of two COX-2 inhibitors in the prophylaxis against heterotopic new bone formation: an experimental study in rabbits. *The Journal of surgical research*. 2009;151(1):108-14.
124. Vanden Bossche LC, Van Maele G, Wojtowicz I, Bru I, Decorte T, De Muynck M, et al. Free radical scavengers versus methylprednisolone in the prevention of experimentally induced heterotopic ossification. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*. 2009;27(6):748-51.
125. Levander G. Tissue Induction. *Nature*. 1945;155(3927):148-9.
126. Lacroix P. Recent investigations on the growth of bone. *Nature*. 1945;156(3967):576-.
127. Reddi AH, Huggins C. Biochemical sequences in the transformation of normal fibroblasts in adolescent rats. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1972;69(6):1601-5.
128. Urist MR, Mikulski AJ. A soluble bone morphogenetic protein extracted from bone matrix with a mixed aqueous and nonaqueous solvent. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. 1979;162(1):48-53.
129. Peng H, Wright V, Usas A, Gearhart B, Shen HC, Cummins J, et al. Synergistic enhancement of bone formation and healing by stem cell-expressed VEGF and bone morphogenetic protein-4. *The Journal of clinical investigation*. 2002;110(6):751-9.
130. Wright V, Peng H, Usas A, Young B, Gearhart B, Cummins J, et al. BMP4-expressing muscle-derived stem cells differentiate into osteogenic lineage and improve bone healing in immunocompetent mice. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*. 2002;6(2):169-78.
131. Anthonissen J. A new animal model for the study of acquired heterotopic ossification after hip surgery : (a feasibility study of a refined Schneider-Toom model) = (Ein neues Tiermodell für die Untersuchung von erworbenen heterotopen Ossifikationen nach Hüft-Operationen) 2014.
132. Schneider DJ, Moulton MJ, Singapuri K, Chinchilli V, Deol GS, Krenitsky G, et al. The Frank Stinchfield Award. Inhibition of heterotopic ossification with radiation therapy in an animal model. *Clinical orthopaedics and related research*. 1998(355):35-46.
133. Toom A, Suutre S, Märtson A, Haviko T, Selstam G, Arend A. Lack of a central role for osteoprogenitor cells from the femoral canal in heterotopic ossification of the hip: an experimental study in a rat model. *The Journal of bone and joint surgery British volume*. 2010;92(2):298-303.
134. Tannous O, Stall AC, Griffith C, Donaldson CT, Castellani RJ, Jr., Pellegrini VD, Jr. Heterotopic bone formation about the hip undergoes endochondral ossification: a rabbit model. *Clinical orthopaedics and related research*. 2013;471(5):1584-92.

135. Rumi MN, Deol GS, Bergandi JA, Singapuri KP, Pellegrini VD, Jr. Optimal timing of preoperative radiation for prophylaxis against heterotopic ossification. A rabbit hip model. *The Journal of bone and joint surgery American volume*. 2005;87(2):366-73.
136. Rumi MN, Deol GS, Singapuri KP, Pellegrini VD, Jr. The origin of osteoprogenitor cells responsible for heterotopic ossification following hip surgery: an animal model in the rabbit. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*. 2005;23(1):34-40.
137. Tannous O, Griffith C, O'Toole RV, Pellegrini VD, Jr. Heterotopic ossification after extremity blast amputation in a Sprague-Dawley rat animal model. *Journal of orthopaedic trauma*. 2011;25(8):506-10.
138. de Vasconcellos JF, Zicari S, Fernicola SD, Griffin DW, Ji Y, Shin EH, et al. In vivo model of human post-traumatic heterotopic ossification demonstrates early fibroproliferative signature. *Journal of translational medicine*. 2019;17(1):248.
139. Liu X, Kang H, Shahnazari M, Kim H, Wang L, Larm O, et al. A novel mouse model of trauma induced heterotopic ossification. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*. 2014;32(2):183-8.
140. Selle RW, Urist MR. Calcium deposits and new bone formation in muscle in rabbits. *The Journal of surgical research*. 1961;1:132-41.
141. Ng SY, Lee AYW. Traumatic Brain Injuries: Pathophysiology and Potential Therapeutic Targets. *Frontiers in cellular neuroscience*. 2019;13:528.
142. Bruns J, Jr., Hauser WA. The epidemiology of traumatic brain injury: a review. *Epilepsia*. 2003;44(s10):2-10.
143. Maas AIR, Menon DK, Adelson PD, Andelic N, Bell MJ, Belli A, et al. Traumatic brain injury: integrated approaches to improve prevention, clinical care, and research. *The Lancet Neurology*. 2017;16(12):987-1048.
