

**Untersuchung  
der heterotopen Ossifikation  
bei akutem spinalem Trauma**

INAUGURAL-DISSERTATION  
zur Erlangung des Grades eines Dr. med. vet.  
beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

**Viviana Grajales Robles**

Aus dem Institut für Veterinär-Pathologie  
der Justus-Liebig-Universität Gießen  
Betreuer: Prof. Dr. med. vet. M. Reinacher  
und  
dem Universitätsklinikum Heidelberg  
Department Orthopädie, Unfallchirurgie und Paraplegiologie  
Betreuer: PD Dr. med. M. Egermann

# **Untersuchung der heterotopen Ossifikation bei akutem spinalem Trauma**

INAUGURAL-DISSERTATION  
zur Erlangung des Grades eines Dr. med. vet.  
beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von  
**Viviana Grajales Robles**  
Tierärztin aus Heidelberg

Gießen 2016

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. M. Kramer

Gutachter:

Prof. Dr. med. vet. M. Reinacher

PD Dr. med. M. Egermann

Tag der Disputation: 02.05.2016

Meiner Mutter

# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	<b>I</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>IV</b>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>2 Literaturübersicht</b> .....	<b>3</b>
2.1 Heterotope Ossifikation (HO) .....	3
2.1.1 Definition und Formen .....	3
2.2 Neurogene heterotope Ossifikation (NHO).....	4
2.2.1 Risikofaktoren .....	5
2.2.2 Lokalisation der HO .....	5
2.2.3 Klinik.....	8
2.2.4 Diagnostik.....	8
2.2.5 Prävention und Therapie.....	9
2.3 Ätiologie der erworbenen HO .....	10
2.4 Tiermodelle der HO.....	13
2.4.1 Angeborene HO.....	13
2.4.2 Erworbene HO.....	14
2.5 Akutes spinales Trauma .....	17
2.5.1 Epidemiologie, Ätiologie, Formen .....	17
2.5.2 Komplikationen und Therapie .....	17
2.5.3 Experimentelle Tiermodelle des Rückenmarktraumas .....	18
2.6 Biochemische Marker und Wachstumsfaktoren des Knochenstoffwechsels .....	20
2.6.1 Biochemische Knochenmarker.....	20
2.6.2 Wachstumsfaktoren .....	21
2.7 Fragestellung .....	22
<b>3 Material und Methoden</b> .....	<b>23</b>
3.1 Studiendesign .....	23
3.1.1 Vorstudien: Etablierung eines HO-Modells .....	23
3.1.2 Hauptstudie.....	25
3.2 Versuchstiere .....	27
3.2.1 Tierart und Rasse.....	27
3.2.2 Haltung und Fütterung.....	27
3.3 Implantate.....	27
3.3.1 rhBMP-2 .....	27
3.3.2 Trägermaterialien .....	28

3.3.3	Herstellung der Implantate .....	28
3.4	Operationen der Hauptstudie .....	29
3.4.1	OP-Vorbereitung und Anästhesie .....	29
3.4.2	Heterotope Implantation .....	30
3.4.3	Rückenmarkkontusion mit dem IH Spinal Cord Impactor (IH-0400) .....	32
3.4.4	Operation Kontrolltiere .....	36
3.5	Postoperativer Verlauf .....	36
3.5.1	Nachsorge der Tiere .....	36
3.5.2	Funktionelle Beurteilung des spinalen Traumas - BBB-Score .....	37
3.5.3	Perfusionsfixierung des Rückenmarks .....	38
3.5.4	Euthanasie, Blutentnahme und Explantation .....	39
3.6	Mikro-CT-Untersuchungen .....	39
3.6.1	Scan-Vorgang .....	39
3.6.2	Rekonstruktion der Daten .....	40
3.6.3	Auswertung mit CT-Analyser .....	41
3.7	Bearbeitung der Proben für die lichtmikroskopische Untersuchung .....	44
3.7.1	Anfertigen von Paraffinschnitten .....	44
3.7.2	Anfertigung von Gefrierschnitten .....	45
3.7.3	Histologische Färbungen .....	45
3.8	Histologische Untersuchung .....	46
3.8.1	Lichtmikroskopische Auswertung .....	46
3.9	Immunhistologie .....	47
3.9.1	Primärantikörper CD68 .....	47
3.9.2	Immunhistologischer Nachweis von CD68 - Methode .....	47
3.9.3	Immunhistologische Kontrollen .....	48
3.9.4	Auswertung der Immunhistologie .....	48
3.10	Biochemische Marker .....	49
3.10.1	Durchführung des ELISA zum Nachweis biochemischer Marker .....	49
3.11	Statistische Auswertung .....	50
<b>4</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>52</b>
4.1	Pilotstudie .....	52
4.2	Dosisfindungsstudien .....	52
4.2.1	Klinische Beobachtungen .....	52
4.2.2	Mikro-CT-Untersuchungen .....	53
4.2.3	Histologische Untersuchung .....	55
4.2.4	Zusammenfassung der Dosisfindungsstudien .....	58
4.3	Hauptstudie .....	59
4.3.1	Klinische Beobachtungen .....	59

4.3.2	Operationen .....	60
4.3.3	Beurteilung des spinalen Traumas - BBB-Score .....	62
4.3.4	Mikro-CT Untersuchungen .....	63
4.3.5	Histologische Untersuchung.....	71
4.3.6	Biochemische Marker.....	78
4.3.7	Statistische Korrelationen.....	82
<b>5</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>84</b>
5.1	Pilotstudie: Modellfindung.....	84
5.1.1	Modell der erworbenen HO .....	85
5.2	Dosisfindungsstudien .....	87
5.3	Modell des spinalen Traumas.....	89
5.4	Mikro-CT-Analyse des heterotopen Knochens .....	91
5.5	Histologie des heterotopen Knochens .....	95
5.6	Serologische Marker.....	96
5.6.1	Biochemische Knochenmarker.....	97
5.6.2	Wachstumsfaktoren .....	98
5.7	Tiermodell der NHO.....	100
5.8	Pathogenese der NHO im Tiermodell .....	101
5.9	Schlussfolgerung .....	102
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung / Summary.....</b>	<b>103</b>
6.1	Zusammenfassung .....	103
6.2	Summary .....	104
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>107</b>
<b>8</b>	<b>Tabellarischer Anhang .....</b>	<b>127</b>
	<b>Materialien.....</b>	<b>130</b>
	<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>135</b>
	<b>Danksagungen.....</b>	<b>138</b>
	<b>Erklärung.....</b>	<b>140</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2-1: Hüftgelenk mit heterotoper Ossifikation .....	6
Abbildung 2-2: Schema unterschiedlicher Lokalisationen der NHO an der Hüfte.....	7
Abbildung 2-3: Schema der Stadieneinteilung nach Brooker et al. ....	7
Abbildung 3-1: Schema der heterotopen Implantation in der Hauptstudie.....	26
Abbildung 3-2: Trägermaterialien.....	28
Abbildung 3-3: Heterotope Implantation in die Oberarmmuskulatur .....	31
Abbildung 3-4: Heterotope Implantation in die Oberschenkelmuskulatur .....	31
Abbildung 3-5: Frontalansicht und Funktionseinheiten des IH Spinal Cord Impactor.....	32
Abbildung 3-6: Operationsschritte der Laminektomie.....	33
Abbildung 3-7: Operationssitus kurz vor Durchführung der Rückenmarkkontusion .....	34
Abbildung 3-8: Grafik eines Impaktablaufes .....	35
Abbildung 3-9: BBB-Score .....	38
Abbildung 3-10: Beispiel eines Scout Scan .....	40
Abbildung 3-11: CT-Analyser - Festlegen der Graustufen (thresholding) .....	41
Abbildung 3-12: Beispiele für die Region of interest (ROI).....	42
Abbildung 3-13: CT-Analyser - BV und TV .....	43
Abbildung 3-14: Heterotope Knochenprobe makroskopisch.....	44
Abbildung 4-1: Mikro-CT-Darstellung Dosisfindung A1, Träger: $\beta$ -TCP .....	53
Abbildung 4-2: Histologie Dosisfindung A1, Träger: $\beta$ -TCP .....	56
Abbildung 4-3: Histologie Dosisfindung A2, Träger: Kollagen.....	57
Abbildung 4-4: Histologie Dosisfindung B .....	58
Abbildung 4-5: Zusammenfassung der Dosisfindungsstudie mit dem Träger Kollagen .....	59
Abbildung 4-6: Gewichtsentwicklung der Versuchstiere in der Hauptstudie.....	60
Abbildung 4-7: Grafiken eines Versuchsablaufes mit dem IH-Impaktor .....	61
Abbildung 4-8: Histologie Rückenmarktrauma .....	61
Abbildung 4-9: BBB-Score Gruppe ASCI an Tag 1 und Tag 28.....	62
Abbildung 4-10: Übersichtsaufnahmen Mikro-CT .....	63
Abbildung 4-11: Mikro-CT-Darstellung 2D .....	64
Abbildung 4-12: Mikro-CT-Darstellung 3D .....	64
Abbildung 4-13: Übersichtsaufnahmen Mikro-CT Gruppe ASCI.....	65
Abbildung 4-14: Mikro-CT-Analyse: Knochenvolumen (BV) Kontrolle versus ASCI.....	66



Abbildung 4-15: Mikro-CT-Analyse: Knochenvolumen (BV) Kontrolle und ASCI .....	67
Abbildung 4-16: Mikro-CT-Analyse: BS/BV pro mm ASCI und Kontrolle.....	67
Abbildung 4-17: Mikro-CT-Auswertung Strukturparameter Trabekelanzahl .....	69
Abbildung 4-18: Mikro-CT-Auswertung Strukturparameter Trabekeldurchmesser .....	70
Abbildung 4-19: Histologie: Beispiel unterschiedlich dichter Ossikel .....	71
Abbildung 4-20: Fremdkörperriesenzellen .....	72
Abbildung 4-21: Histologie: Querschnitte der HO - Gruppe ASCI.....	72
Abbildung 4-22: Histologie: Querschnitte der HO - Gruppe Kontrolle.....	73
Abbildung 4-23: Histologie: Hämatopoetisches Knochenmark und Osteoblasten .....	74
Abbildung 4-24: Immunhistologie (CD68): Knochenmark mit Osteoklasten .....	74
Abbildung 4-25: Immunhistologie: Ausschnitt Mikrokallus .....	75
Abbildung 4-26: Histologie: Beispiele für Parameter 6 (BGW-Kontakt).....	76
Abbildung 4-27: Semiquantitative Auswertung der Histologie.....	77
Abbildung 4-28: ELISA: Auswertung Marker BALP .....	79
Abbildung 4-29: ELISA: Auswertung Marker Crosslaps .....	80
Abbildung 4-30: ELISA: Auswertung Marker VEGF .....	81
Abbildung 4-31: ELISA: Auswertung Marker TGF- $\beta$ 2.....	82
Abbildung 4-32: Korrelationen zwischen BV und BBB-Score .....	83

## 1 Einleitung

Als heterotope Ossifikationen (HO) werden im klinischen Bereich Knochenformationen im Weichteilgewebe außerhalb des normalen Skeletts bezeichnet (Garland, 1991). Neurogen bedingt gehören sie zu gefürchteten Komplikationen nach Verletzungen des zentralen Nervensystems und treten im Weichteilgewebe um periphere Gelenke auf (van Kuijk et al., 2002; Akbar et al., 2007).

Über 10 % der heterotopen Ossifikationen sind symptomatisch und führen zu Bewegungseinschränkungen des betroffenen Gelenks bis hin zu kompletter Versteifung (Kan and Kessler, 2011). In Folge kommt es zu Funktionseinschränkungen der betroffenen Gelenke, zu Zunahme der Spastik und bei erhaltener Sensibilität auch zu Schmerzentstehung (Akbar et al., 2007). Dies führt durch beeinträchtigte Mobilität, Sitz- und Liegefähigkeit zu erheblicher Einschränkung der Aktivität der Patienten und verminderter Partizipation am täglichen Leben. Insbesondere verlieren die Patienten an Selbständigkeit und Fähigkeit zur Selbstversorgung. Hinzu kommt ein durch die Gelenkkontrakturen erhöhtes Risiko für Begleiterkrankungen, wie z.B. Dekubitalgeschwüre.

Eine kausale Therapie gibt es bislang nicht und die derzeit zur Verfügung stehenden Behandlungsmethoden werden kontrovers diskutiert. Medikamentöse Therapien sowie Bestrahlungstherapien sind nur in Frühstadien effektiv und beeinflussen bereits vorhandene heterotope Ossifikationen nicht. Nach Entwicklung einer erworbenen HO ist die chirurgische Resektion die einzige effektive Behandlung. Sie wird im Falle starker funktionaler Beeinträchtigung oder therapieresistenter Schmerzen durchgeführt, ist jedoch oft mit Komplikationen und einem hohen Rezidivrisiko verbunden (Gautschi et al., 2008). Um Rezidive zu vermeiden, sollte auf eine chirurgische Resektion eine lokale Bestrahlung oder eine Behandlung mit nichtsteroidalen Antiphlogistika (NSAID) folgen (Gautschi et al., 2008; Kan und Kessler, 2011). Die Wirkung der NSAID ist jedoch variabel und ihre Anwendung kann unter anderem zu gastrointestinalen Nebenwirkungen führen (Eulert et al., 1997).

Fortschritte im Verständnis der Pathomechanismen heterotoper Ossifikationen nach Verletzungen des Zentralnervensystems wurden erzielt; die exakte Pathogenese ist jedoch noch immer weitgehend ungeklärt.

Aktuelle Publikationen gehen von einem Einfluss humoraler, neuraler und lokaler Faktoren aus (Pape et al., 2004; Trentz et al., 2005).

Ein limitierender Faktor in der Ursachenfindung der HO-Entstehung ist das Fehlen relevanter Tiermodelle (Kan and Kessler, 2011). Weitere Forschungsvorhaben und vor allem geeignete experimentelle Modelle sind nötig, um die genauen Pathomechanismen zu verstehen, die zur Entstehung heterotoper Ossifikationen führen. Dies könnte nicht nur zu einer effizienteren und effektiveren Vorbeugung und Behandlung der HO führen, sondern auch zu einem besseren Verständnis grundsätzlicher Mechanismen der Knochenentwicklung. Somit könnten die Erkenntnisse zur Entwicklung neuer Therapiemöglichkeiten bei gestörter Knochenheilung beitragen (Gautschi et al., 2008).

## 2 Literaturübersicht

### 2.1 Heterotope Ossifikation (HO)

#### 2.1.1 Definition und Formen

Die erste Beschreibung des Phänomens einer Knochenbildung innerhalb der Muskulatur erfolgte schon im Jahre 1692 durch Patin in Zusammenhang mit der Erkrankung eines Kindes an Myositis ossificans progressiva, einer genetisch bedingten Erkrankung, die heute eher als Fibrodysplasia ossificans progressiva bekannt ist (Geschickter und Maseritz, 1938).

Aufgrund der unterschiedlichen ätiologischen Hypothesen wurden in der Literatur viele Bezeichnungen für Weichteilverknöcherungen verwendet, unter anderem heterotope, ektope oder pathologische Ossifikation, Myositis ossificans oder Paraosteoarthropathie.

Laut Definition des medizinischen Wörterbuchs Pschyrembel ist eine pathologische oder ektope Ossifikation eine Verknöcherung anderer Gewebearten (Knorpel, Bindegewebe, Muskulatur) und die Myositis ossificans eine umschriebene Metaplasie der Muskulatur mit Verknöcherung infolge pathologischer Kalkeinlagerung. Die Metaplasie wiederum ist definiert als reversible Umwandlung eines differenzierten Gewebes in ein anderes, differenziertes Gewebe. Die Heterotopie ist eine pathologische Form der Heterogenese, bei der Gewebe an einer Stelle lokalisiert ist, an der es normalerweise nicht vorkommt (Pschyrembel und Dornblüth, 2002).

In der aktuellen medizinischen Literatur wird der Begriff „Heterotope Ossifikation“ (HO) am häufigsten für die Knochenbildung außerhalb des Skelettes verwendet (Vanden Bossche und Vanderstraeten, 2005); daher wird diese Bezeichnung in der vorliegenden Arbeit bevorzugt.

Der heterotope Knochen ist identisch zu orthotopem Knochen und muss abgegrenzt werden von ektope Verkalkungen des Weichteilgewebes, die auf Grund eines lokalen Anstiegs des pH-Wertes durch Ausfällung von Calciumcarbonat und Calciumphosphat entstehen und meist nach physikalischem oder chemischem Trauma auftreten (Hardy und Dickson, 1963; Vanden Bossche und Vanderstraeten, 2005).

Das klinische Spektrum der HO ist weit gefächert und die Ursachen können angeboren oder erworben sein. Allen Formen der typischen HO gemeinsam ist die Entstehung einer fibroproliferativen Läsion, die Zellen enthält, welche einer klassischen endochondralen Ossifikation folgen, um Knochen zu bilden (O'Connor, 1998; Kan et al., 2009).

Angeborene Formen sind sehr selten; als Beispiel einer angeborenen Form der HO soll daher lediglich eine Erkrankung genannt werden, die in der HO-Forschung eine große Rolle spielt.

Die als Fibrodysplasia ossificans progressiva (FOP) bezeichnete (synonyme Bezeichnung: Myositis ossificans progressiva) genetisch bedingte Krankheit geht mit progressiv fortschreitenden Verknöcherungen des Bindegewebes einher, die spontan oder nach Traumata auftreten (Feldman et al., 2000). Die Entstehung der Erkrankung ist auf die Mutation eines *bone morphogenetic protein* (BMP)-Rezeptor-Gens (Aktivin Rezeptor Typ 1) zurückzuführen, die eine Dysregulation der BMP-Signale mit sich bringt (Shore et al., 2006).

Die erworbene Form, auch als traumatische HO bezeichnet, kann verschiedene Ursachen haben (Eulert et al., 1997):

Posttraumatisch, u.a.

- a) postoperativ nach chirurgischen Eingriffen an Gelenken, v.a. nach Totalendoprothesen des Hüftgelenks
- b) nach Frakturen
- c) nach Verletzungen des Weichteilgewebes, v.a. nach Muskeltraumata
- d) nach Verbrennungen

Neurogen, auch bezeichnet als neurogene heterotope Ossifikation (NHO):

- a) nach Rückenmarkverletzungen (*spinal cord injury* (SCI))
- b) nach Schädel-Hirn-Traumata (SHT)
- c) nach Störungen des zentralen Nervensystems nicht traumatischen Ursprungs: z.B. nach Enzephalomyelitis oder Myelitis, Meningitis, Tumoren des zentralen Nervensystems oder Komazuständen unterschiedlicher Genese.

Nach neuestem Kenntnisstand ist die Unterteilung in erworben und angeboren nicht mehr eindeutig, da vermutet wird, dass bei vielen Formen sowohl genetische (angeborene) als auch traumatische (erworbene) Faktoren bei der Entstehung eine Rolle spielen (Kan et al., 2009).

## **2.2 Neurogene heterotope Ossifikation (NHO)**

Beobachtet wurden heterotope Ossifikationen nach Rückenmarkverletzungen erstmals von Riedel (1883). Umfangreiche Forschungen wurden jedoch erstmalig von Dejerine und Ceillier im Jahre 1918 und 1919 durchgeführt und dokumentiert (Dejerine und Ceillier, 1918; Dejerine et al., 1919). Sie führten radiologische Untersuchungen an Patienten durch, die sich eine traumatische Querschnittlähmung durch Verletzungen im 1. Weltkrieg zugezogen hatten und untersuchten erstmals die Knochenneubildungen histologisch. Die heterotopen Knochenbildungen wurden zu dieser Zeit hauptsächlich als „Myositis ossificans“ bezeichnet.

Damanski hielt den Terminus „heterotope“ oder „ektipe Ossifikation“ für die Knochenneubildungen im extraskelettalen Gewebe für passender, da die Bezeichnung nicht automatisch ein entzündliches Geschehen impliziert (Damanski, 1961).

Synonym für die neurogene heterotope Ossifikation wurden in der Literatur unter anderem die Bezeichnungen „Paraosteoarthropathie“, „parossale Ossifikation“, „Myositis circumscripta neurotica“, „Neuroarthropathie“, „paraartikuläres Osteom“, „ankylosierende Pelvospondylitis“ und „neurogene Fibromyopathie“ verwendet (Jensen et al., 1987; Akbar et al., 2007).

Die NHO ist eine häufige und gefürchtete Komplikation nach frischen traumatischen Rückenmarkverletzungen und Schädel-Hirn-Traumata. Die Angaben zur Prävalenz der NHO bei traumatischen Rückenmarkverletzungen wurden in einem Review von Akbar et al. (2007) zusammengefasst und lagen bei 10-53 %. Bei nichttraumatischer Rückenmarkschädigung war die Prävalenz mit 6-15 % deutlich geringer und auch bei inkompletten schlaffen Lähmungen und bei Kindern entwickelte sich seltener eine NHO (Akbar et al., 2007).

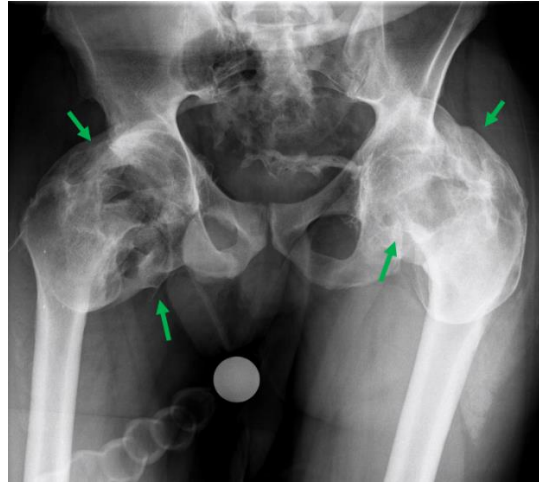
### **2.2.1 Risikofaktoren**

Über den Zusammenhang mit der Geschlechterzugehörigkeit findet man in der Literatur kontroverse Aussagen. Obwohl die NHO gehäuft bei Männern auftritt, gehen die meisten Autoren davon aus, dass es keinen Zusammenhang mit dem Geschlecht gibt (Scher, 1976; Knudsen et al., 1982; Lal et al., 1989). Verschiedene Risikofaktoren wurden in der Literatur genannt, darunter ein erhöhter Muskeltonus durch spastische Lähmungen (Goldman, 1980; Lal et al., 1989; Bravo-Payno et al., 1992), Dekubitalgeschwüre (Damanski, 1961; Lal et al., 1989; Bravo-Payno et al., 1992; Wittenberg et al., 1992) und Beinvenenthrombosen (Wittenberg et al., 1992). Des Weiteren haben einige Autoren beobachtet, dass die Vollständigkeit der Rückenmarkläsion einen größeren Einfluss auf die Ausbildung der HO hatte als die Läsionshöhe (Dejerine und Ceillier, 1918; Abramson und Kamberg, 1949; Scher, 1976; Hernandez et al., 1978; Knudsen et al., 1982; Lal et al., 1989; Bravo-Payno et al., 1992; Wittenberg et al., 1992). Forcierte Bewegung nach Ruhigstellung wurde als weiterer Risikofaktor diskutiert (Couvee, 1971; Michelsson et al., 1980; Michelsson und Rauschnig, 1983; Garland, 1991; Snoecx et al., 1995).

### **2.2.2 Lokalisation der HO**

Die NHO nach spinalem Trauma entwickelte sich hauptsächlich im Bereich unterhalb der Rückenmarkläsion (Dejerine und Ceillier, 1918; van Kuijk et al., 2002) und trat uni- oder bilateral auf (Damanski, 1961).

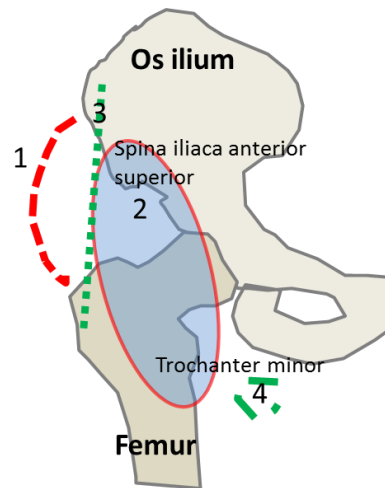
Bei den Rückenmarkverletzungen wurde die NHO nach Akbar et al. (2007) in 70-97 % der Fälle und damit am häufigsten am Hüftgelenk beschrieben (Abbildung 2-1). Es folgten die Lokalisation Ellbogen-, Schulter- und Kniegelenk, die Hand sowie die Wirbelsäule.



**Abbildung 2-1: Hüftgelenk mit heterotoper Ossifikation**

Röntgenaufnahme einer Hüfte mit hochgradiger HO an beiden Hüftgelenken (grüne Pfeile); Patient: 35-jährig, männlich; 1,5 Jahre nach schwerem Schädel-Hirn-Trauma (Universitätsklinikum Heidelberg Department Orthopädie, Unfallchirurgie und Paraplegiologie)

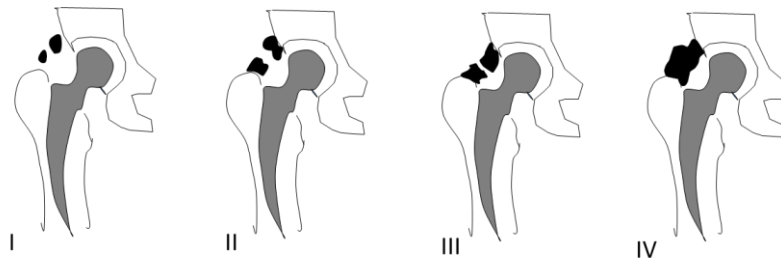
Die Verknöcherungen bildeten sich in der Muskulatur in unmittelbarer Umgebung der Gelenke, wobei jedoch das Gelenk selbst, die Gelenkkapsel und die Gefäße ausgespart blieben (Damanski, 1961). Die Knochenformationen entstanden aus dem Bindegewebe innerhalb der Muskulatur und zwischen den Muskeln. Dabei war das Muskelgewebe selbst häufig nekrotisch oder atrophisch verändert (Miller und O'Neill, 1949; Couvee, 1971; Rossier et al., 1973; Jensen et al., 1987). Die Knochenneubildung überbrückte das Gelenk je nach Grad spangenartig (Dejerine und Ceillier, 1918). Je nach Ätiologie trat die NHO an der Hüfte an unterschiedlichen Lokalisationen auf. Bei Querschnittlähmung lag der neugebildete Knochen am häufigsten anteriomedial des Hüftgelenks zwischen *Spina iliaca anterior superior* und *Trochanter minor* (Garland, 1991) (Abbildung 2-2). Im Vergleich zur Knochenausbildung bei Rückenmarkverletzten erfolgte diese bei Schädel-Hirn-Trauma-Patienten eher ungerichtet (Akbar et al., 2007).



**Abbildung 2-2: Schema unterschiedlicher Lokalisationen der NHO an der Hüfte**

rot: mögliche Lokalisationen nach spinalem Trauma, (1) Abduktor HO, (2) Anteromediale HO; grün: mögliche Lokalisationen nach Schädel-Hirn-Trauma, (3) Anterolaterale HO, (4) Inferomediale HO.

Zur radiologischen Beurteilung des Ausmaßes der HO am Hüftgelenk wurden ursprünglich für die HO nach Totalendoprothesen verschiedene Klassifikationen entwickelt. Dabei hat sich die von Brooker et al. (1973) vorgeschlagene Klassifikation der HO nach Totalendoprothese der Hüfte international durchgesetzt (Abbildung 2-1).



**Abbildung 2-3: Schema der Stadieneinteilung nach Brooker et al.**

Grad I: Knocheninseln innerhalb des periartikulären Weichteilgewebes.

Grad II: Knöchernen Ausziehungen vom Becken und/oder proximalen Ende des Femurs, Mindestabstand zueinander größer 1 cm.

Grad III: Wie Grad II, Abstand jedoch kleiner 1 cm.

Grad IV: Ankylose der Hüfte.

Selten traten HOs auch nach Weichteileingriffen bei bestehender Querschnittlähmung auf, z.B. im Bereich einer Laparotomienäht (Rubayi et al., 1992; Röhl et al., 1993). Zusätzlich wurde beobachtet, dass bei Patienten mit einem SHT bestehende Frakturen schneller heilten als bei gesunden Patienten und ein erhöhtes Kallusvolumen zeigten (Garland und Toder, 1980; Newman et al., 1987; Perkins und Skirving, 1987; Smith, 1987; Spencer, 1987; Cadosch et al., 2009). Histologisch stimmte der Kallus jedoch nicht mit typischen Kallusbildungen überein, so dass vermutet wurde, dass es sich auch um eine Form der HO handelt (Spencer, 1987).



### **2.2.3 Klinik**

Die ersten klinischen Symptome traten häufig schon 3 Wochen nach Querschnittlähmung auf (Abramson, 1948; Liberson, 1953; Silver, 1969; Garland und Orwin, 1989). Die häufigsten Anzeichen waren Bewegungseinschränkungen im betroffenen Gelenk und Entzündungsanzeichen, wie massive periartikuläre Schwellung, Rötung und Wärme, manchmal begleitet von leichtem Fieber (Dejerine und Ceillier, 1918; Hardy und Dickson, 1963; Wharton und Morgan, 1970; Couvee, 1971). Bei erhaltener Sensibilität klagten die Patienten häufig über Schmerzen (Wharton und Morgan, 1970; Rosin, 1975). Nach Akbar et al. (2007) entwickelten Patienten mit akuter Querschnittlähmung in 20-30 % eine NHO mit signifikanter Abnahme der Gelenkbeweglichkeit und in 3-8 % eine komplette Gelenkversteifung.

### **Morphologie heterotopen Knochens**

Reife NHO gleicht normalem Knochen nicht nur radiologisch, sondern auch histologisch (Kewalramani, 1977; Nollen, 1986). Der heterotope Knochen besteht aus Lamellenknochen mit Harversschen Kanälen, Kortex, Blutgefäßen und Knochenmark, jedoch mit einem geringeren Gehalt an Hämatopoese im Vergleich zu orthotopem Knochen (Miller und O'Neill, 1949; Rossier et al., 1973; Chantraine und Minaire, 1981). Frühe histologische Veränderungen zeigen sich als Ödembildungen im Bindegewebe und Fibroblastenproliferation mit nachfolgender Chondrogenese und Osteogenese (Feldman, 1986). Die gesamte Abfolge der Knochenreifung ist gewöhnlich innerhalb von 6-18 Monaten abgeschlossen (Wharton und Morgan, 1970).

### **2.2.4 Diagnostik**

In der Regel wurde die Diagnose zwischen dem 1. und dem 6. Monat gestellt, dabei am häufigsten im 2. Monat nach Eintreten der akuten Rückenmarkverletzung. Unter Umständen entwickelte sich die HO jedoch auch erst mehrere Jahre nach der Rückenmarkläsion (Hardy und Dickson, 1963; Akbar et al., 2007).

### **Bildgebende Untersuchungen**

Möglichkeiten der Diagnostik mithilfe bildgebender Verfahren bestehen durch Ultraschall, Szintigraphie und Röntgen, wobei die Ultraschalluntersuchung zur Früherkennung am besten geeignet ist. Dagegen sind Röntgenuntersuchungen das Mittel der Wahl, um den Reifezustand und das genaue Ausmaß der HO zu bestimmen (Eulert et al., 1997).

### **Laboruntersuchungen**

Es wurden verschiedene serologische Marker zur Frühdiagnostik untersucht, wie z.B. Calcium, Phosphat oder alkalische Phosphatase (ALP) (Mead et al., 1963; Furman et al., 1970; Rossier et al., 1973; Kewalramani, 1977; Orzel und Rudd, 1985; Chantraine et al., 1990; Kim et al.,

1990; Chantraine et al., 1995; Singh et al., 2003). Zudem wurde Prostaglandin E2 als frühdiagnostischer Marker im Urin untersucht (Schurch et al., 1997). Keiner der Parameter war jedoch in seinem prädiktiven Wert aussagekräftig und zuverlässig (Eulert et al., 1997; van Kuijk et al., 2002). Einige Untersucher berichteten über eine erhöhte ALP bis zur Ausreifung der HO, welche die Aktivität des Ossifikationsprozesses reflektierte (Mead et al., 1963; Furman et al., 1970; Couvee, 1971). Daher wird die ALP im Serum auch heute noch bestimmt, um Informationen über den Verlauf der HO-Entwicklung zu gewinnen.

## **2.2.5 Prävention und Therapie**

### **Medikamentöse Prophylaxe**

In einigen Studien zur HO nach Totalendoprothesen konnte gezeigt werden, dass nichtsteroidale Antirheumatika (NSAR) wie z.B. Indomethacin zu einer Verminderung der HO-Entwicklung führen konnten (Ahrengart et al., 1988; Kjaersgaard-Andersen und Schmidt, 1991; Kjaersgaard-Andersen et al., 1993). Die Wirkung wird auf den entzündungshemmenden Effekt und auf die Hemmung der Proliferation mesenchymaler Zellen zurückgeführt (Garland, 1991). NSAR führen durch reversible, kompetitive Hemmung der Cyclooxygenase (COX) zu einer Reduktion der Arachidonsäureabkömmlinge, z.B. des Prostaglandin E2, die wiederum in der Frühphase von Traumata eine entscheidende Rolle spielen sollen (Eulert et al., 1997; Schurch et al., 1997; Bartlett et al., 2006). Ähnliche Wirkungen wurden durch selektive COX-2-Hemmer gesehen (Romano et al., 2004).

Auch Diphosphonate (Etidronsäure, synonyme Bezeichnung: Ethylen Hydroxydisphosphonat) wurden zur Prophylaxe eingesetzt (Bijvoet et al., 1974; Russell und Fleisch, 1975; Stover et al., 1976; Garland et al., 1983; Spielman et al., 1983). Sie hemmen die Mineralisation des gebildeten Osteoids; Zelldifferenzierung und Osteoidbildung selbst bleiben aber unbeeinflusst. So kommt es nach Absetzen des Medikamentes zur Nachmineralisation und röntgenologisch sichtbaren Ossifikationen, d. h. die Ossifikationen treten lediglich zu einem späteren Zeitpunkt auf (Bijvoet et al., 1974; Russell und Fleisch, 1975).

### **Bestrahlung**

Coventry und Scanlon (1981) setzten erstmalig eine postoperative Bestrahlung zur Prophylaxe heterotoper Ossifikationen ein. Einige Jahre später verwendeten Lo et al. als erste eine einmalige Bestrahlung (*single-shot*) mit 1x7 Gy, die auch heute noch angewendet wird (Lo et al., 1988). Weitere Studien beschrieben den Einsatz von Bestrahlung als Prophylaxemanagement mit unterschiedlichen Protokollen (Ayers et al., 1991; DeFlitch und Stryker, 1993; Schaeffer und Sosner, 1995; Pellegrini und Gregoritch, 1996). Es wurde vermutet, dass der Wirkmechanismus der Bestrahlung auf einer DNA-Denaturierung beruht,

die zu einer Schädigung der empfindlichen multipotenten Mesenchymzellen führt, so dass sich diese nicht zu Osteoblasten differenzieren können. Die multipotenten Mesenchymzellen müssen jedoch in einem frühen Differenzierungsstadium bestrahlt werden, sonst kann eine Differenzierung nicht mehr verhindert werden (Eulert et al., 1997).

### **Chirurgische Resektion**

Die einzige therapeutische Maßnahme ist bis heute die chirurgische Resektion der Knochenneubildung (Garland und Orwin, 1989; Stover et al., 1991; Meiners et al., 1997; Abel et al., 2002). Sie ist bei ausgeprägten Bewegungseinschränkungen indiziert, sollte jedoch erst nach Abschluss der knöchernen Reifung des neugebildeten Knochens durchgeführt werden, um das Rezidivrisiko zu mindern (Garland und Orwin, 1989; Abel et al., 2002). Die Rezidivrate ist trotzdem sehr hoch, so dass prophylaktische Maßnahmen wie die postoperative Bestrahlung eingeleitet werden müssen (Stover et al., 1976; Abel et al., 2002).

## **2.3 Ätiologie der erworbenen HO**

Trotz Bemühungen vieler Forschungsgruppen, v.a. in den 60er und 70er Jahren, ist die Ätiologie der HO bislang nahezu ungeklärt. Chalmers et al. postulierten im Jahre 1975, dass 3 Kriterien für die Ausbildung einer HO erfüllt sein müssen: Anwesenheit osteogener Vorläuferzellen, den Prozess auslösende Faktoren und das entsprechende Milieu. Diese Theorie bildet auch heute noch die Grundlage der Pathogenese.

In Zusammenhang mit der Entstehung der NHO wurden in der Literatur viele Faktoren genannt, die eine Rolle spielen könnten. Dazu zählen u.a.: lokale zirkulatorische, metabolische und biochemische Veränderungen, wie Hyperkalzämie, Gewebhypoxie, Druckstellen, lange Ruhigstellung und forcierte Remobilisierung von Gliedmaßen sowie Veränderungen in der sympathischen Nervenaktivität. Daneben wurden hormonelle Dysbalancen wie z.B. ein Ungleichgewicht von Parathormon und Calcitonin sowie die Beteiligung von BMPs als Faktoren diskutiert (Stover et al., 1975; Kewalramani, 1977; Naftchi et al., 1979; Chantraine und Minaire, 1981; Lynch et al., 1981; Szabo et al., 1982; Jensen et al., 1987; Lotta et al., 2001; Shehab et al., 2002; McCarthy und Sundaram, 2005; Vanden Bossche und Vanderstraeten, 2005).

Über eine mögliche genetische Prädisposition auf Basis der humanen Leukozytenantigene (HLA) gab es kontroverse Ergebnisse (Weiss et al., 1979; Hunter et al., 1980; Minaire et al., 1980; Larson et al., 1981; Garland et al., 1984).

Auch die Bedeutung der spastischen Lähmung als prädisponierender Faktor wurde diskutiert (Wharton und Morgan, 1970; Hernandez et al., 1978; Garland et al., 1982; Spielman et al.,

1983; Lal et al., 1989; Bravo-Payno et al., 1992; Taly et al., 1999). Die Ergebnisse sind jedoch auch hier widersprüchlich. Während Hernandez et al. (1978) sowie Wharton und Morgan (1970) keine Unterschiede zwischen Patienten mit spastischen oder schlaffen Lähmungen feststellen konnten, stellte sich in den Publikationen von Bravo-Payno et al. (1992), Lal et al. (1989), Garland et al. (1982) und Taly et al. (1999) die Spastik als ein Risikofaktor dar.

Die Beteiligung von Mikrotraumata im Gewebe, vor allem wiederholt auftretend auch in Form von passiver Mobilisierung nach Ruhigstellung, wurde in einigen Publikationen vermutet (Silver, 1969; Goldman, 1980; Chantraine und Minaire, 1981; Daud et al., 1993; Snoecx et al., 1995). Auch im Tiermodell wurde gezeigt, dass eine passive forcierte Manipulation zuvor immobilisierter Beine eine HO bei Kaninchen auslösen kann (Michelsson et al., 1980; Izumi, 1983; Michelsson und Rauschnig, 1983). Dabei gab es jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen paraplegischen und nichtparaplegischen Tieren (Izumi, 1983).