144. Andriessen TM, Jacobs B, Vos PE. Clinical characteristics and pathophysiological mechanisms of focal and diffuse traumatic brain injury. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2010;14(10):2381-92.
145. Schmidt OI, Infanger M, Heyde CE, Ertel W, Stahel PF. The Role of Neuroinflammation in Traumatic Brain Injury. *European Journal of Trauma*. 2004;30:135-49.
146. Ray SK, Dixon CE, Banik NL. Molecular mechanisms in the pathogenesis of traumatic brain injury. *Histology and histopathology*. 2002;17(4):1137-52.
147. Faden AI, Demediuk P, Panter SS, Vink R. The role of excitatory amino acids and NMDA receptors in traumatic brain injury. *Science (New York, NY)*. 1989;244(4906):798-800.
148. Shohami E, Kohen R. The Role of Reactive Oxygen Species in the Pathogenesis of Traumatic Brain Injury. 2010. p. 99-118.
149. Chamoun R, Suki D, Gopinath SP, Goodman JC, Robertson C. Role of extracellular glutamate measured by cerebral microdialysis in severe traumatic brain injury. *Journal of neurosurgery*. 2010;113(3):564-70.
150. Girouard H, Wang G, Gallo EF, Anrather J, Zhou P, Pickel VM, et al. NMDA receptor activation increases free radical production through nitric oxide and NOX2. *J Neurosci*. 2009;29(8):2545-52.
151. Sattler R, Xiong Z, Lu WY, Hafner M, MacDonald JF, Tymianski M. Specific coupling of NMDA receptor activation to nitric oxide neurotoxicity by PSD-95 protein. *Science (New York, NY)*. 1999;284(5421):1845-8.
152. Morganti-Kossmann MC, Rancan M, Stahel PF, Kossmann T. Inflammatory response in acute traumatic brain injury: a double-edged sword. *Current opinion in critical care*. 2002;8(2):101-5.
153. Lotocki G, de Rivero Vaccari JP, Perez ER, Sanchez-Molano J, Furones-Alonso O, Bramlett HM, et al. Alterations in blood-brain barrier permeability to large and small

- molecules and leukocyte accumulation after traumatic brain injury: effects of post-traumatic hypothermia. *Journal of neurotrauma*. 2009;26(7):1123-34.
154. Schmidt OI, Leinhase I, Hasenboehler E, Morgan SJ, Stahel PF. [The relevance of the inflammatory response in the injured brain]. *Der Orthopade*. 2007;36(3):248, 50-8.
155. Sang X, Wang Z, Qin T, Li Y. Elevated concentrations of hypoxia-inducible factor-1 α in patients with fracture and concomitant traumatic brain injury. *Annals of clinical biochemistry*. 2017;54(5):584-92.
156. Maes C. Signaling pathways effecting crosstalk between cartilage and adjacent tissues: Seminars in cell and developmental biology: The biology and pathology of cartilage. *Seminars in cell & developmental biology*. 2017;62:16-33.
157. Kan L, Kessler JA. Animal models of typical heterotopic ossification. *Journal of biomedicine & biotechnology*. 2011;2011:309287.
158. Osier N, Dixon CE. The Controlled Cortical Impact Model of Experimental Brain Trauma: Overview, Research Applications, and Protocol. *Methods in molecular biology* (Clifton, NJ). 2016;1462:177-92.
159. Park JY, Park SJ, Shim KY, Lee KJ, Kim YB, Kim YH, et al. Echinomycin and a novel analogue induce apoptosis of HT-29 cells via the activation of MAP kinases pathway. *Pharmacological research*. 2004;50(2):201-7.
160. Milesi-Hallé A, McCullough S, Hinson JA, Kurten RC, Lamps LW, Brown A, et al. Echinomycin decreases induction of vascular endothelial growth factor and hepatocyte regeneration in acetaminophen toxicity in mice. *Basic & clinical pharmacology & toxicology*. 2012;110(4):327-34.
161. Zimmermann SM, Wurgler-Hauri CC, Wanner GA, Simmen HP, Werner CM. Echinomycin in the prevention of heterotopic ossification - an experimental antibiotic agent shows promising results in a murine model. *Injury*. 2013;44(4):570-5.
162. Ho WZ, Lai JP, Zhu XH, Uvaydova M, Douglas SD. Human monocytes and macrophages express substance P and neurokinin-1 receptor. *The Journal of Immunology*. 1997;159(11):5654-60.