In vielen Publikationen wurden humorale Faktoren in Zusammenhang mit der Entstehung der HO genannt (Smith und Triffitt, 1986; Puzas et al., 1989; Bidner et al., 1990; Ekelund et al., 1991; Mohan und Baylink, 1991; Kurer et al., 1992; Renfree et al., 1994; Wildburger et al., 1995; Klein et al., 1999; Trentz et al., 2005; Boes et al., 2006; Eid et al., 2006; Toffoli et al., 2008; Cadosch et al., 2009; Gautschi et al., 2009; Cadosch et al., 2010a, 2010b). Einige Arbeitsgruppen untersuchten den Einfluss humoraler Faktoren im Serum von Patienten mit Schädel-Hirn-Trauma auf unterschiedliche Zellen *in vitro*. Sie konnten durch die Seren einen mitogenen Effekt auf humane Osteoblasten und Fibroblasten sowie eine reduzierte Apoptose von Osteoprogenitorzellen beobachten (Bidner et al., 1990; Eid et al., 2006; Cadosch et al., 2009; Gautschi et al., 2009). Auch im Tiermodell an der Ratte konnte ein proliferativer Effekt der Seren von Ratten mit einem SHT auf Zellen, in diesem Fall auf mesenchymale Stammzellen, festgestellt werden (Boes et al., 2006). In einem weiteren Tiermodell wurde die Wirkung der Seren von Ratten mit SHT und ohne SHT auf mesenchymale Stammzellen in einem zeitlichen Verlauf untersucht (Klein et al., 1999). Die Autoren konnten beobachten, dass die mitogenen und osteogenen Effekte der Seren der Ratten mit SHT je nach Zeitpunkt der Blutentnahme stark variierten. Einen osteogenen Effekt, gekennzeichnet durch erhöhte ALP-Gehalte in den Zellkulturen, konnte nur 48 h nach SHT beobachtet werden. Daher vermuteten die Autoren, dass bei Ratten Veränderungen in knocheninduzierenden Faktoren 48 h nach einem SHT Serum-medierte osteogene Aktivitäten verursachen könnten (Klein et al., 1999). Eine weitere Studie von Renfree et al. (1994) mit Seren von Patienten mit SHT und Querschnittlähmung auf fetale Rattenosteoblasten konnte die vorher genannten mitogenen Effekte zwar bestätigen, jedoch gab es keine signifikanten Unterschiede zum Effekt der Seren

der gesunden Kontrollgruppen auf die fetalen Rattenosteoblasten. Des Weiteren konnte bei einer Analyse der Seren von Patienten mit SHT und einer Fraktur im Vergleich zu Patienten mit einer Fraktur alleine, 14 Proteine identifiziert werden, die exklusiv in der SHT-Gruppe auftraten und in vitro eine direkte Bindungsaffinität zu Osteoprogenitorzellen zeigten (Cadosch et al., 2010a). Diese Ergebnisse, gemeinsam mit vorherigen Studien zu SHT, bestärkten die Theorie, dass osteoinduktive Faktoren vom verletzten Gehirngewebe in den systemischen Blutkreislauf sezerniert werden und peripher im betroffenen Gewebe wirken (Newman et al., 1987; Trentz et al., 2005; Cadosch et al., 2010a). Auch durch in vitro Untersuchungen mit Seren von Patienten mit Rückenmarkverletzungen, mit und ohne HO, wurde eine erhöhte Osteoblastenstimulation durch die Seren der Paraplegiker mit HO festgestellt (Kurer et al., 1992).

Einige Autoren vertreten die Meinung, dass allen Formen der HO ein auslösender Entzündungsreiz vorausgeht (Sawyer et al., 1991; Kaplan et al., 2007, 2008; Kan et al., 2011). Kan et al. (2011) haben sich mit der Fragestellung beschäftigt, ob inflammatorische Neuropeptide potentielle Kandidaten sein könnten, um Entzündungen und heterotope Ossifikationen zu triggern. Daher untersuchten sie Substanz P-Gehalte in HO-Läsionen sowohl bei Patienten mit posttraumatisch und neurologisch assoziierter HO als auch bei Patienten mit Fibrodysplasia ossificans progressiva sowie in drei unabhängigen Mausmodellen der HO. Sie konnten in frühen HO-Stadien eine Hochregulierung der Expression von Substanz P feststellen und durch Hemmung der Substanz P-Produktion im Tiermodell eine HO-Ausbildung verhindern. Daher schlussfolgerten sie, dass Substanz P ein regulatorischer Faktor in der HO-Induktion sein könnte.

Auch klinische Beobachtungen von Schurch et al. (1997) geben Hinweise auf eine entzündliche Beteiligung bei der HO-Entstehung. Es wurde gezeigt, dass erhöhte Prostaglandin E2-Werte im Urin einen zuverlässigen Indikator für die Frühdiagnostik einer HO darstellen können. Auch experimentell konnte in einem Kaninchenmodell der HO ein lokaler Anstieg an Prostaglandin E2 im Gewebe festgestellt werden (Bartlett et al., 2006).

In Bezug auf die Zelltypen, die als Osteoprogenitorzellen an der HO-Bildung beteiligt sind, ging man traditionell davon aus, dass es sich hauptsächlich um mesenchymale Stammzellen handelt (Sawyer et al., 1991; Pape et al., 2004). Ashton et al. (1980) unterschieden dabei zwei Zelltypen mesenchymalen Ursprungs, die sich zu Osteoblasten differenzieren können. Als *Determined osteogenic precursor cells* bezeichneten sie Zelltypen, die nur im Knochenmark vorkommen und sich ohne weiteren induzierenden Stimulus zu Osteoblasten differenzieren können. Im Gegensatz dazu befinden sich die *Inducible osteogenic precursor cells* im

Bindegewebe vieler Gewebe und sogar in der Blutzirkulation. Sie differenzieren sich jedoch nur an spezifischen Lokalisationen und durch induzierende Stimuli zu Osteoblasten. Es wurde vermutet, dass ihr Vorhandensein in den verschiedenen Geweben die Empfänglichkeit für Ossifikationsprozesse begründen könnte (Feldman, 1986).

In letzter Zeit waren jedoch zunehmend auch andere Zelltypen als potentiell osteogene Vorläuferzellen im Gespräch, darunter Skelettmuskelzellen (Lounev et al., 2009; Wosczyzna et al., 2012), zirkulierende Osteoblastenvorläufer (Otsuru et al., 2007, 2008) und Endothelzellen (Lounev et al., 2009; Medici et al., 2010; Medici und Olsen, 2012).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass es bis heute keine einzelne Hypothese der HO-Entstehung gibt, welche die meisten klinischen und experimentellen Ergebnisse zusammenfasst. Es wird derzeit daher von einer Beteiligung multipler Organsysteme ausgegangen (Kan und Kessler, 2011).

## **2.4 Tiermodelle der HO**

In der Vergangenheit wurden viele Versuche unternommen, Modelle für die HO zu entwickeln. Die Problematik ist dadurch bedingt, dass aufgrund mangelnder Kenntnis der Pathogenese der HO wenige Tiermodelle auf der Basis eines Pathomechanismus entwickelt wurden.

Der Schwerpunkt der vorliegenden Ausführung liegt auf den Modellen der erworbenen HO. Trotzdem soll ein typisches Modell für eine angeborene HO, die Fibrodysplasia ossificans progressiva (FOP), mit erwähnt werden, da Arbeiten mit diesem Modell viele Einsichten in die Pathogenese der HO geliefert haben und das Modell auch für die erworbene HO genutzt werden kann.

### **2.4.1 Angeborene HO**

Modelle für FOP benötigen Tiere mit einer genetischen Modifikation, die zu einer verstärkten BMP-Signalwirkung führt. Neuronenspezifische Enolase (*neuron specific enolase* (Nse))-BMP-4-transgene Mäuse bilden die wesentlichen Aspekte des FOP-Phänotyps aus (Kan et al., 2004). Die Überexpression von BMP-4 wird durch Kontrolle des Nse-Promotors herbeigeführt. Der Phänotyp der transgenen Mäuse ist dem der FOP sehr ähnlich und weist histologische Merkmale typischer erworbener HO auf. Mehrere Arbeitsgruppen haben dieses Mausmodell verwendet, um verschiedene Aspekte der HO zu untersuchen, u.a. Auslöser, welche die HO triggern und Zelltypen der Zielzellen, die auf den Stimulus reagieren und in die osteogene Linie differenzieren (Kan et al., 2009; Lounev et al., 2009).

## 2.4.2 Erworbene HO

Für die erworbene HO gibt es nach Kan und Kessler (2011) gegenwärtig 6 verfügbare Tiermodelle, die eine typische HO auslösen können: 1. Modelle der heterotopen Implantation 2. Das Hüft-Arthroplastik-Modell 3. Das Michelsson-Modell 4. Das Achillestenotomie-Modell 5. Trauma-induzierte-Modelle und 6. Modelle, verursacht durch Injektion von Reizstoffen oder anderen Materialien in die Muskulatur (Tabelle 2-1). Sie sollen im Folgenden kurz vorgestellt werden.

**Tabelle 2-1: Zusammenfassung häufig verwendeter Tiermodelle für die erworbene HO (nach Kan und Kessler 2011)**

Generelle Strategie	Beispiele	Phänotyp	Referenz/Autor
Heterotope Implantation	BMP Matrigel Implantation	HO	Lounev et al., 2009
	BMP produzierendes DNA Konstrukt	HO	Volek-Smith und Urist, 1996
	Knochenmarkzellen	HO	Friedenstein et al., 1966
	Mikroporöse Kalziumphosphat-Keramiken	HO	Le Nihouannen et al., 2005
Hüft-Arthroplastik-Modell	Hüft-Arthroplastik beim Kaninchen	HO	Schneider et al., 1998
Michelsson-Modell	Immobilisation und Manipulation beim Kaninchen	HO	Michelsson et al., 1980
Achillestenotomie	Achillestenotomie bei Ratte	HO	Buck, 1953
Trauma-induziertes Modell	Stumpfes Trauma am Kaninchenoberschenkel	Keine HO	Zacchalin und Urist, 1964
	Wiederholtes stumpfes Trauma am Schafoberschenkel	HO bei wenigen Tieren	Walton und Rothwell, 1983
Injizierte Reizstoffe und andere Materialien	Injektion von 40 % Ethanol	HO	Heinen et al., 1949
	Injektion von saurem Alkohol	HO bei wenigen Tieren	Selle und Urist, 1961

### 1. Heterotope Implantationsmodelle

Bei den heterotopen Implantationsmodellen wird eine BMP-enthaltende Matrix chirurgisch an heterotopen Stellen implantiert. Es ist die zurzeit am häufigsten verwendete Modellform (O'Connor, 1998). Urist hat im Jahre 1965 als erster durch Implantation demineralisierter Knochenmatrix eine ektope Knochenbildung bei Nagern induzieren können (Urist, 1965). Im Laufe der Zeit wurden diese Proteine im Knochen, die eine ektope Knochenbildung auslösen können, isoliert und als BMPs bezeichnet. *Bone morphogenetic protein-2* (BMP-2) wurde als eines der ersten BMPs aus demineralisierter Knochenmatrix isoliert und charakterisiert (Wozney et al., 1988). Da die natürliche Gewebekonzentration der BMPs sehr gering ist, werden sie meist gentechnisch hergestellt. Rekombinantes humanes BMP-2 hat sowohl bei

heterotoper (Wozney et al., 1988; Wang et al., 1990; Fujimori et al., 1992; Kübler et al., 1999) als auch bei orthotoper Implantation osteoinduktive Fähigkeiten gezeigt (Gerhart et al., 1993). Dosierungen des BMP-2, die für eine Knocheninduktion nötig sind, hängen von vielen Faktoren ab, wie z.B. der Tierart (Feldman, 1986), dem Trägermaterial (Wang et al., 1990) und dem Alter der Tiere (Fleet et al., 1996). In der Literatur fanden sich bei Studien zur heterotopen Osteoinduktion durch intramuskuläre Implantation von BMP-2 bei der Ratte Angaben von 5-150 µg.

Als Träger für BMP-Lösungen wurden u.a. natürliche Polymere, wie Kollagenschwämme (Boyne, 1996; McKay et al., 2007) oder andere Biopolymere (Luca et al., 2010), sowie synthetische Polymere und anorganische Träger, z.B. Kalziumphosphatmaterialien wie Hydroxyapatit und beta-Trikalziumphosphat ( $\beta$ -TCP) verwendet (Wang et al., 1999; Kim et al., 2005; Luca et al., 2010; Toom et al., 2010). Weit verbreitet ist heute auch die Kombination der BMPs mit Hydrogelen, wie z.B. dem Matrigel (Seeherman et al., 2003; Luca et al., 2010). Dabei wird eine gekühlte Mischung in flüssiger Form injiziert und es bildet sich bei Körpertemperatur ein Gel, welches kontinuierlich BMP abgibt.

Es wurden viele Modifikationen und Variationen des Modells der Heterotopen Implantation unter unterschiedlichen Versuchsbedingungen und bei unterschiedlichen Tierarten angewandt. U.a. wurden ein DNA-Konstrukt, das BMPs produziert (Volek-Smith und Urist, 1996) oder Adenovirus-BMP-2-transduzierte Fibroblasten implantiert (Olabisi et al., 2010). Außerdem wurden direkt Zellen injiziert, die osteogenes Potential haben oder osteogen wirksame Faktoren produzieren, wie z.B. Knochenmarkzellen (Friedenstein et al., 1966).

## **2. Hüft-Arthroplastik-Modell**

Die HO tritt beim Menschen häufig aus bislang unbekanntem Gründen nach Hüft-Arthroplastik auf. Ein Modell, das diese Umstände nachahmt, wurde von Schneider et al. entwickelt (Schneider et al., 1998). Er operierte Kaninchen analog zur Arthroplastik beim Menschen mit oder ohne Verletzung des Muskels und Knochens und konnte so reproduzierbar eine HO auslösen. Aufgrund der komplizierten OP-Methode ist das Modell jedoch nicht weit verbreitet. Eine Modifikation des Modells für das Versuchstier Ratte stammt von Rapuano et al. und wurde 2008 publiziert. In diesem Modell erfolgte die Induktion der HO durch ein Trauma im Bereich des M. quadriceps und des Femurperiosts in Kombination mit der Implantation von mesenchymalen Stammzellen. Ein weiteres Rattenmodell für die HO nach Totalendoprothese der Hüfte wurde von Toom et al. entwickelt (Toom et al., 2006; Toom et al., 2010). Hierbei wurde die HO durch die Implantation eines  $\beta$ -TCP-Blocks mit BMP-2 in Kombination mit einem Muskeltrauma und der Eröffnung der Gelenkkapsel am Hüftgelenk induziert. Zusätzliche Eröffnung des Knochens führte zu keiner verstärkten Knochenentwicklung.



### **3. Michelsson-Modell**

Das Michelsson-Modell wird auch *Immobilization Manipulation Model* oder *Myositis Ossificans Model* genannt und wurde im Jahre 1980 entwickelt (Michelsson et al., 1980). Durch wiederholte forcierte Mobilisierung vorher immobilisierter Hinterbeine konnte eine HO im Quadriceps von Kaninchen verursacht werden. Der genaue Stimulus der Induktion wurde in diesem Modell noch nicht gefunden. Einige Autoren haben dieses Modell verwendet, um Entwicklung und Prävention von HO bei Tieren zu untersuchen (Aho et al., 1988; Moed et al., 1994; Hardy und Rooney, 1997; Tsailas et al., 2009; Vanden Bossche et al., 2009). Die HO ist in diesem Modell nicht durch Denervierung beeinflussbar. Das steht in Gegensatz zu klinischen Beobachtungen beim Menschen und die Relevanz des Modelles ist daher nicht gesichert (Kan und Kessler, 2011).

### **4. Achillestenotomie Modell**

Das Modell wurde erstmals 1953 bei Ratten (Buck, 1953) und 1983 (McClure, 1983) bei Mäusen beschrieben. Bei den Mäusen kam es fünf Wochen nach Achillestenotomie bei 60 % der Tiere zu einer Knochenneubildung, nach 10 Wochen bei 100 % der Tiere. Das Modell ist relativ einfach und gut vorhersehbar, aber auch hier sind die molekularen Mechanismen wenig verstanden.

### **5. Trauma-induzierte Modelle**

Muskeltraumata oder Traumata des zentralen Nervensystems führen beim Menschen oft zur HO, jedoch blieben zugrundeliegende kausale Faktoren bislang unbekannt. Die Bemühungen Trauma-induzierte Modelle zu etablieren, hatten nur begrenzten Erfolg. Zachalini und Urist (1964) ist es nicht gelungen, im Oberschenkel des Kaninchens eine HO durch stumpfes Trauma zu induzieren. Walton und Rothwell berichteten über begrenzten Erfolg bei der Induktion einer HO im Oberschenkel des Schafes durch stumpfes Trauma (Walton und Rothwell, 1983). Es bildeten nur 7 von 42 Schafen eine HO aus und die histologischen Befunde im Narbengewebe der Schafe zeigten außerdem intramembranöse und nicht endochondrale Ossifikationen. Aufgrund dieser Berichte, scheinen diese Modelle nicht zuverlässig genug zu sein, um sie routinemäßig anzuwenden (Kan und Kessler, 2011).

### **6. Modelle, verursacht durch Injektion von Reizstoffen**

Die Injektionen verschiedener reizender Substanzen in die Muskulatur kann in manchen Fällen zur HO führen. Heinen et al. (1949) zum Beispiel konnten eine HO bei Kaninchen durch 40 %iges Ethanol induzieren. Selle und Urist (1961) konnten durch sauren Alkohol eine HO bei einem geringen Anteil von Tieren hervorrufen.

### **2.4.2.1 Neurogene HO**

Nach Literaturrecherche gibt es bislang kein erfolgreiches Modell für die NHO. Versuche zur Untersuchung der HO nach spinalem Traum beim Kaninchen wurden von Izumi (1983) gemacht.

Ein Modell zur Untersuchung der Frakturheilung nach SHT an der Ratte wurde in einer Studie von Boes et al. (2006) angewandt. Des Weiteren wurden in unserer Arbeitsgruppe zwei Studien zur Knochenheilung nach akutem spinalem Trauma durchgeführt (Holschbach, 2014; Schäfer, 2014).

## **2.5 Akutes spinales Trauma**

### **2.5.1 Epidemiologie, Ätiologie, Formen**

Die Inzidenz der traumatischen Querschnittlähmung in Deutschland liegt bei etwa 1500-1800 neuen Fällen pro Jahr. Bei Betrachtung der Geschlechterverteilung sind Männer mit 70 % deutlich häufiger betroffen als Frauen (Anteil 30 %) (Hofmann und Röhl, 2010).

In einer Publikation des Arbeitskreises „Querschnittlähmungen“ wurden Verkehrsunfälle als Hauptursache bei der Entstehung einer Querschnittlähmung genannt (31 %; n=33974). Arbeitsunfälle machten 13 % aus, Sportunfälle 4 % und 13 % wurden durch sonstige Unfälle verursacht. Durch Erkrankungen nicht traumatischer Ursache entstanden 30 % der Querschnittlähmungen (Exner, 2004). In vorliegender Arbeit liegt der Schwerpunkt auf Querschnittlähmungen traumatischen Ursprungs.

Man unterscheidet funktionell komplette und inkomplette Läsionen des Rückenmarks mit unterschiedlichem Grad an motorischen und sensorischen Restfunktionen. In den meisten Fällen handelt es sich um inkomplette Läsionen, die eine partielle Reizweiterleitung zulassen. Diese erfolgt jedoch ungenau und führt zu Fehlsteuerungen, die sich in Form von Spastik und neurogenem Schmerz äußern (Bareyre und Schwab, 2003).

### **2.5.2 Komplikationen und Therapie**

Zu den gefürchteten Komplikationen einer akuten Querschnittlähmung gehören heterotope Ossifikationen der großen Gelenke, thromboembolische Gefäßverschlüsse und gastrointestinale, pulmonale, kardiale oder vegetative Kreislaufstörungen. Diese können zu Temperaturdysregulationen und Bradykardie führen, die im äußersten Fall zu einer Asystolie führen kann. Zusätzlich können nach der Akutphase urologische Komplikationen und Hautschäden in Form von Dekubitalgeschwüren auftreten. Es ist bis heute nicht möglich, eine traumatische Durchtrennung des Rückenmarks zu heilen. Eine frühe chirurgische

Dekompression des Rückenmarks und die Stabilisierung einer Wirbelsäulenverletzung können Sekundärschäden vermindern. Eine lebenslange medizinische Nachsorge ist jedoch in jedem Falle notwendig (Hofmann und Röhl, 2010).

### **2.5.3 Experimentelle Tiermodelle des Rückenmarktraumas**

Die Notwendigkeit, die Pathophysiologie des akuten Rückenmarktraumas besser zu verstehen und potentielle Therapien zu entwickeln, hat zur Entstehung einer Vielzahl an experimentellen Tiermodellen des Rückenmarktraumas geführt (Kwon et al., 2002).

Am häufigsten werden als Modelltiere für Rückenmarktraumata heutzutage Ratten und Mäuse verwendet, u.a. da ihre Anschaffung und Haltung günstig und einfach ist und transgene Tierstämme zur Verfügung stehen (Khan et al., 1999; Jakeman et al., 2000).

Man unterscheidet Modelle eines stumpfen Traumas (*blunt injury*) und Modelle einer scharfen Rückenmarkdurchtrennung (*sharp spinal cord injury*). Alle Modelle haben ihre Vor- und Nachteile und die Auswahl ist abhängig von der Fragestellung, die verfolgt werden soll (Kwon et al., 2002).

Modelle der Durchtrennung des Rückenmarks können wertvolle Informationen über die anatomische Beurteilung axonaler Regeneration liefern (Kobayashi et al., 1997). Man unterscheidet die komplette von der partiellen Durchtrennung des Rückenmarks. Allerdings kommen komplette Durchtrennungen des Rückenmarks selten beim Menschen vor (Bunge et al., 1993; Blight, 2000; Norenberg et al., 2004).

Modelle eines stumpfen Traumas durch Kontusion oder Kompression des Rückenmarks simulieren das typische spinale Trauma des Menschen und liefern gute Bedingungen, um sekundäre pathophysiologische Vorgänge nach spinalem Trauma zu untersuchen (Jakeman et al., 2000; Schwartz und Fehlings, 2001; Kwon et al., 2002). Es wurden in der Literatur Kompressionsmethoden mithilfe eines Aneurysma-Clips (Rivlin und Tator, 1978) oder eines extraduralen Ballons beschrieben (Vanicky et al., 2001). Sie verursachen eine Verletzung des Rückenmarks, indem sie eine konstante Kraft über eine definierte Zeit ausüben (Khan et al., 1999). Bei Kontusionsmodellen hingegen wird eine Einschlagskraft (*impact force*) genutzt, die kurzzeitig auf das Rückenmark einwirkt und so das Trauma verursacht. Diese Methode spiegelt nach Khan et al. am besten die Dynamik des Rückentraumas beim Menschen wieder (Khan et al., 1999). Die meisten heutzutage verwendeten Kontusionsmodelle gehen auf eine von Allen entwickelte Methode zurück (Allen, 1911, 1914). In diesem Modell, das als *Weight-drop Model* bezeichnet wird, entsteht die Verletzung des Rückenmarks durch Fallenlassen eines definierten Gewichtes auf einen *Impounder*, der direkt auf der Oberfläche des Rückenmarks liegt (Khan et al., 1999). Obwohl sich die Dynamik des Traumas mithilfe der Masse, des Gewichtes und der

Höhe, aus der es fallengelassen wird (*gram-centimeter*), quantifizieren lässt, zeigten posttraumatische neurologische Untersuchungen, zusammengefasst nach Khan et al. (1999), eine erhebliche Variabilität der Ergebnisse. Darüber hinaus ist die Vergleichbarkeit eingeschränkt durch die Tatsache, dass Traumakräfte mit dem gleichen *Gram-centimeter*-Produkt, aber unterschiedlichen Kombinationen von Gewicht und Höhe, unterschiedliche Schweregrade des Traumas verursachen (Dohrmann et al., 1978). Zwei in der Literatur häufig verwendete Kontusionmodelle der Ratte, der *New York University Impactor* und der *Ohio State University Impactor*, sollen kurz erläutert werden.

Der *New York University Impactor* ist das am häufigsten verwendete Kontusionsmodell für Nager. Es wurde an der New York University entwickelt und erstmals von Gruner 1992 beschrieben. Bei diesem Modell wird ein 10 g-schwerer Eisenstab aus vier wählbaren Höhen (6; 12,5; 25 und 50 mm) auf die freigelegte Oberfläche des Rückenmarks auf der Höhe von Th9-Th10 fallengelassen. Die Schwere der neurologischen Schädigung nimmt dabei mit steigender Höhe zu. Einige biomechanische Parameter, darunter die Geschwindigkeit des Stabs (*impact velocity*), die Strecke der Rückenmarkskompression und die dynamische Kraft, die auf das Rückenmark einwirkt, können genau gemessen werden (Kwon et al., 2002).

Ein etwas anderes Kontusionsmodell der Ratte, das anstatt eines Fallgewichts einen computergeregelten elektromechanischen Impaktor verwendet, ist der *Ohio State University Impactor*. Er wurde erstmals 1987 beschrieben und nach Modifikation nochmals 1992 von Stokes veröffentlicht (Bresnahan et al., 1987). Nach Laminektomie an der thorakalen Wirbelsäule erfolgt der Einschlag von einem konstanten Startpunkt aus bis das eingestellte *Displacement* (Eindringtiefe) des Rückenmarks erreicht ist. Die Messung von *Force* (Stärke/Kraft) und *Displacement* ist durch die Ermittlung zweier sensitiver Messfühler möglich.

Bei dem in vorliegender Studie verwendeten Kontusionsmodell handelt es sich um den *Infinite Horizon (IH)-0400 Impactor* (Scheff et al., 2003). Der Hauptunterschied zwischen diesem System und den vorher genannten besteht in der Anwendung der Kraft (*force*) als der Variablen, welche die unterschiedlichen Grade der Rückenmarkverletzung bestimmt. Das Gerät verursacht eine Kontusion des freigelegten Rückenmarks durch einen definierten Aufprall eines Edelstahlstifts. Der Anwender bestimmt die Stärke der Rückenmarkverletzung, indem er die Kraft, die auf das freigelegte Rückenmark einwirken soll, mithilfe der Computer-Software definiert. Ein Schrittmotor senkt eine Halterung ab, an welcher der Stahlstift und ein Kraftsensor angefügt sind. Der Kraftsensor misst die Kraft, die auf das Rückenmark angewendet wird. Nach Beginn einer Trauma-Sequenz bewegt der Motor die Halterung

schrittweise unter ständiger Kraftüberprüfung durch den Mikrokontroller abwärts. Die Schritte sind sehr klein und schnell, so dass die Bewegung kontinuierlich erscheint. Wenn die gemessene Kraft der eingestellten Kraft entspricht oder sie überschreitet, stoppt der Schrittmotor und kehrt in die Ausgangsposition zurück. Die Software zeigt sogleich die aktuelle Kraft, die auf das Rückenmark angewendet wurde, die Eindringtiefe (*displacement*) und die Geschwindigkeit des *Impounders* bei der maximalen Kraftmessung (Scheff et al., 2003).

## **2.6 Biochemische Marker und Wachstumsfaktoren des Knochenstoffwechsels**

Knochen unterliegt einem ständigen Umbau durch Knochenformations- und Knochenresorptionsprozesse, der als Remodeling bezeichnet wird. An diesen Prozessen beteiligt sind Osteoblasten, Osteozyten und Osteoklasten. Die Regulation dieser Aktivitäten unterliegt einem komplexen Zusammenspiel auf lokaler (para- und autokriner) und systemischer (endokriner) Ebene durch Wachstumsfaktoren und Hormone. Um Informationen über die Aktivität von Osteoblasten und Osteoklasten zu gewinnen, können verschiedene biochemische Marker hinzugezogen werden. Zur Beurteilung des Knochenstoffwechsels sollte dabei je ein Knochenaufbau- und ein Knochenabbaumarker untersucht werden (Seibel, 2005).

Um neben der Knochenstruktur in Histologie und Mikro-CT-Analyse die Knochenresorptions- und Knochenformationsaktivität paraplegischer und nichtparaplegischer Tiere zu untersuchen und zu vergleichen, wurden in vorliegender Arbeit zwei Knochenmarker im Plasma bestimmt, die sich in der Klinik bewährt haben.

### **2.6.1 Biochemische Knochenmarker**

Bei der knochenspezifischen alkalischen Phosphatase (*bone-specific alkaline phosphatase* (BALP)) handelt es sich um einen Knochenformationsmarker. Sie ist ein Produkt, welches spezifisch von Osteoblasten während der Knochenbildung in das Serum abgegeben wird. Daher ist sie spezifischer als die Gesamt-ALP im Serum. Das C-terminale Telopeptid des Typ 1 Kollagens (synonyme Bezeichnung: *Crosslaps*) dient als Knochenresorptionsmarker und ist ein Abbauprodukt des Typ 1 Kollagens, welches 90 % der organischen Knochenmatrix ausmacht. Es entsteht beim enzymatischen Abbau von Knochen durch Osteoklasten (Seibel, 2006a, b).

## 2.6.2 Wachstumsfaktoren

Aufgrund der Vielzahl an Wachstumsfaktoren, die an der Knochenentwicklung beteiligt sind, soll in der vorliegenden Arbeit lediglich auf die für diese Studie relevanten Wachstumsfaktoren eingegangen werden.

### 2.6.2.1 TGF- $\beta$

TGF- $\beta$  ist einer der Wachstumsfaktoren, die aus Knochengewebe isoliert werden konnten (Seyedin et al., 1986; Kübler, 1997). Es sind drei Isoformen beim Säuger bekannt (TGF- $\beta$ 1-3), die ähnliche, aber nicht überlappende Effekte haben und deren Expressionsmuster sich während der Knochenentwicklung unterscheiden (Cho et al., 2002). Alle gehören zur TGF- $\beta$ -Superfamilie, einer Gruppe multifunktionaler Polypeptid-Wachstumsfaktoren, die einen großen Umfang an Aktivitäten in Knochengewebe, Bindegewebe und immunologischem System zeigen (Burt, 1992). TGF- $\beta$ 1 ist mengenmäßig am meisten im Knochengewebe vertreten und moduliert u.a. die Osteoblastenproliferation und -funktion (Pfeilschifter et al., 1988). TGF- $\beta$ 2 spielt u.a. eine Rolle bei der enchondralen Ossifikation und der Chondrogenese. TGF- $\beta$ 3 reguliert Funktionen der Knochenformation, wie Kollagensynthese oder ALP-Aktivität (Joyce et al., 1990; ten Dijke et al., 1990).

Der synergistische Effekt von TGF- $\beta$  in Zusammenhang mit osteoinduktiven Substanzen, wie z.B. BMPs, wurde in mehrere Untersuchungen in vivo und in vitro dargelegt (Kawamura und Urist, 1988; Cunningham et al., 1992; Kibblewhite et al., 1993; Kübler, 1997). So führt zum Beispiel in der Kaskade der Osteoinduktion durch BMPs die Ausschüttung von TGF- $\beta$  aus Monozyten zur chemotaktischen Migration von undifferenzierten, mesenchymalen Zellen, sowie zur Sekretion weiterer Zytokine aus den Monozyten (Cunningham et al., 1992). Eine weitere Studie hat gezeigt, dass die Kombination von TGF- $\beta$  und demineralisierter Knochenmatrix in einem Trepanationsdefekt bei Kaninchen zu einer beschleunigten Knochenbildung führte (Kibblewhite et al., 1993). Eine Osteoinduktion durch alleinige heterotope Implantation von TGF- $\beta$  konnte jedoch bei den meisten Säugern nicht ausgelöst werden (Kübler, 1997).

Ein Zusammenhang von erhöhten TGF- $\beta$ -Werten im Serum paraplegischer Patienten und der Bildung von heterotopen Ossifikationen wurde bereits in einer klinischen Studie vermutet (Quinlan et al., 2006). Ergebnisse von Suutre und Toom zeigten, dass v.a. TGF- $\beta$ 2- und TGF- $\beta$ 3-Signale eine wichtige Rolle in frühen Stadien der HO zu spielen scheinen (Toom et al., 2007; Suutre et al., 2009, 2010). Des Weiteren konnte in mehrere Studien von Ripamonti et al. (1997, 2000, 2008, 2009) eine Knocheninduktion bei Primaten durch die alleinige intramuskuläre Implantation aller Isoformen des TGF- $\beta$  induziert werden.

### **2.6.2.2 VEGF**

*Vascular endothelial growth factor* (VEGF) ist ein potenter Wachstumsfaktor, der eine große Rolle in der Angiogenese der endochondralen Knochenentwicklung spielt (Gerber et al., 1999). In verschiedenen Phasen der Frakturheilung, beginnend mit dem Frakturhämatom bis zur Phase des Remodeling, ist die Konzentration an VEGF sowohl lokal als auch systemisch erhöht (Beamer et al., 2010). Publikationen haben ferner gezeigt, dass der Faktor synergistisch die Wirkung von BMP-2 beeinflusst (Bouletreau et al., 2002; Peng et al., 2005).

## **2.7 Fragestellung**

Ziel dieser Studie war die Etablierung eines Tiermodells, an dem kausale Faktoren für das Auftreten von heterotopen Ossifikationen nach akutem spinalem Trauma identifiziert werden können.

Vorarbeiten der Arbeitsgruppe (Holschbach, 2014) haben die Knochenheilung nach akutem spinalem Trauma im Rattenmodell untersucht und eine verstärkte Kallusbildung bei den Tieren mit spinalem Trauma im Vergleich zu Kontrolltieren sowohl ober- als auch unterhalb der spinalen Läsion feststellen können.

In dieser Arbeit sollte besonders die Fragestellung bearbeitet werden, welchen Einfluss das spinale Trauma auf die Ausbildung der HO in der Muskulatur hat und ob es Unterschiede in der HO-Ausprägung kranial und kaudal des Traumaniveaus gibt.

### 3 Material und Methoden

Die Bezugsquellen für Chemikalien, verwendete Materialien des Tierhaltungs-, Labor- und Operationsbedarfs, Arzneimittel, Geräte und Software sind in Anhang B aufgeführt.

#### 3.1 Studiendesign

Zur Findung eines geeigneten Modells zur Induktion der heterotopen Ossifikation (HO) in der Hauptstudie wurden unterschiedliche HO-Modelle, Implantationsorte, Trägermaterialien und *bone morphogenetic protein-2* (BMP-2)-Dosierungen an insgesamt 16 Tieren in Vorstudien (Pilotstudie, Dosisfindung A und Dosisfindung B) untersucht.

In der Hauptstudie wurde eine akute Rückenmarkschädigung (*acute spinal cord injury* (ASCI)) ähnlich der Situation beim Menschen simuliert, um eine induzierte HO mithilfe von BMP-2 bei ASCI-Tieren *versus* Kontrolltieren zu vergleichen.

Zur Unterscheidung lokaler gegenüber systemischen Faktoren wurde die heterotopie Ossifikation gleichzeitig kranial und kaudal des Querschnittsniveaus intramuskulär (i.m.) bei 10 Tieren induziert. Nach vier wöchiger i. m. Implantation wurden die Tiere euthanasiert und das Knochenvolumen (BV) der HO als Hauptparameter mittels Mikro-Computertomographie (Mikro-CT) bestimmt. Zusätzlich wurde das Muskelgewebe histologisch und immunhistologisch (CD68) untersucht und es wurden mittels eines Enzymimmunoassays (*enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA)) die Plasmawerte von der knochenspezifischen alkalischen Phosphatase (*bone-specific alkaline phosphatase*, BALP), des C-terminalen Telopeptid des Typ 1 Kollagens (synonyme Bezeichnung: *Crosslaps*), sowie von *vascular endothelial growth factor* (VEGF) und *transforming growth factor beta 2* (TGF-β2) bestimmt.

##### 3.1.1 Vorstudien: Etablierung eines HO-Modells

###### 3.1.1.1 Pilotstudie

Um eine HO-Ausbildung zu verursachen, die der Situation beim Menschen sehr nahe kommt, wurde zunächst versucht, eine spontane HO nach spinalem Trauma (ohne Induktion durch Wachstumsfaktoren) zu induzieren. Hierfür wurden bei zwei experimentellen Gruppen (Pilotstudie ASCI (PA) und Pilotstudie Kontrolle (PK)) mit je vier Tieren pro Tier vier Kollagenschwämme ohne Wachstumsfaktor an vier Stellen in die Rückenmuskulatur operativ implantiert, je zwei im Bereich der Vordergliedmaße (VGM) und zwei im Bereich der Hintergliedmaße (HGM). Bei der Gruppe PA wurde nach durchgeführter Laminektomie eine



Rückenmarkkontusion auf Höhe des 9. Brustwirbels (Th9) gesetzt. Es wurde das Modell nach Vanicky et al. (2001) aus einer vorausgegangen Studie der Arbeitsgruppe übernommen (Methode siehe Holschbach, 2014). Da sich zeigte, dass dieses Modell nicht zu einem standardisierten und reproduzierbaren spinalen Trauma führte, wurde die Methode gewechselt und für alle folgenden Tiere das in 3.4.3 beschriebene Modell angewandt.

Die Gruppe PK diente als Kontrolle. Bei diesen vier Tieren wurde lediglich je ein Kollagenschwamm operativ an vier Stellen in der Rückenmuskulatur platziert; eine Laminektomie wurde nicht durchgeführt.

### 3.1.1.2 Dosisfindungsstudien

Da keine spontane HO in der Pilotstudie ausgelöst werden konnte, wurde eine Umstellung auf ein Modell der heterotopen Implantation vorgenommen. Geeignete Trägermaterialien und Dosierungen des Wachstumsfaktors BMP-2 zur Knocheninduktion mussten zunächst in Dosisfindungsstudien erprobt und das HO-Modell etabliert werden. Bei der ersten Dosisfindungsstudie, Dosisfindung A (DF A), wurden 2 unterschiedliche Träger,  $\beta$ -Trikalziumphosphat ( $\beta$ -TCP, Robert Mathys Foundation, Bettlach, Schweiz) und Jason® Kollagenvlies (Firma aap Implantate AG, Berlin) mit unterschiedlichen Mengen (0, 5, 50 und 150  $\mu$ g) des Wachstumsfaktors BMP-2 (rhBMP-2, InductOs, Wyeth Pharmaceuticals, New Lane, United Kingdom) operativ in die Muskulatur eingebracht. An der Vordergliedmaße wurde der M. trapezius und an der Hintergliedmaße der M. semitendinosus als Implantationsort gewählt. Die geplanten Dosierungen des BMP-2 orientierten sich an aktuellen Publikationen (siehe 2.4.2). Tabelle 3-1 fasst die Gruppeneinteilung der Dosisfindung A zusammen.

**Tabelle 3-1: Gruppeneinteilung Dosisfindung A**

Gruppe	Tierzahl pro Gruppe	Träger	Konstruktanzahl pro Tier (K1-K4)	Menge BMP-2
DF A1	3	$\beta$ -TCP	4	K1: 0 $\mu$ g K2: 5 $\mu$ g K3: 50 $\mu$ g K4: 150 $\mu$ g
DF A2	3	Kollagenvlies	4	

Vergleich zweier unterschiedlicher Trägermaterialien (Jason® Kollagenvlies (Firma aap Implantate AG, Berlin) und  $\beta$ -Trikalziumphosphat ( $\beta$ -TCP (Robert Mathys Foundation (RMS), Bettlach, Schweiz)) für BMP-2 (rhBMP-2, InductOs 12mg Kit, Wyeth Pharmaceuticals, New Lane, United Kingdom); Implantation intramuskulär; Gruppen: DF A1 und DF A2, jeweils n=3; Versuchstiere: Ratten, Stamm Sprague-Dawley; DF: Dosisfindung; K: Konstrukt; K1: VGM rechts, K2: HGM rechts, K3: HGM links, K4: VGM links; VGM: Vordergliedmaße; HGM: Hintergliedmaße.

Nach erfolgreicher Knocheninduktion mit beiden Trägermaterialien, überwogen die Vorteile des Kollagenvlieses und es wurde entschieden, die Studie mit diesem als Träger für BMP-2 fortzuführen. Es fand eine weitere Dosisfindungsstudie statt, Dosisfindung B (DF B), um die Menge an BMP-2 und die Lokalisation des Implantates in der Muskulatur nochmals zu optimieren. Es wurden zwei weitere Tiere operiert und die gewählten Mengen BMP-2 von 0, 50 und 100 µg mit dem Träger Kollagenvlies eingebracht (DF B1 und DF B2). Die Implantation der Konstrukte an der vorderen Extremität erfolgte nun in den M. triceps brachii, an der hinteren Extremität wurde die Lokalisation im M. semitendinosus beibehalten. Tabelle 3-2 fasst die Gruppeneinteilung der DF B zusammen.