163. Kan L, Lounev VY, Pignolo RJ, Duan L, Liu Y, Stock SR, et al. Substance P signaling mediates BMP-dependent heterotopic ossification. *Journal of cellular biochemistry*. 2011;112(10):2759-72.
164. Goto T, Kido MA, Yamaza T, Tanaka T. Substance P and substance P receptors in bone and gingival tissues. *Medical electron microscopy : official journal of the Clinical Electron Microscopy Society of Japan*. 2001;34(2):77-85.
165. Wang L, Zhao R, Shi X, Wei T, Halloran BP, Clark DJ, et al. Substance P stimulates bone marrow stromal cell osteogenic activity, osteoclast differentiation, and resorption activity in vitro. *Bone*. 2009;45(2):309-20.
166. Donkin JJ, Turner RJ, Hassan I, Vink R. Substance P in traumatic brain injury. *Progress in brain research*. 2007;161:97-109.
167. Sharma HS, Nyberg F, Olsson Y, Dey PK. Alteration of substance P after trauma to the spinal cord: an experimental study in the rat. *Neuroscience*. 1990;38(1):205-12.
168. Brady RD, Shultz SR, McDonald SJ, O'Brien TJ. Neurological heterotopic ossification: Current understanding and future directions. *Bone*. 2018;109:35-42.
169. Ducy P, Karsenty G. The two faces of serotonin in bone biology. *The Journal of cell biology*. 2010;191(1):7-13.
170. Chang MK, Raggatt LJ, Alexander KA, Kuliwaba JS, Fazzalari NL, Schroder K, et al. Osteal tissue macrophages are intercalated throughout human and mouse bone lining tissues and regulate osteoblast function in vitro and in vivo. *Journal of immunology* (Baltimore, Md : 1950). 2008;181(2):1232-44.
171. Genêt F, Kulina I, Vaquette C, Torossian F, Millard S, Pettit AR, et al. Neurological heterotopic ossification following spinal cord injury is triggered by

- macrophage-mediated inflammation in muscle. *The Journal of pathology*. 2015;236(2):229-40.
172. Walker EC, McGregor NE, Poulton IJ, Solano M, Pompolo S, Fernandes TJ, et al. Oncostatin M promotes bone formation independently of resorption when signaling through leukemia inhibitory factor receptor in mice. *The Journal of clinical investigation*. 2010;120(2):582-92.
173. Scherbel U, Riess P, Khurana J, Born C, DeLong W. Expression of bone morphogenic proteins in rats with and without brain injury and a tibia fracture. *University of Pennsylvania Orthopaedic Journal*. 2001;14:85-9.
174. Anthonissen J, Steffen CT, Alessandri B, Baranowski A, Rommens PM, Victor J, et al. Traumatic brain injury enhances the formation of heterotopic ossification around the hip: an animal model study. *Archives of orthopaedic and trauma surgery*. 2020;140(8):1029-35.
175. Melincovici CS, Boşca AB, Şuşman S, Mărginean M, Mişu C, Istrate M, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) - key factor in normal and pathological angiogenesis. *Romanian journal of morphology and embryology = Revue roumaine de morphologie et embryologie*. 2018;59(2):455-67.
176. Takahashi H, Shibuya M. The vascular endothelial growth factor (VEGF)/VEGF receptor system and its role under physiological and pathological conditions. *Clinical science (London, England : 1979)*. 2005;109(3):227-41.
177. Riddle RC, Leslie JM, Gross TS, Clemens TL. Hypoxia-inducible factor-1 α protein negatively regulates load-induced bone formation. *J Biol Chem*. 2011;286(52):44449-56.
178. Cocks M, Mohan A, Meyers CA, Ding C, Levi B, McCarthy E, et al. Vascular patterning in human heterotopic ossification. *Human pathology*. 2017;63:165-70.
179. Lin L, Shen Q, Xue T, Yu C. Heterotopic ossification induced by Achilles tenotomy via endochondral bone formation: expression of bone and cartilage related genes. *Bone*. 2010;46(2):425-31.
180. Ueno T, Kagawa T, Kanou M, Fujii T, Fukunaga J, Mizukawa N, et al. Immunolocalization of vascular endothelial growth factor during heterotopic bone formation induced from grafted periosteum. *Annals of plastic surgery*. 2004;53(2):150-4.
181. Kakudo N, Kusumoto K, Wang YB, Iguchi Y, Ogawa Y. Immunolocalization of vascular endothelial growth factor on intramuscular ectopic osteoinduction by bone morphogenetic protein-2. *Life sciences*. 2006;79(19):1847-55.