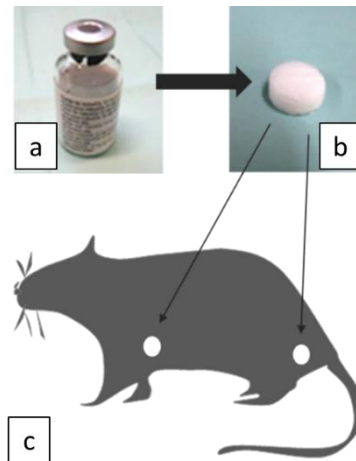
**Tabelle 3-2: Gruppeneinteilung Dosisfindung B**

Gruppe	Tierzahl pro Gruppe	Träger	Konstruktanzahl pro Tier (K1-K4)	Menge BMP-2
DF B1	1	Kollagenvlies	4	K1: 50 µg K2: 50 µg K3: 100 µg K4: 100 µg
DF B2	1	Kollagenvlies	4	K1: 0 µg K2: 0 µg K3: 100 µg K4: 100 µg

Vergleich unterschiedlicher Mengen an BMP-2 (rhBMP-2, InductOs 12mg Kit, Wyeth Pharmaceuticals, New Lane, United Kingdom) mit dem Trägermaterial Kollagen (Jason® Kollagenvlies (Firma aap Implantate AG, Berlin) an 2 unterschiedlichen Lokalisationen (M. triceps brachii an der Vordergliedmaße und M. semitendinosus an der Hintergliedmaße); Implantation intramuskulär; Gruppen: DF B1 und DF B2, jeweils n=1; Versuchstiere: Ratten, Stamm Sprague-Dawley; DF: Dosisfindung; K: Konstrukt; K1: VGM rechts, K2: HGM rechts, K3: HGM links, K4: VGM links; VGM: Vordergliedmaße; HGM: Hintergliedmaße.

### 3.1.2 Hauptstudie

Die Hauptstudie wurde an 10 Tieren durchgeführt, die an jeder Extremität ein Konstrukt mit dem Träger Kollagenvlies (Jason® Kollagenvlies, Firma aap Implantate AG, Berlin) und der BMP-2 Menge von 50 µg (rhBMP-2, InductOs 12mg Kit, Wyeth Pharmaceuticals, New Lane, United Kingdom) erhielten. An der vorderen Extremität wurde die Oberarmmuskulatur (M. triceps brachii) und an der hinteren Extremität die Oberschenkelmuskulatur (M. semitendinosus) als Implantationsort verwendet (Tabelle 3-3 und Abbildung 3-1).



**Abbildung 3-1: Schema der heterotopen Implantation in der Hauptstudie**

**a)** BMP-2 Menge von 50 µg (rhBMP-2, InductOs 12mg Kit, Wyeth Pharmaceuticals, New Lane, United Kingdom). **b)** Träger Kollagenvlies (Jason® Kollagenvlies, Firma aap Implantate AG, Berlin). **c)** Sprague-Dawley-Ratten (Charles River, Sulzfeld, Deutschland), Alter 3 Monate; Implantationsorte: Oberarmmuskulatur (*M. triceps brachii*) und Oberschenkelmuskulatur (*M. semitendinosus*).

Bei 5 Tieren (Gruppe Hauptstudie (HS) ASCI) wurde eine akute Rückenmarkschädigung (acute spinal cord injury (ASCI)) durch eine Rückenmarkkontusion mithilfe des *Infinite Horizon (IH) spinal cord device* (Precision Systems & Instrumentation, Lexington, Kentucky, USA) auf Höhe des 9. Brustwirbels (Th9) ausgelöst. Bei den Kontrolltieren (Gruppe Hauptstudie (HS) Kontrolle) wurde eine *Sham-OP* (Scheinoperation) durchgeführt in Form einer Laminektomie ohne Verletzung des Rückenmarks. Die experimentellen Gruppen sind in Tabelle 3-3 aufgeführt.

**Tabelle 3-3: Experimentelle Gruppen der Hauptstudie**

Gruppe	Tierzahl pro Gruppe	Konstruktzahl pro Tier	Menge BMP-2	Probenzahl
HS Kontrolle VGM	5	2	50 µg	10
HS Kontrolle HGM	5	2	50 µg	10
HS ASCI VGM	5	2	50 µg	10
HS ASCI HGM	5	2	50 µg	10

Implantation eines Konstruktes aus 50 µg BMP-2 (rhBMP-2, InductOs 12mg Kit, Wyeth Pharmaceuticals, New Lane, United Kingdom) mit dem Trägermaterial Kollagen (Jason® Kollagenvlies (Firma aap Implantate AG, Berlin) an 2 unterschiedlichen Lokalisationen (*M. triceps brachii* an der Vordergliedmaße und *M. semitendinosus* an der Hintergliedmaße); Versuchstiere: Ratten, Stamm Sprague-Dawley, Alter 3 Monate; HS: Hauptstudie; VGM: Vordergliedmaße; HGM: Hintergliedmaße; ASCI: acute spinal cord injury.

## 3.2 Versuchstiere

Insgesamt wurden 27 Tiere für die gesamte Studie verwendet.

Alle Tierversuche fanden in den Tierhaltungsräumen des Departments für Orthopädie, Unfallchirurgie und Paraplegiologie des Universitätsklinikums Heidelberg statt und wurden von der zuständigen Regierungsbehörde Karlsruhe unter dem Aktenzeichen 35-9185.81/G-73/09 genehmigt.

### 3.2.1 Tierart und Rasse

Für die gesamte Studie wurden weibliche Sprague-Dawley-Ratten in einem Alter von ca. 3 Monaten verwendet. Es wurde ein Auszuchtstamm gewählt, um eine Heterogenität zu gewährleisten und so der Ausgangssituation beim Menschen besonders nahe zu kommen. Bezogen wurden die Tiere über die Interdisziplinäre Biologische Forschungseinrichtung (IBF, Heidelberg) und gezüchtet von Charles River (Sulzfeld). Ihr Gewicht betrug zum Operationszeitpunkt  $267,5 \text{ g} \pm 12,4$  (Mittelwert (MW)  $\pm$  Standardabweichung (STABW)).

### 3.2.2 Haltung und Fütterung

Es wurden 3-4 Tiere gemeinsam in einem Makrolonkäfig Typ 4 (Tecniplast DE GmbH, Hohenpreißenberg) gehalten. Die mittlere Luftfeuchtigkeit betrug  $50 \pm 5 \%$  und die mittlere Raumtemperatur lag bei  $20\text{-}22 \text{ }^\circ\text{C}$ . Die Belichtung erfolgte in einem 12 Stunden-Rhythmus. Den Tieren stand ad libitum frisches Wasser und ein Alleinfuttermittel der Marke sniff (Sniff Spezialitäten GmbH, Soest) zur Verfügung, sowie Haferflocken und Grießbrei (Bebivita Grießbrei Vanille) zur Appetitanregung und erleichterten Futteraufnahme *post OP*. Zusätzlich wurden den Tieren zur Beschäftigung Zellstofftücher und autoklavierte Papprollen angeboten.

## 3.3 Implantate

### 3.3.1 rhBMP-2

Es wurde für die gesamte Studie lyophilisiertes BMP-2 aus dem Kit InductOs von dem Hersteller Wyeth/Pfizer verwendet (rhBMP-2, InductOs 12 mg Kit, Wyeth Pharmaceuticals, New Lane, United Kingdom). Das Kit enthielt 12 mg Diboterin alfa in Pulverform. Bei Diboterin alfa handelt es sich um das menschliche, rekombinante Knochen-Morphogeneseprotein-2 (*recombinant human bone morphogenetic protein 2* (rhBMP-2)), das in einer rekombinanten Ovarialzelllinie des chinesischen Hamsters (*chinese hamster ovary cells*) produziert wurde.

Nach Rekonstitution in Wasser für Injektionszwecke nach Herstellerangabe enthält das Kit InductOs 1,5 mg/ml Diboterin alfa. Da in dieser Studie eine höhere Konzentration nötig war, um das zu applizierende Volumen so gering wie möglich zu halten, wurde das Pulver so angelöst, dass sich eine Konzentration von 6 mg/ml ergab. Nach Rekonstitution wurde die Lösung in sinnvollen Mengen aliquotiert und bei -80 °C gelagert, so dass die benötigte Menge direkt vor Verwendung aufgetaut werden konnte.

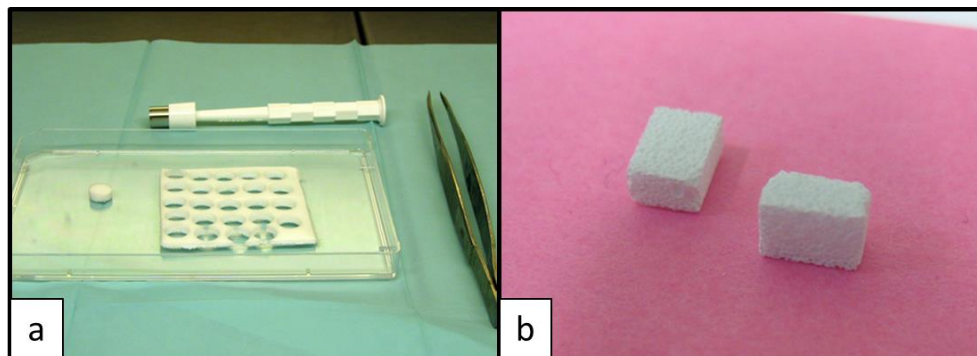
### 3.3.2 Trägermaterialien

#### 3.3.2.1 Kollagen

Für die Hauptstudie wurde das Jason® Kollagenvlies der Firma aap Implantate AG (aap Implantate AG, Berlin) verwendet (Abbildung 3-2, A). Es handelt sich um ein pH-neutrales, flüssigkeitsstabiles und resorbierbares Kollagenvlies aus Kollagen Typ 1 porcinen Ursprungs (<http://www.aap.de/de/produkte/biomaterialien/kollagen-vliese/jasonr-jasonrg>)

#### 3.3.2.2 $\beta$ -Trikalziumphosphat ( $\beta$ -TCP)

Die verwendeten  $\beta$ -TCP-Blöcke wurden von der Robert Mathys Foundation (RMS, Bettlach, Schweiz) hergestellt. Es wurden Quader der Abmessung 4x3x2 mm mit einer durchschnittlichen Porosität von etwa 60-65 % für Makroporen und 10-20 % für Mikroporen eingesetzt (Abbildung 3-2, B).



**Abbildung 3-2: Trägermaterialien**

**a)** Jason® Kollagenvlies (aap Implantate AG, Berlin); Ausstanzung mit einer Biopsiestanze auf Zylinder mit 8 mm Durchmesser.

**b)**  $\beta$ -TCP-Blöcke (Robert Mathys Foundation, Bettlach, Schweiz); Abmessungen: 4x3x2 mm.

### 3.3.3 Herstellung der Implantate

#### Übersicht der Arbeitsschritte:

- Ausstanzen des Kollagenvlieses
- Applikation des Wachstumsfaktors

- Gefriertrocknung

Alle Arbeitsschritte erfolgten unter sterilen Bedingungen

- 1) Zuerst wurden aus dem Kollagenvlies mit den Maßen 5x5 cm mit einer Biopsiestanze (Stiefel Laboratorium GmbH; Offenbach am Main) flache Zylinder mit einem Durchmesser von 8 mm und einer Höhe von ca. 3-4 mm hergestellt (Abbildung 3-2, A).
- 2) Die benötigte Menge der BMP-2-Lösung wurde direkt vor Verwendung aufgetaut. Je Kollagenträger wurden 50 µg BMP-2 appliziert; das entsprach bei der gewählten Konzentration 8,4 µl der angesetzten BMP-2-Lösung. Um auf eine Lösungsmenge von 25 µl pro Kollagenvlies zu kommen, wurden 16,6 µl Wasser für Injektionszwecke (B. Braun Melsungen AG, Melsungen) hinzugefügt. In Vorversuchen hatte sich die Menge von 25 µl als maximale Aufnahmekapazität des Schwammes herausgestellt.
- 3) Eine Menge von 182,6 µl Wasser wurde in ein 2 ml Eppendorfgefäß (Steinbrenner Laborsysteme GmbH, Wiesenbach) vorgelegt, 92,4 µl der BMP-2-Lösung hinzugefügt und beides gut vermischt. Diese angesetzte Lösung diente als Stock-Lösung für 10 Konstrukte.
- 4) Um während des Gefriertrocknungsprozesses ein Anheften der Konstrukte am Plattenboden zu verhindern, wurden Unterlagen aus sterilen Abdecktüchern (Raucodrape® Lohmann & Rauscher GmbH & Co. KG, Neuwied) in die Wells einer 6-well-Platte gelegt und je ein Kollagenzylinder darauf platziert.
- 5) 25 µl der Stock-Lösung wurden nun auf jeden Kollagenzylinder gleichmäßig aufgebracht.
- 6) Es wurde bis zum völligen Einziehen der Flüssigkeit gewartet und dann die Platte in den Gefriertrockner gestellt (Gefriertrockner AdVantage VirTis, SP Industries, Warminster, Pennsylvania, USA; Kontrollsystem: Wizard 2.0)
- 7) Das Programm dauerte ca. 22 h und bestand aus 3 Gefriertrocknungsschritten unter Vakuum:
  - Dryingstep 1: 5 h bei -40 °C
  - Dryingstep 2: 17 h bei 0 °C
  - Dryingstep 3: 10 °C
- 8) Bei Erreichen der 10 °C-Phase, wurde das Programm beendet, die Platte mit Parafilm® verschlossen und bis zum Implantieren kühl gelagert (ca. 4-8 °C).

### **3.4 Operationen der Hauptstudie**

#### **3.4.1 OP-Vorbereitung und Anästhesie**

Um Stresszustände bei den Tieren zu vermeiden, wurden sie in der Zeit vor dem operativen Eingriff an für sie unbekannt Situationen gewöhnt, die sie bei und nach der Operation erwarteten. Dazu gehörte zum Beispiel die Nahrungsaufnahme eines Breis aus der Spritze,

Fixierung zur intraperitonealen Injektion und wiederholtes Handling zur Gewöhnung an die postoperativ betreuende Person (u.a. Vorbereitung auf manuelle Blasenentleerung).

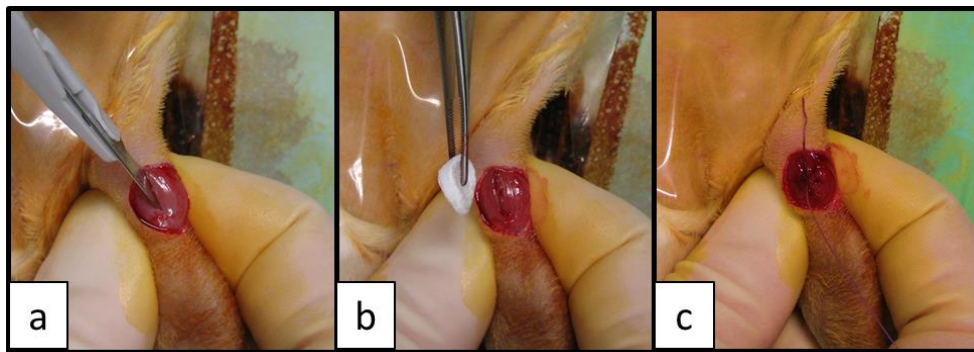
Aufgrund der Anwendung des Impaktors zur Rückenmarkkontusion, konnte keine Inhalationsnarkose durchgeführt werden. Daher wurde eine vollständig antagonisierbare Injektionsnarkose aus Medetomidin (Domitor<sup>®</sup>, Janssen-Cilag GmbH, Neuss), Midazolam (Dormicum<sup>®</sup>, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) und Fentanyl (Fentanyl-Janssen, Janssen-Cilag GmbH, Neuss) gewählt. Die Narkosemischung wurde für 1 kg Körpergewicht (KG) angesetzt aus 0,15 mg Medetomidin (entspricht 0,15 ml Domitor<sup>®</sup>) + 2 mg Midazolam (entspricht 0,4 ml Dormicum<sup>®</sup>) + 0,005 mg Fentanyl (entspricht 0,1 ml Fentanyl-Janssen) und je nach Gewicht (0,65 ml/kg KG) intraperitoneal verabreicht. Nach Injektion der Narkosemischung wurde das Tier zum ruhigen Einschlafen wieder in seinen Käfig verbracht und zu gegebenem Zeitpunkt zur OP-Vorbereitung wieder herausgenommen. Um Auskühlung zu vermeiden, erfolgte die gesamte OP-Vorbereitung auf einer Wärmematte (Labotect Labor-Technik-Göttingen GmbH, Göttingen) und unter ständiger Temperaturkontrolle mittels eines schnell messenden Thermometers (Henry Schein VET GmbH, Hamburg). Nach Applikation einer Augensalbe (5 % Dexpanthenol, Bepanthen<sup>®</sup> Augen-/Nasensalbe, Bayer AG, Leverkusen), um der Austrocknung der Hornhaut vorzubeugen, und Injektion eines Flüssigkeitsdepots (sterile physiologische Kochsalz-Lösung, B. Braun Melsungen AG, Melsungen), wurden die OP-Felder mittels elektrischer Schermaschine (Schermaschine Elektra und Exacta, Aesculap AG, Tuttlingen) großzügig enthaart, gewaschen und die erste Desinfektion (Povidon-Iod, Braunol<sup>®</sup> 7,5 %, B. Braun Melsungen AG, Melsungen) vorgenommen. Dann wurde das Tier in Bauchlage auf dem OP-Tisch platziert, nochmals die OP-Felder desinfiziert und steril abgedeckt. Um die Tiere während des gesamten OP-Zeitraums beobachten zu können, wurde eine transparente Abdeckung (Steri-Drape<sup>®</sup>, 3M Health Care, Neuss) verwendet. Auf eine Fixierung des Tieres wurde verzichtet, da eine Umlagerung des Tieres während der OP notwendig war.

Kurz vor OP-Beginn wurde  $\frac{1}{3}$  der Ausgangsdosis der Narkosemischung intramuskulär (i. m.) nachinjiziert und individuell war nach 40 min eine weitere Nachinjektion notwendig. Es erfolgte in regelmäßigen Abständen eine Kontrolle der Schmerzreflexe (mittels Zwischenzehenreflex) und der Körperinnentemperatur.

### **3.4.2 Heterotope Implantation**

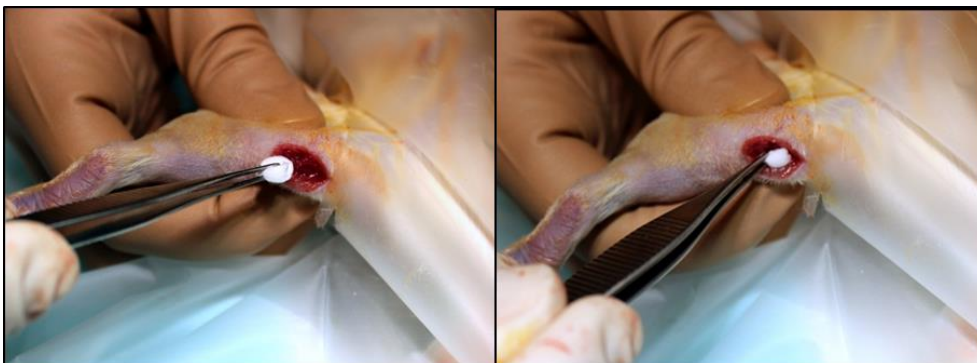
Die heterotope Implantation des Kollagenträgers in Kombination mit BMP-2 wurde an allen Tieren der ASCI-Gruppe und an den Kontrolltieren operativ durchgeführt. An der

Vordergliedmaße erfolgte die Implantation der Konstrukte in den M. triceps brachii (Abbildung 3-3) und an der Hintergliedmaße in den M. semitendinosus (Abbildung 3-4). Der jeweilige Implantationsmuskel wurde durch die OP-Assistenz fixiert und auf der kaudalen Fläche wurde die Haut etwa auf einer Länge von 1 cm mit einem Skalpell (Feather Safety Razor Co., LTD, Japan) inzidiert. Nach stumpfer Präparation der Haut vom Muskel, wurde dieser minimal inzidiert und stumpf eine Muskeltasche in Richtung der Muskelfasern präpariert. In diese wurde das Konstrukt aus Kollagenvlies mit BMP-2 (Durchmesser 8 mm, Höhe 3-4 mm) mithilfe einer Pinzette (Aesculap AG, Tuttlingen) implantiert (Abbildung 3-4; B).



**Abbildung 3-3: Heterotope Implantation in die Oberarmmuskulatur**

Nach minimaler Inzision des Muskels (a) und stumpfer Präparation einer Muskeltasche, wurde das Kollagenvlies (Durchmesser 8 mm, Höhe 3-4 mm) in diese eingebracht (b). Danach wurde der Muskel mit einem Vicryl®-Faden der Stärke 5-0 verschlossen (c).



**Abbildung 3-4: Heterotope Implantation in die Oberschenkelmuskulatur**

Hautinzision und stumpfe Präparation einer Muskeltasche. Einbringen des Kollagenvlieses (Durchmesser 8 mm, Höhe 3-4 mm). Wundverschluss des Muskels und der Haut. Pinzetten: Aesculap AG, Tuttlingen.

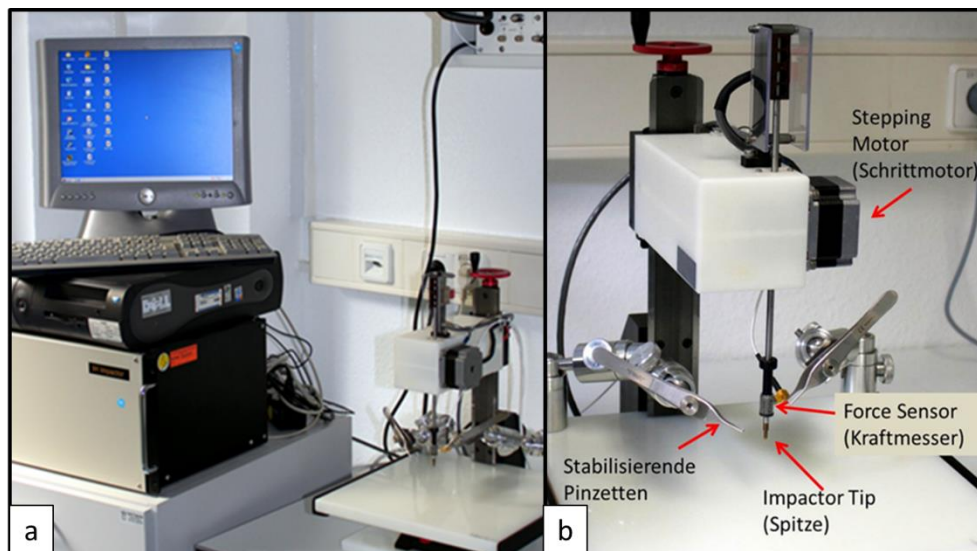
Um das Herausrutschen des Konstruktes zu vermeiden, wurde der Muskel mittels einer Kreuzheftnaht mit Vicryl® der Stärke 5-0 (Ethicon GmbH, Norderstedt) verschlossen. Der Hautverschluss erfolgte mit einem Vicryl® der Stärke 4-0 (Ethicon GmbH, Norderstedt) in



gleicher Weise. Nach Abschluss der Hautnaht, wurde diese mit einem Zinkspray zur Wundheilungsförderung (Henry Schein VET GmbH, Hamburg) benetzt.

### 3.4.3 Rückenmarkkontusion mit dem IH Spinal Cord Impactor (IH-0400)

Das spinale Trauma wurde maschinell mit dem *Infinite Horizon (IH) Spinal Cord Device* (Precision Systems& Instrumentation, Lexington, Kentucky, USA) verursacht (Abbildung 3-5). Dieses Gerät löst eine reproduzierbare, computergesteuerte Kontusion des freigelegten Rückenmarks aus, indem es mit einer hohen Geschwindigkeit einen Kraft-gesteuerten Aufprall durch einen Metallstift (*impactor tip*) verursacht (Scheff et al., 2003). Der Anwender bestimmt die Stärke der Rückenmarkverletzung, indem er die Kraft, die auf das freigelegte Rückenmark einwirken soll, mithilfe der Computer Software definiert. Bei Erreichen der eingestellten Kraft stoppt der Motor und die sofortige vertikale Rückbewegung des Impaktors in die Ausgangsposition wird veranlasst. In dieser Studie wurde eine Stärke (*force*) von 200 kdyn ( $1 \text{ dyn} = 10^{-5} \text{ Newton}$ ) ohne Verweilzeit der Spitze gewählt (*dwell time*: 0). Diese Stärke wurde in Vorstudien erprobt und zeigte in einer Publikation von Scheff et al. (2003) eine moderate Rückenmarkschädigung mit einer partiellen Wiederherstellung der motorischen Funktionen der Hinterbeine.



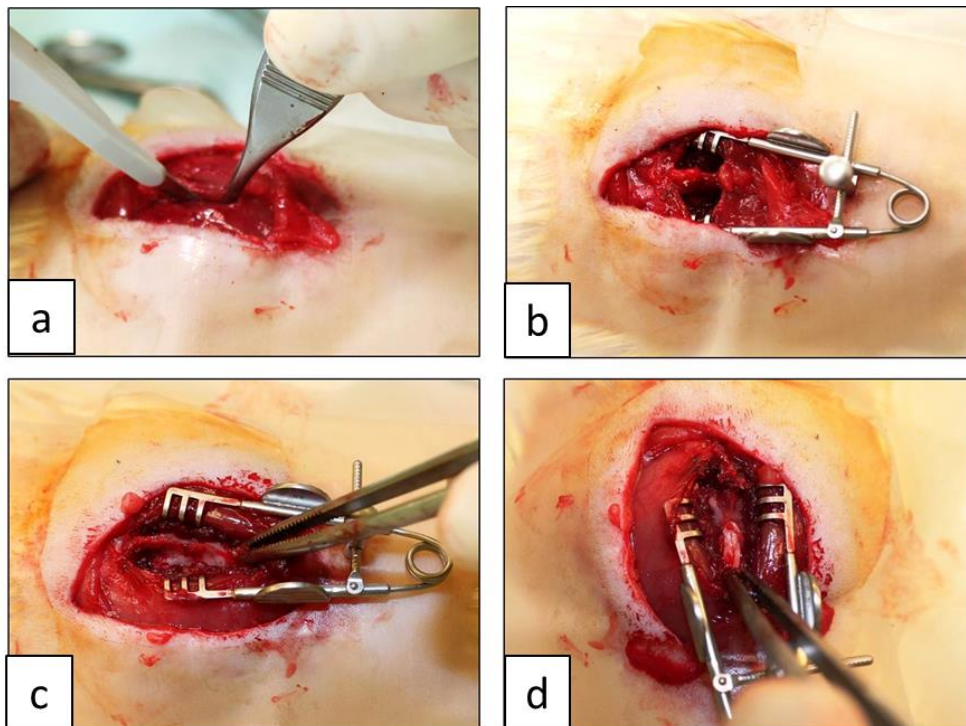
**Abbildung 3-5: Frontalansicht und Funktionseinheiten des IH Spinal Cord Impactor**

**a)** IH Spinal Cord Impactor (IH-0400) und zugehöriger Computer; **b)** Funktionseinheiten des IH Spinal Cord Impactor (IH-0400). Hersteller: Precision Systems& Instrumentation, Lexington, Kentucky, USA.

#### **Ablauf der Operation:**

Hinter den Schulterblättern wurde mit einem Skalpell (Feather Safety Razor Co., Ltd., Osaka, Japan) eine ca. 3 cm lange Hautinzision vorgenommen. Vorsichtig wurde das Fettgewebe

zwischen den Schulterblättern teilweise von der Rückenmuskulatur gelöst und beiseite geschoben. Dicht neben den Dornfortsätzen wurde auf Höhe von Th7-Th10 beidseitig ein Skalpell-Schnitt durch die Rückenmuskulatur geführt (Abbildung 3-6; a). Dann wurde ein Wundspreizer (Fine Science Tools GmbH, Heidelberg) eingebracht, um die durchtrennten Muskeln auseinanderzuhalten und Sicht auf den Operationssitus zu gewähren (Abbildung 3-6; b). Als Orientierung zur Ermittlung der Position des Th9 diente die charakteristische anatomische Beschaffenheit der Wirbel Th9 und Th10 (flache Dornfortsätze, geringer Abstand zwischen den Wirbeln). Die an den thorakalen Wirbeln Th8, Th9 und Th10 anhaftende Muskulatur wurde im Bereich der Lamina und des Dornfortsatzes entfernt, um im weiteren Verlauf das Greifen der Pinzetten zu ermöglichen (Abbildung 3-6, c).

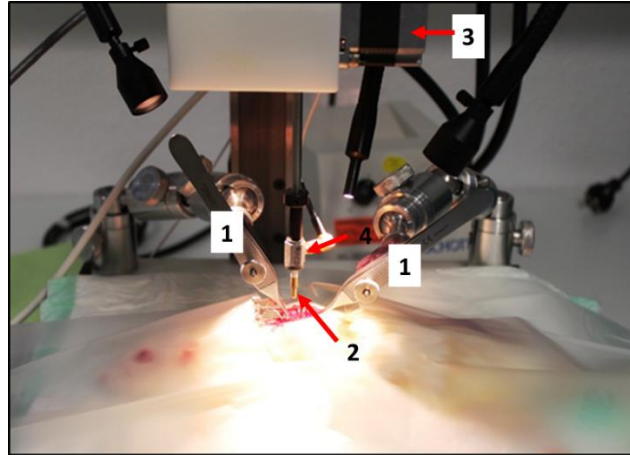


**Abbildung 3-6: Operationsschritte der Laminektomie**

**a)** Durchtrennung der Rückenmuskulatur dicht an den Dornfortsätzen auf Höhe von Th7-Th10. **b)** Einbringen eines Wundspreizers zur besseren Übersicht. **c)** Freipräparieren der Dornfortsätze und der Lamina. **d)** Eröffnung der Lamina bis zu einer Öffnung von ca. 3-3,5 mm Durchmesser.

An Th9 wurde nun der Dornfortsatz mit einer Knochenzange (Rongeur, Fine Science Tools GmbH, Heidelberg) entfernt. Von kaudal her wurde die Lamina des Wirbels vorsichtig so weit eröffnet, bis der Durchmesser größer als die Impaktorspitze war (Laminektomie mit ca. 3-3,5 mm Durchmesser) (Abbildung 3-6; d). Dies diente der Freilegung der dorsalen Fläche des Rückenmarks. Es wurde streng darauf geachtet die lateralen Arterien des Rückenmarks nicht zu verletzen.

Das Tier wurde nun unter dem senkrecht orientierten Metallkörper (*impactor*) mit einem Durchmesser von ca. 2,5 mm platziert und zur Stabilisierung der Wirbelsäule wurden die Wirbel Th8 und Th10 mittels zweier Adson-Pinzetten fixiert (Abbildung 3-7).

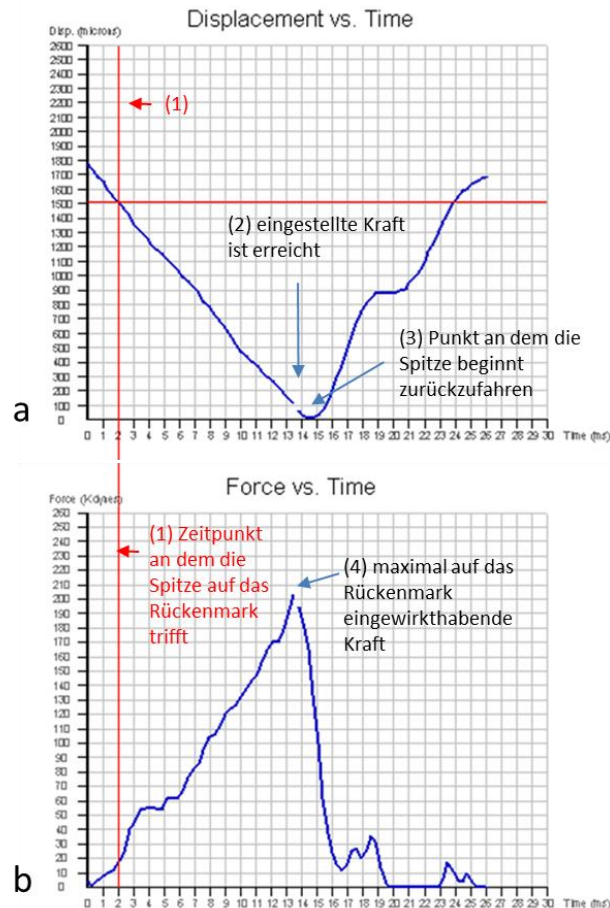


**Abbildung 3-7: Operationssitus kurz vor Durchführung der Rückenmarkkontusion**

Ein Schrittmotor (3) bewegt die Halterung mit der Impaktorspitze (2) in Richtung des freigelegten Rückenmarks. Der Kraftmesser (4) ermittelt, wann das vom Anwender definierte Kraftlevel erreicht ist und stoppt daraufhin den Vorgang. Die Wirbelsäule wird mit den stabilisierenden Pinzetten (1) in Position gehalten (Scheff et al., 2003). IH Spinal Cord Impactor (IH-0400), Hersteller: Precision Systems & Instrumentation, Lexington, Kentucky, USA.

Die geeignete Größe der Öffnung im Wirbelbogen wurde sorgfältig mikroskopisch durch manuell gesteuerte Bewegung des Impaktors in vertikaler Richtung kontrolliert. Die Impaktorspitze wurde so weit abgesenkt, dass sie sich noch zwei Umdrehungen (ca. 3-4 mm) über der Laminektomiestelle befand. Nach Einstellen der gewählten Stärke der Rückenmarkkontusion (hier *force*: 200 kdyn) und Auslösen des Befehls, erfolgte die Kontusion des Rückenmarks computergesteuert, indem der Schrittmotor den Impaktor mit hoher Geschwindigkeit nach unten bewegte, bis die eingestellte Kraftereinwirkung auf das Rückenmark erreicht wurde.

Der Verlauf der Rückenmarkverletzung wurde direkt nach dem Impact-Zyklus auf dem Bildschirm in zwei Grafiken dargestellt (Abbildung 3-8). Die aktuelle Kraft (*actual force*), die Geschwindigkeit (*velocity*) und die Eindringtiefe (*displacement*) wurde aufgezeichnet, so dass die erfolgreiche Ausführung direkt kontrolliert werden konnte. Das *Displacement* ist definiert als die Strecke, die die Impaktorspitze vom ersten Kontakt mit dem Rückenmark bis zum Erreichen der eingestellten Kraft zurücklegt und wird in  $\mu\text{m}$  gemessen (Scheff et al., 2003).



**Abbildung 3-8: Grafik eines Impaktablaufes**

**a)** *Displacement vs. Time*-Grafik mit Beschriftung der Schlüsselpunkte; **b)** *Force vs. Time*-Grafik mit Beschriftung der Schlüsselpunkte; Erläuterungen nach User's manual PSI-IH Impactor 6/2012 (<http://www.presysin.com/Downloads/user-manual/IH-Impactor-v5-User-Manual.pdf>)

Die *Displacement vs. Time*-Grafik stellt die Eindringtiefe der Impaktorspitze bis auf den tiefsten Punkt innerhalb des Gewebes gegen die Zeit (in ms) dar, welche die Impaktorspitze für das Runterfahren, die Kontusion des Rückenmarks und das Zurückfahren benötigt. Bei (2) ist die eingestellte Kraft erreicht. *Displacement* = 0 stellt immer den tiefsten Punkt im Gewebe dar und somit auch den Punkt an dem die Impaktorspitze beginnt zurückzufahren (3). Die vertikale rote Linie (1) zeigt den Zeitpunkt an, an dem die Spitze auf das Rückenmark auftrifft, während die horizontale rote Linie die Eindringtiefe der Impaktorspitze innerhalb des Gewebes angibt.

Die *Force vs. Time*-Grafik stellt die gemessene Kraft gegen die Dauer des Vorgangs dar. Die Kraft wird in kdyn und die Zeit in ms angegeben. Die Kurve besteht aus mehreren kleinen Wellen und einem höheren *Peak*. Die Wellen kommen durch Hintergrundsignale zustande, die der Sensor während der Auf- und Abbewegung der Impaktorspitze aufnimmt. Der hohe Ausschlag zeigt den Aufprall mit dem Rückenmark an, wobei der höchste Punkt die maximal eingewirkthabende Kraft anzeigt (4). Dieser Wert sollte in der Nähe des eingestellten Wertes liegen.

Da nach einem spinalen Trauma das Risiko für einen spontanen Atemstillstands besteht, wurde ein Atemstimulans bereitgehalten und den Tieren bei Bedarf i. m. eine einmalige Gabe Doxapramhydrochlorid (Doxapram-V®, Albrecht GmbH, Aulendorf; Dosierung: 10 mg/kg KG) verabreicht. Die OP-Wunde wurde mit physiologischer Kochsalzlösung (B. Braun

Melsungen AG, Melsungen) gespült und anschließend wurden die Muskelschichten und die Haut in Einzelheften mit Vicryl<sup>®</sup> der Stärke 4-0 (Ethicon GmbH, Norderstedt) verschlossen.

#### **3.4.4 Operation Kontrolltiere**

Bei den Tieren der Kontrollgruppe wurde eine Laminektomie in gleicher Weise wie in 3.4.3 beschrieben durchgeführt (*Sham-OP*). Es wurde streng darauf geachtet, das Rückenmark nicht zu verletzen. Danach wurden die einzelnen Gewebeschichten routinemäßig verschlossen (3.4.3)

### **3.5 Postoperativer Verlauf**

#### **3.5.1 Nachsorge der Tiere**

Direkt nach der Operation wurden die Tiere auf eine Wärmematte verbracht und die Temperaturkontrolle erfolgte weiter bis die Körpertemperaturen stabil waren. Frühestens 45 min nach der letzten Narkosegabe wurden die Tiere durch eine subkutane Injektion der Antidotmischung bestehend aus: 0,75 mg/kg KG Atipamezolhydrochlorid (Antisedan<sup>®</sup>, Janssen-Cilag GmbH, Neuss) + 0,2 mg/kg KG Flumazenil (Anexate<sup>®</sup>, Fresenius Kabi GmbH, Bad Homburg) + 0,12 mg/kg KG Naloxonhydrochlorid (Naloxon Inresa<sup>®</sup>, Inresa GmbH & Co. KG, Freiburg) antagonisiert. Sie erhielten zudem eine intramuskuläre Gabe von Gentamicinsulfat (Refobacin<sup>®</sup>, Merck KGaA, Darmstadt; Dosierung: 2,6 mg/kg KG) und 1,5 ml einer 5 % Glukoselösung (B. Braun Melsungen AG, Melsungen).

Nachdem die Tiere ihr Bewusstsein vollständig wiedererlangt hatten, wurde ihnen Babynahrung (Vanille Griesbrei, Bebivita GmbH, München) und Wasser angeboten.

Postoperativ wurden die Tiere mit Buprenorphin (Temgesic<sup>®</sup>, RB Pharmaceuticals Limited, Berkshire, United Kingdom; Dosierung: 0,03 mg/kg KG) analgetisch abgedeckt. Einige Tiere zeigten als Nebenwirkung das sogenannte Pica-Verhalten. Dabei handelt es sich um unkontrolliertes Fressen gesundheitsschädlicher Stoffe aus der Umgebung, wie beispielsweise Einstreu oder Papiertücher. Deshalb wurden die Tiere direkt *post OP* einzeln ohne Einstreu gehalten und standen unter genauer Beobachtung.

Neben einem Ausfall der sensiblen und motorischen Funktionen führte das spinale Trauma auch zur Beeinträchtigung der vegetativen Funktionen, weshalb es zu einer Störung der spontanen Blasenentleerung während der ersten 1-2 Wochen kam. Bei diesen Tieren wurde die Blase mehrmals täglich (anfangs 3-4mal/Tag) manuell entleert, bis eine spontane Blasenentleerung wieder eintrat. Ebenfalls wurde die Darmfunktion bei Bedarf durch tägliche Abdomenmassagen



unterstützt. Zur Erleichterung der Nahrungsaufnahme erfolgte eine Zufütterung mit Brei, eingeweichtem Hauptfutter und Haferflocken. Zu Beginn erfolgte eine Gewichtskontrolle alle zwei Tage, im Verlauf wöchentlich. Alle Tiere wurden täglich strengstens auf etwaige Schmerzzustände kontrolliert.

Bei der Pflege der paraplegischen Ratten orientierten wir uns an einer Publikation der Arbeitsgruppe um Santos-Benito, die eine erfolgreiche Haltung von paraplegischen Ratten über viele Monate umfangreich beschrieben haben (Santos-Benito et al., 2006).

### 3.5.2 Funktionelle Beurteilung des spinalen Traumas - BBB-Score

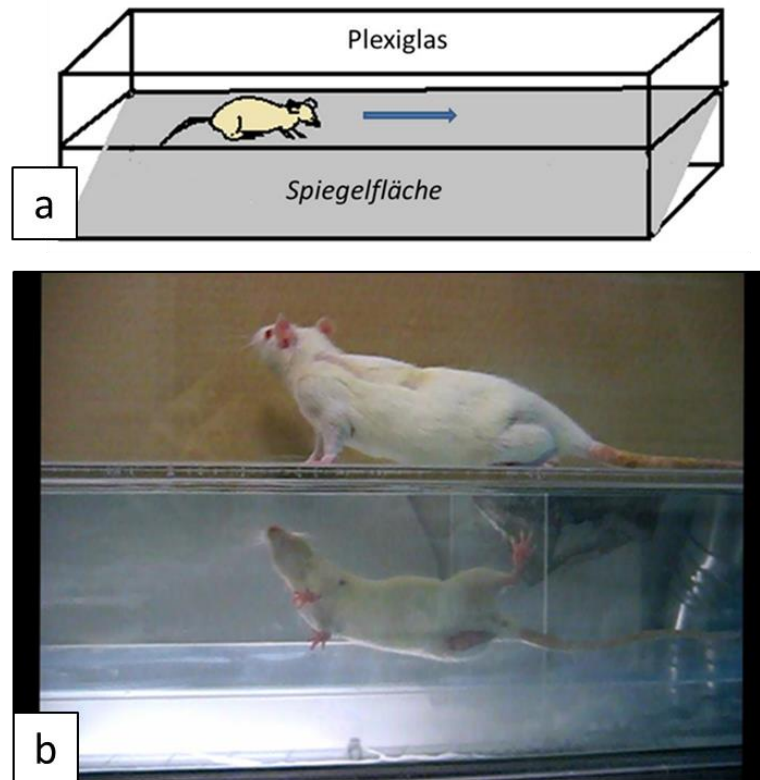
Der Basso Beattie Bresnahan-Score (BBB-Score), von Basso et al. 1995 vorgeschlagen, hat sich als Standardsystem für die Bewertung der motorischen Funktion der Hintergliedmaßen bei Ratten nach einem spinalen Trauma etabliert. Die Auswertung erfolgt durch Beobachtung des Tieres auf einer runden freien Fläche (*open field*). Während der Ganganalyse erfolgt anhand von Gelenkbewegungen, Pfotenstellung und Belastung der Hinterbeine eine Punktevergabe innerhalb einer Skala von 0 (vollständige Paraplegie) bis 21 (normales Gangbild).

Einige wichtige Punkte der Klassifizierung sind in Tabelle 3-4 erläutert (gesamter Score siehe Anhang A Tabelle A3).

**Tabelle 3-4: BBB-Score: Auszug aus Basso et al. 1995**

Score	Beschreibung des Gangbildes
0	keine sichtbaren Bewegungen der Hintergliedmaße
3	ausgiebige Bewegung von zwei Gelenken der Hintergliedmaße
7	ausgiebige Bewegung aller drei Gelenke der Hintergliedmaße
10	gelegentliche gewichtsbelastete plantare Schritte, keine Vorderhand-Hinterhand-Koordination
15	ständiger plantarer Gang und ständige Vorderhand-Hinterhand-Koordination; die überwiegende Pfotenstellung ist parallel zum Körper bei erstem Kontakt und gedreht beim Anheben
21	Normales Gangbild

Wir verwendeten eine modifizierte Form des BBB-Scores, ähnlich der von Wong et al. (2009) veröffentlichten. Anstatt auf einer freien Fläche liefen die Tiere geradeaus in einem Gang (Abbildung 3-9). Dieser wurde aus Plexiglas gefertigt und durch eine Spiegelfläche unterhalb der Lauffläche des Tieres konnte die Fußabfolge zusätzlich von unten betrachtet werden. Die Ganganalyse erfolgte an Tag 1 (Tag 0 = OP) und an Tag 28. Es wurden von jedem Tier Videoaufnahmen gemacht, um eine nachträgliche genauere Beobachtung zu ermöglichen. Falls eine eindeutige Klassifizierung nicht möglich war, wurde der niedrigere Wert erteilt. Zur Auswertung wurden beide Beine einzeln bewertet und die BBB-Werte beider Beine gemittelt.



**Abbildung 3-9: BBB-Score**

**a)** Schema des Laufstegs zur Ganganalyse: Die Ratte bewegt sich in einem Plexiglas kasten, unter dem sich eine schräge Spiegelfläche befindet. **b)** Beispielfotografie einer Ganganalyse an Tag 28

### 3.5.3 Perfusionsfixierung des Rückenmarks

Zur visuellen Darstellung des spinalen Traumas wurde exemplarisch das Rückenmark eines Tieres histologisch aufgearbeitet. Über den Blutkreislauf wurden die Organe zunächst mit physiologischer Kochsalzlösung und dann mit einer Fixierlösung mittels einer Schlauchpumpe durchspült.

#### **Durchführung der Perfusionsfixierung:**

Das Tier wurde wie in 3.4.1 beschrieben, in Narkose gelegt. Nach Bewusstseinsverlust und Kontrolle auf Schmerzreaktion wurde das Tier in Rückenlage auf ein Gitter mit einer Auffangwanne verbracht und mit Klemmen fixiert. Die folgenden Arbeitsschritte fanden unter dem Abzug statt. Der Brustkorb wurde eröffnet und das Herz freigelegt. Nach Blutentnahme aus der linken Herzkammer für weitere Diagnostik wurde eine Butterflykanüle in die linke Herzkammer eingeführt und der rechte Vorhof mit einem kleinen Schnitt geöffnet. Es erfolgte die Spülung des gesamten Kreislaufes mit 0,9 %igem NaCl für ca. 10 min. Bei Klarheit der ablaufenden Flüssigkeit wurde auf 4 %iges Paraformaldehyd (PFA) gewechselt und das Tier für mindestens 15 min perfundiert, bis der Körper eine gewisse Festigkeit erlangt hatte. Dann

wurde die Wirbelsäule freipräpariert und die Wirbelbögen von kranial nach kaudal eröffnet. Mit großer Vorsicht wurde die Wirbelsäule herausgelöst.

#### **3.5.4 Euthanasie, Blutentnahme und Explantation**

Nach 28 Tagen wurden die Tiere mittels CO<sub>2</sub>-Inhalation euthanasiert. Zur Blutentnahme wurden sie direkt *post mortem* in Rückenlage verbracht und der Brustkorb eröffnet. Nach Freilegung des Herzens wurde mithilfe einer mit Heparin benetzten Spritze aus dem rechten Ventrikel ca. 5 ml Blut entnommen. Dieses wurde in Eppendorfgläser verbracht und bei 3000 rpm für 10 min zentrifugiert (Zentrifuge Megafuge 1.0R, MS-L GmbH, Dielheim). Das Plasma wurde vorsichtig abgenommen, portioniert und bis zur weiteren Verarbeitung bei - 80 °C eingefroren. Die Explantation der Konstrukte erfolgte ebenfalls *post mortem*. Nach Eröffnung der Haut konnte durch die noch vorhandenen Nähte die Lage der Implantate ausfindig gemacht werden. Die Implantate mit umliegendem Gewebe wurden entnommen (Größe ca. 1,5x1 cm) und im Verlauf der weiteren Verarbeitung verkleinert. Die explantierten Proben wurden über 40 h in 4 %igem PFA fixiert.

### **3.6 Mikro-CT-Untersuchungen**

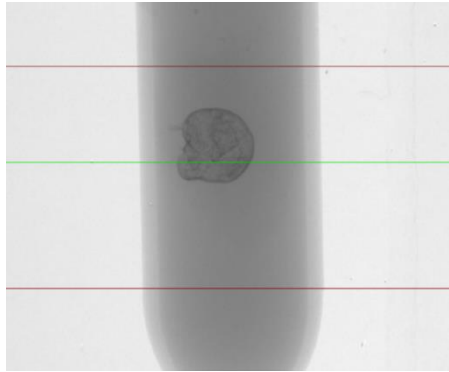
Zur Bestimmung des neugebildeten Knochenvolumens und verschiedener morphologischer und morphometrischer Parameter der Knochenstruktur diente das SkyScan-1076 in-vivo-Mikro-CT-System (Hersteller: SkyScan, Antwerpen, Belgien). Es handelte sich um einen hochauflösenden in-vivo-Mikro-CT-Scanner für die präklinische Forschung, speziell für in-vivo-Studien kleiner Labortiere (Ratte, Maus). In unserer Forschungsabteilung wurde das Gerät zusätzlich für in-vivo-Scans von Kaninchen modifiziert. Als Strahlenquelle diente eine Mikrofokus Röntgenröhre (Hamamatsu 100/250) mit einer Fokusgröße bis zu 5 µm, die im Spannungsbereich von 20-100 kV betrieben werden kann. Bei dem Detektor handelte es sich um eine gekühlte *Charge-Coupled Device* (CCD)-Kamera mit 10 Megapixeln (Princeton Instruments, New Jersey, USA).

#### **3.6.1 Scan-Vorgang**

Die Proben wurden nach Fixierung mit Leitungswasser gewaschen (dreimal für 10 min) und in je ein Eppendorfglas (Steinbrenner Laborsysteme GmbH, Wiesenbach) mit 2 ml 70 %igem Isopropanol (Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe) überführt, um eine Austrocknung zu vermeiden. Dieses Medium zeigte in Vorstudien die beste Auflösung und bot den Vorteil, dass sich nur die Knochenstruktur darstellte und somit Überlagerungen mit



umgebendem Gewebe vermieden werden konnten. Je zwei Proben wurden hintereinander in eine Styroporvorrichtung verbracht, die dazu diente, die Gefäße in Position zu halten. In einer Übersichtsaufnahme (Scout Scan), die einem normalen Röntgenbild gleicht, wurden die Grenzen für den zu scannenden Bereich zunächst festgelegt (Abbildung 3-10).



**Abbildung 3-10: Beispiel eines Scout Scan**

Probe des neugebildeten Knochens von Tier 1 Gruppe ASCI Vordergliedmaße rechts in einer Scout Scan-Aufnahme. Die Probe befindet sich in einem Eppendorfgefäß mit 2 ml 70 %igem Isopropanol. SkyScan-1076 in-vivo-Mikro-CT-System (SkyScan, Antwerpen, Belgien)

Mithilfe des *Batch-Managers* konnten jeweils zwei Proben hintereinander gescannt werden. Die Dauer für einen Scan betrug ca. 20 min. Die verwendeten Einstellungen sind in Tabelle 3-5 aufgelistet.

**Tabelle 3-5: Verwendete Einstellungen zum Scannen**

Scanner	SkyScan-1076
Software	Version 2.6 (SkyScan, Antwerpen, Belgien)
Source Voltage (kV)	65
Source Current ( $\mu\text{A}$ )	139
Filter	Ti (Titan) 0,025 mm
Rotation step (deg)	0,4
Pixel size (isotropic)	18 $\mu\text{m}$
Frame Averaging	3
Exposure (ms)	280

### 3.6.2 Rekonstruktion der Daten

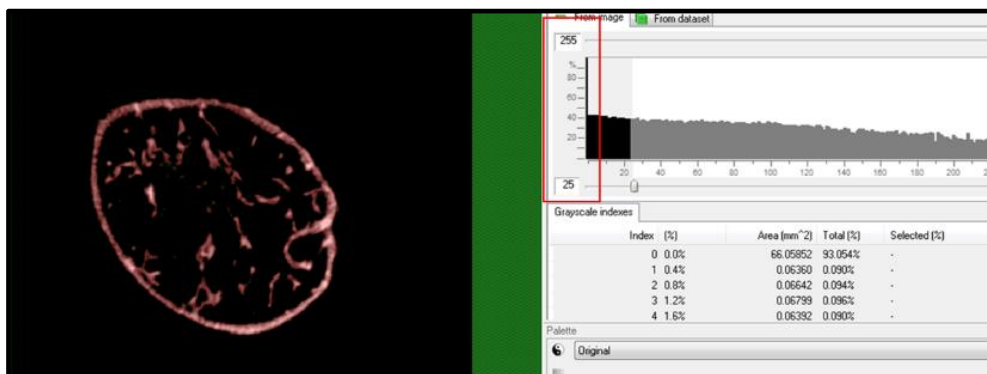
Die volumetrische Rekonstruktionssoftware *NRecon* (Version 1.6.3.2, SkyScan) wurde verwendet, um aus dem Satz der Projektionen aus verschiedenen Winkeln Querschnitte durch das Objekt zu erstellen. Die Rekonstruktion beinhaltet verschiedene Anpassungsoptimierungen, die in Tabelle 3-6 zusammengefasst sind.

**Tabelle 3-6: Verwendete Einstellungen zum Rekonstruieren**

Reconstruction Program	NRecon
Program Version	Version 1.6.3.2 (SkyScan, Antwerpen, Belgien)
Smoothing	1
Ring artifact correction	15
Threshold for defect pixel masking (%)	20
Beam hardening correction (%)	80
Minimum for CS to image conversion	0,015
Maximum for CS to image conversion	0,06
Number of layers	801

### 3.6.3 Auswertung mit CT-Analyser

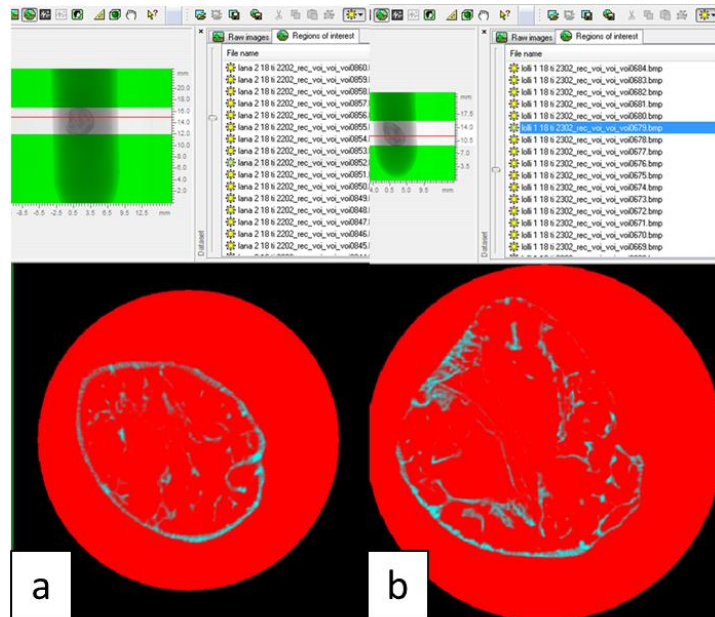
Die Bestimmung des gebildeten Knochenvolumens und verschiedener morphologischer Parameter der Knochenstruktur wurden mit dem Programm *CT-Analyser* (Version 1.10.9.0, SkyScan) durchgeführt. Es wurden für alle Proben einheitliche Schwellenwerte festgelegt, innerhalb derer die Graustufen als Knochen (BV) berechnet wurden (Abbildung 3-11). In dieser Studie wurde eine große Spanne gewählt (*thresholding*: 25-255), um möglichst auch die schwach mineralisierten Anteile der Knochenneubildungen miteinzubeziehen.



**Abbildung 3-11: CT-Analyser - Festlegen der Graustufen (thresholding)**

Bildschirmausschnitt *CT-Analyser* (SkyScan); roter Kasten: *thresholding* 25-255; rosafarbte Strukturen werden vom Programm in die Berechnung des Knochenvolumens (BV) miteinbezogen; HO von Tier 1 Gruppe ASCI Vordergliedmaße rechts.

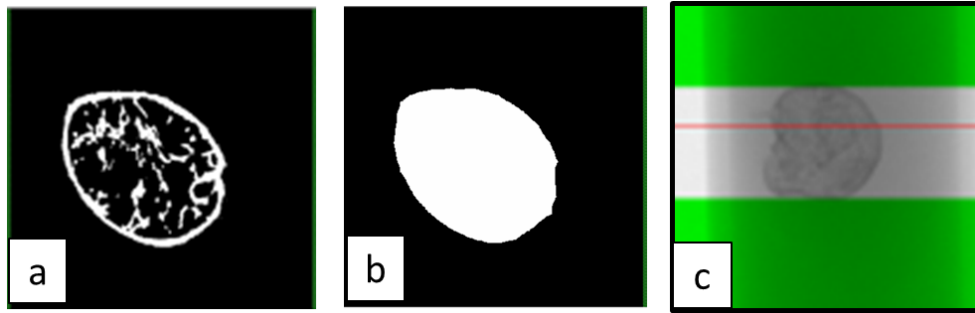
Als *Region of Interest* (ROI), im dreidimensionalen Raum als *Volume of Interest* (VOI) bezeichnet, wurde aufgrund der unterschiedlichen Größe der Proben eine runde ROI verwendet, welche, angepasst an die Größe des Objektes, manuell über die gesamte neugebildete Struktur gelegt wurde (*interpolated ROI*) (Abbildung 3-12).



**Abbildung 3-12: Beispiele für die Region of interest (ROI)**

Bildschirmausschnitt *CT-Analyser* (SkyScan); rote runde Fläche in **a** und **b**: ROI; Zur Bestimmung der ROI wurde eine runde Form verwendet, die so gelegt wurde, dass der gesamte neugebildete Knochen darin enthalten war;  
**a**) HO von Tier 1 Gruppe ASCII Vordergliedmaße rechts. **b**) HO von Tier 3 Gruppe ASCII Vordergliedmaße links.

Eine Segmentation in Kortikalis und Trabekel (Spongiosa) wurde nicht vorgenommen, da es sich um heterotopen Knochen handelt, bei dem sich in dieser Studie die Dicke der „Trabekel“ kaum von der „Kortikalis“-Dicke unterschied. Für die Berechnung des *Tissue/Total volume* (TV) wurde die Funktion *ROI shrink wrap - Stretch over holes with a diameter in 10 voxels* angewandt, um bei Ossikeln mit einer diskontinuierlichen Kortikalis im Querschnitt (z.B. Abbildung 3-12; b) die Lücken zu überbrücken und trotzdem das gesamte TV zu erfassen (Abbildung 3-13; b). Das TV entspricht nach der Nomenklatur der *American Society for Bone and Mineral Research* (ASBMR) (Parfitt et al., 1987) dem Knochengewebe (*bone tissue*) oder nach Bouxsein et al. dem Volumen des gesamten ROI (*total volume*, TV) (Bouxsein et al., 2010) (Abbildung 3-13). Das bedeutet, es beinhaltet die gesamte Knochenmatrix und das Knochenmark. Im Folgenden wird für diese Arbeit die Bezeichnung *Total volume* bevorzugt. Das Knochenvolumen (*bone volume*, BV) ist das Volumen der Regionen die als Knochen segmentiert wurden und die Grauwerte besitzen, die im *Thresholding* eingestellt wurden (Bouxsein et al., 2010) (Abbildung 3-13).



**Abbildung 3-13: CT-Analyser - BV und TV**

Bildschirmausschnitt *CT-Analyser* (SkyScan, Belgien). **a)** Knochenvolumen (BV) in zweidimensionaler Darstellung. **b)** Gesamtvolumen (TV) in zweidimensionaler Darstellung. **c)** rote Linie zeigt Höhe des Querschnittes in der Probe.

Zur Untersuchung der Struktur der Knochenbälkchen wurde der Ausdruck „Trabekel“ der Einfachheit halber verwendet, man muss jedoch anmerken, dass die Bezeichnung nicht der ASBMR Nomenklatur entspricht, da sich diese auf die Spongiosa orthotopen Knochens bezieht. Die verwendeten Einstellungen für die dreidimensionale Analyse und die bestimmten Parameter sind in Tabelle 3-7 und Tabelle 3-8 zusammengefasst.

**Tabelle 3-7: Verwendete Einstellungen für die dreidimensionale Analyse**

CT-Analyser	Version 1.10.9.0 (SkyScan, Antwerpen, Belgien)
<u>Thresholding:</u>	
Lower grey threshold	25
Upper grey threshold	255
ROI shrink wrap	Strech over holes with a diameter in 10 voxels

ROI = Region of Interest

**Tabelle 3-8: Bestimmte Parameter mit CT-Analyser**

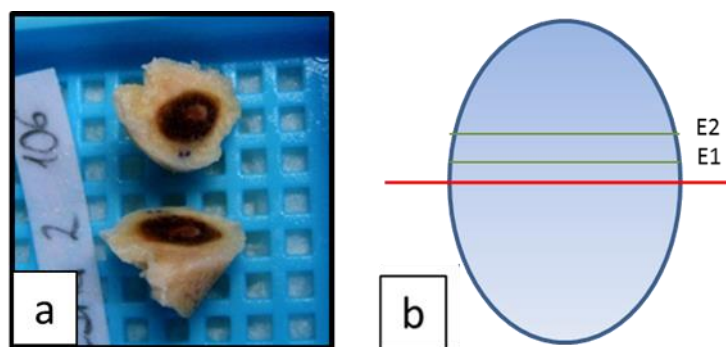
3D Analyse	Erläuterung	Abkürzung	Einheit
Total/Tissue volume	Gesamtvolumen des neugebildeten Knochens	TV	mm <sup>3</sup>
Bone volume	Knochenvolumen	BV	mm <sup>3</sup>
Bone surface	Knochenoberfläche	BS	mm <sup>2</sup>
Percent bone volume	Anteil des Knochenvolumens am Gesamtvolumen (Knochendichte)	BV/TV	%
Bone surface/volume ratio (Bone specific surface)	Knochenoberfläche im Verhältnis zum Knochenvolumen	BS/BV	(mm <sup>-1</sup> )
Trabecular thickness	Durchmesser der Trabekel	Tb. Th	mm
Trabecular separation	Abstand der Trabekel voneinander	Tb. Sp	mm
Trabecular number	Anzahl der Trabekel	Tb. N	mm <sup>-1</sup>

SkyScan, Antwerpen, Belgien; alle Parameter beziehen sich auf die gesamte Knochenneubildung (keine Unterteilung in Kortikalis und Spongiosa).

### 3.7 Bearbeitung der Proben für die lichtmikroskopische Untersuchung

#### 3.7.1 Anfertigen von Paraffinschnitten

Nach Abschluss des Mikro-CT-Scans wurden die Proben nochmals gewaschen und in 20%igem EDTA (pH 7; Sigma-Aldrich, Steinheim) über eine Woche unter ständiger Bewegung (auf dem Rüttler) entkalkt. Alle zwei Tage erfolgte ein Wechsel der Entkalkungslösung. Nach sorgsamer Kontrolle der erfolgreichen Entkalkung mittels einer feinen Kanüle wurden die Proben dreimal mit Leitungswasser gewaschen und dann je 24 h in 70 %, 96 % und 100 %igem Isopropanol (Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe) entwässert. Die gesamte Entwässerung erfolgte in einem Vakuumschrank bei Raumtemperatur und 200 mbar. Vor der Überführung in Aceton (Merck KGaA, Darmstadt) für 6 h wurden die Proben mit einem scharfen Messer in der Mitte geteilt (Abbildung 3-14; a).



**Abbildung 3-14: Heterotope Knochenprobe makroskopisch**

**a)** Halbierung der explantierten Knochenneubildungen; **b)** Schnittschema der histologischen Proben in der Aufsicht. Rote Linie: Schnitt zur Halbierung der Probe. E1, E2: verschiedene Schnittebenen am Mikrotom .

Über Nacht wurden die Proben in heißes Paraffin (Paraplast® X-TRA, Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe) eingelegt und am nächsten Tag jede Hälfte einzeln in Paraffin eingebettet, so dass sich die Schnittfläche an der Oberfläche befand. Nach Aushärtung über zwei Tage, wurden die fertigen Paraffinblöcke zurechtgeschnitten. Der gekühlte Paraffinblock wurde zwischen die Klemmbacken eines Schlittenmikrotoms eingespannt und es wurden von der inneren Oberfläche beginnend ca. 3 und 5 µm dicke Serienschnitte angefertigt (Abbildung 3-14; b). Zwischen den zwei Ebenen befand sich ein Abstand von mindestens 50 µm. Mit einem Pinsel wurden die Schnitte von der Mikrotomklinge abgenommen und zum Strecken in ein 40 °C-Wasserbad verbracht. Nach Glättung der Schnitte wurden diese auf einen Superfrost-Objekträger aufgezogen, kurz zum Abtropfen senkrecht gestellt und dann für ca. 30 min auf

eine Wärmeplatte mit 40 °C gelegt. Danach wurden sie für ca. zwei Tage in einem Wärmeschrank mit 42 °C weiter getrocknet.

### 3.7.2 Anfertigung von Gefrierschnitten

Nach Entnahme des Rückenmarks wurde dieses zur Nachfixierung über 24 h in 4 %igem PFA belassen. Danach erfolgte die Überführung in 5 %ige Sucroselösung (in PBS) bis zum Absinken der Probe. Zum Anfertigen der Gefrierschnitte wurden die Proben aus der Sucrose genommen und die Dura vorsichtig entfernt. Zur Orientierung wurde das Rückenmark kranial mit einem geraden Schnitt und kaudal mit einem schrägen Schnitt auf eine Gesamtlänge von ca. 1,5 cm zurechtgeschnitten. Die Probe wurde nun in ein Kryoeinbettmedium (Tissue-Tek<sup>®</sup>, Weckert, Kitzingen) eingebettet und auf einen Präparatehalter bei -80 °C festgefroren. Dann wurde sie in eine Schneidevorrichtung des Kryotoms (Kryotom Hyrax M 60, MICROM GmbH, Walldorf) eingespannt und Schnitte in Serie mit ca. 35 µm Dicke angefertigt. Jeder 7. Schnitt wurde zur Färbung nach Nissl in TBS überführt. Je sechs Schnitte wurden mit einem Pinsel vorsichtig auf einen mit Gelatine beschichteten Objektträger aufgezogen.

### 3.7.3 Histologische Färbungen

#### 3.7.3.1 Hämalaun-Eosin-Färbung

Die Hämalaun-Eosin (HE)-Färbung diente als Übersichtsfärbung. Sie wurde nach einem Standardprotokoll durchgeführt.

#### 3.7.3.2 Giemsa-Färbung

Die Giemsa-Färbung diente als Übersichtsfärbung für die Charakterisierung verschiedener Entzündungszellen. Es wurden dünnere Schnitte (ca. 3 µm Schnittdicke) verwendet, um die Anzahl der Zellüberlagerungen zu verringern und die Zellen besser charakterisieren zu können. Die Giemsa-Lösung (1:50) wurde unmittelbar vor Anwendung mit 1:10 verdünntem Phosphatpuffer nach Sørensen (0,1 M, pH 7,0) angesetzt. Dieser wurde aus zwei Stammlösungen hergestellt (Tabelle 3-9). Für einen pH Wert von 7 wurden 61 ml der Stammlösung B benötigt und mit der Stammlösung A auf 100 ml aufgefüllt.

**Tabelle 3-9: Ansetzen der Stammlösungen**

<b>A) Kaliumdihydrogenphosphat</b>	9,078 g	Mit Aqua dest auf 1000 ml auffüllen
<b>B) Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat</b>	11,876 g	Mit Aqua dest auf 1000 ml auffüllen

Die Giemsa-Färbung wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt:

**Tabelle 3-10: Giemsa-Färbung**

Arbeitsschritt	Lösung	Dauer, Anmerkung
Entparaffinieren	Xylol	2x10 min
Rehydrieren (Absteigende Alkoholreihe)	100 %, 96 %, 70 %, 50 % Isopropanol	4x5 min
Färben	Sörensen-Puffer Giemsa-Lösung (1:50 in Sörensen-Puffer)	1x kurz, 1x5 min
Differenzieren	Essigsäure 1 %	kurz, bis Schnitte rötlich werden
weiter differenzieren	96 % Isopropanol 100 % Isopropanol	1-2x kurz 2x30 s
Klären	Xylol	2x8 min
Eindecken	Roti®-Histokitt	

Protokoll nach Mulisch und Welsch (2010).

### 3.7.3.3 Toluidinblau-Färbung

Die Toluidinblau-Färbung wurde in der Dosisfindungsstudie als Übersichtsfärbung verwendet. Sie wurde nach Standardprotokoll durchgeführt, welches sich in Anhang A, Tabelle A1 befindet.

### 3.7.3.4 Nissl-Färbung

Die Nissl-Färbung stellt die sogenannten Nissl-Schollen (raues endoplasmatisches Retikulum) und Zellkerne von Nervenzellen dar. Dabei werden Zellkerne und Nissl-Schollen rotviolett/violett und das Zytoplasma und restliches Gewebe hellviolett/hellblau angefärbt (Mulisch und Welsch, 2010). Die Färbung wurde zur Darstellung des spinalen Traumas an Sagittalschnitten des Rückenmarks durchgeführt; das Protokoll befindet sich in Anhang A, Tabelle A2.

## 3.8 Histologische Untersuchung

### 3.8.1 Lichtmikroskopische Auswertung

Alle Schnitte wurden lichtmikroskopisch untersucht und mithilfe des Digitalmikroskops (Mikroskopsystem AxioPlan 2 imaging und Axio Cam HRC, Carl Zeiss Lichtmikroskopie, Göttingen) und des Programmes Axio Vision 4.6.3.0 wurden die Bilder digital erfasst und gespeichert. Die HE-gefärbten Schnitte dienten der Übersicht; für die semiquantitativen Auswertungen wurden zusätzlich die Giemsa gefärbten und die immunhistologisch gefärbten Schnitte (siehe 3.9) herangezogen. Die histologische Auswertung erfolgte deskriptiv und semiquantitativ.

Bei der deskriptiven Beurteilung wurden die unterschiedlichen Gewebe- und Zelltypen charakterisiert und die Reaktion des umliegenden Gewebes auf das Implantat untersucht.

Bei der semiquantitativen Beurteilung wurden sechs Parameter mit einer Skala von 0-3 bewertet:

Ausprägung/Menge: 0=keine/nicht vorhanden, 1=gering, 2=mittelgradig, 3=hochgradig.

Bei der Auswahl der Parameter wurden zwei Publikationen von Luca et al. (2010 und 2011) zugrunde gelegt. Die Parameter 1-4 wurden speziell für diese Studie ergänzt.

Jede Probe wurde anhand von zwei Schnitten der Immunhistologie (Ebene 1 und Ebene 2) und je einem Schnitt der Giemsa-Färbung sowie einem Schnitt der HE-Färbung beurteilt.

Beurteilte Parameter:

1. Lokalisation des Knochens im Muskel (direkter Kontakt zu bindegewebigen Anteilen im Muskelgewebe, Abkürzung: BGW-Kontakt)
2. Anteil des Markraumes (Knochenmark und bindegewebige Anteile im Knochengewebe) im Verhältnis zur Knochenmatrix („Dichte des Knochens“, Abkürzung: KM)
3. Bindegewebige Anteile innerhalb des Knochens (Abkürzung: Mikrocallus)
4. Menge an CD68-positiven Zellen (mononukleär, Abkürzung: CD68+)
5. Vorhandene Gefäße (Sinus) im Knochenmark (Abkürzung: KM-Gefäße)
6. Menge an hämatopoetisch aktivem Knochenmark (Abkürzung: HKM)

## **3.9 Immunhistologie**

### **3.9.1 Primärantikörper CD68**

Bei dem verwendeten Primärantikörper der Firma abcam<sup>®</sup> (abcam plc, Cambridge, United Kingdom) handelt es sich um einen monoklonalen Maus-Antikörper (AK) mit der Klonnummer ED1 (Isotyp IgG<sub>1</sub>), der mit der Spezies Ratte reagiert. Der Antikörper bindet an ein Glykoprotein, das hauptsächlich auf Lysosomenmembranen myeloider Zellen exprimiert wird. Schwache Ausprägungen auf der Zellmembran sind jedoch auch möglich. Das Antigen wird stark von Blutmonozyten und Gewebsmakrophagen exprimiert, schwach von Granulozyten und kann auch bei Lymphozyten, Fibroblasten und Endothelzellen vorkommen (<http://www.abcam.com/cd68-antibody-ed1-ab31630.html>). Das Färbeergebnis zeigt sich im Zytoplasma der Zellen.

### **3.9.2 Immunhistologischer Nachweis von CD68 - Methode**

Es wurde die Avidin-Biotin-Komplex-Alkalische Phosphatase (ABC-AP)-Methode (Vectastain ABC-AP Kit Standard, AK-5000, Vector Laboratories, Burlingame, California, USA) mit dem Chromogen *Fast Red* (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) angewendet. Als



Antigen-Demaskierung diente die Proteinase-K-Behandlung (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim). Es wurde ein biotinylierter Ziege-anti-Maus-Immunglobulin G (IgG)-Sekundärantikörper verwendet.

- 1) Entparaffinieren der Schnitte in Roti<sup>®</sup>-Histol (Xylol-Ersatz) 4x für je 5 min
- 2) Rehydrieren (Absteigende Alkoholreihe: 100 %, 96 %, 70 %, 50 % Isopropanol) 4x für je 5 min
- 3) Waschen der Schnitte in Aqua dest für 5 min und in PBS (pH 7,5; s. Anhang) 2x für je 2 min
- 4) Proteinase K-Behandlung (1:1000 in PBS) für 20 min bei 37 °C in einer feuchten Kammer
- 5) Waschen der Schnitte in PBS 3x für 2 min
- 6) Inkubation mit 5 %igem BSA (Bovines Serumalbumin, Sigma-Aldrich, Steinheim) in PBS für 30 min bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer
- 7) Auftragen des monoklonalen Maus-anti-Ratte-CD68-Primärantikörpers (1:100 in 1 % BSA in PBS); Inkubation der Schnitte für 14-18 h bei 4 °C in einer feuchten Kammer;
- 8) Waschen der Schnitte in TBS (pH 7,6; s. Anhang) 3x für je 5 min
- 9) Auftragen des biotinylierten Ziege-anti-Maus-IgG-Sekundärantikörpers (1:100 in TBS); Inkubation der Schnitte für 30 min bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer
- 10) Spülen der Schnitte 3x in TBS für je 5 min
- 11) Auftragen des Avidin-Biotin-Alkalische Phosphatase-Komplexes (Vorbereitung nach Herstellerangabe) und Inkubation in der feuchten Kammer für 30 min bei Raumtemperatur
- 12) Spülen der Schnitte 3x für 5 min in TBS
- 13) Auftragen der *Fast Red*-Lösung und Inkubation in der feuchten Kammer bei Dunkelheit und Raumtemperatur für 10 min
- 14) Spülen der Schnitte in Aqua dest 3x kurz
- 15) Gegenfärben der Schnitte für 3 min mit Hämalaun, 3x kurz spülen in Leitungswasser und für ca. 15 min bläuen
- 16) Eindecken der Schnitte mit Aquatex<sup>®</sup>.

### 3.9.3 Immunhistologische Kontrollen

Als Positivkontrolle diente das Präparat einer Rattenmilz. Negativkontrollen wurden für einen Großteil der Proben angefertigt, indem ein zweiter Schnitt auf dem gleichen Objektträger ohne Applikation des Primärantikörpers mitgeführt wurde.

### 3.9.4 Auswertung der Immunhistologie

Die Auswertung erfolgte deskriptiv und semiquantitativ. Bei der Deskription diente der immunhistologische Nachweis von CD68 der Charakterisierung von Osteoklasten und Fremdkörperriesenzellen.

Die Menge und das Vorkommen CD68-positiver, einkerniger Zellen als Identifikation von Makrophagen, wurden in zentralen Querschnitten in zwei Ebenen (E1 und E2, je Knochenneubildung ein Schnitt pro Ebene) lichtmikroskopisch beurteilt und in der semiquantitativen Auswertung mit einer Skala von 0-3 bewertet (siehe 3.8.1).

### **3.10 Biochemische Marker**

Um zusätzliche Informationen über den Knochenstoffwechsel und zirkulierende Wachstumsfaktoren zu gewinnen, wurden im Plasma relevante Faktoren mittels ELISA bestimmt. Es wurde ein Knochenauf- und ein Knochenabbauparameter untersucht: als Knochenformationsmarker die knochenspezifische alkalische Phosphatase (*bone-specific alkaline phosphatase*, BALP) und als Knochenresorptionsmarker das C-terminale Telopeptid des Typ 1 Kollagens (synonyme Bezeichnung: *Crosslaps*). Zusätzlich wurden VEGF (*vascular endothelial growth factor*) und TGF- $\beta$ 2 (*transforming growth factor beta 2*) bestimmt.

#### **3.10.1 Durchführung des ELISA zum Nachweis biochemischer Marker**

##### **Prinzip des ELISA (immungekoppelter Immunoabsorptions-Test):**

Bei dem verwendeten ELISA handelte es sich um einen quantitativen *Sandwich*-ELISA. Hierbei ist eine Mikrotiterplatte mit dem Antikörper (AK) beschichtet, der spezifisch für den zu bestimmenden Parameter ist. Nach Zugabe der Probe, hier Plasma, bindet die gesuchte Substanz (Antigen), wenn vorhanden, an den AK. Nach Entfernen der ungebundenen Substanzen wird ein Biotin-konjugierter AK hinzugegeben, der spezifisch gegen das Antigen gerichtet ist. Nach mehrmaligem Waschen wird Avidin-gekoppelte Meerrettichperoxidase (HRP) hinzugegeben, die an Biotin bindet. Nach Entfernen der überschüssigen Avidin-Enzyme wird ein Substrat hinzugefügt, welches proportional zum Antigen (zu bestimmender Parameter) farblich umgesetzt wird. Die Farbentwicklung wird nach einer definierten Zeit gestoppt und die Intensität photometrisch gemessen (<http://www.cusabio.com>).

Die ELISAs wurden nach Herstellerprotokoll durchgeführt:

**Tabelle 3-11: ELISA-Protokoll**

1.	Vorbereitung der Proben (Verdünnung) und Ansetzen einer Standardreihe
2.	100 µl des Standards oder der Proben in jedes Well. Inkubation: 2 h bei 37 °C
3.	Entfernen der Flüssigkeit in jedem Well, ohne Waschen
4.	100 µl Biotin-AK in jedes Well. Inkubation 1 h bei 37 °C
5.	Entfernen der Flüssigkeit und 3mal Waschen
6.	100 µl HRP-Avidin in jedes Well. Inkubation 1 h bei 37 °C
7.	Entfernen und 5mal Waschen
8.	90 µl des TMB-Substrates in jedes Well. Inkubation 15-30 min bei 37 °C
9.	50 µl Stop-Lösung in jedes Well. Messung mit dem ELISA-Reader bei 450 nm innerhalb von 5 min (Referenzwellenlänge 540 nm)

HRP: Meerrettichperoxidase (*Horse Radish Peroxidase*); TMB: 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin.

Einzigster Unterschied der Durchführung für die verschiedenen Parameter bestand in den unterschiedlichen vom Hersteller empfohlenen Verdünnungen der Proben, die in der Tabelle 3-15 zusammengefasst sind. Sowohl die Proben als auch der Standard wurden im Doppelansatz aufgetragen und gemessen. Bei der Gruppe Norm handelte es sich um Tiere aus der Pilotstudie (Gruppe Kontrolle).

**Tabelle 3-12: ELISA**

ELISA	Probenverdünnung	Probenzahl	Gruppen
BALP	1:100	n=5	HS Kontrolle
		n=5	HS ASCI
		n=1	Norm
Crosslaps	1:5	n=5	HS Kontrolle
		n=5	HS ASCI
		n=3	Norm
VEGF	unverdünnt	n=5	HS Kontrolle
		n=5	HS ASCI
		n=3	Norm
TGF-β2	1:200	n=5	HS Kontrolle
		n=5	HS ASCI
		n=3	Norm

Probenverdünnung nach Herstellerangabe und Probenzahl für alle bestimmten Parameter mittels ELISA; HS: Hauptstudie; DF: Dosisfindung; Norm: Pilotstudie Gruppe Kontrolle

### 3.11 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte in Zusammenarbeit mit Dipl. rer. soc. Simone Gantz (Biometrische Beratung und Projektkoordination, Universitätsklinikum Heidelberg, Zentrum für Orthopädie, Unfallchirurgie und Paraplegiologie) und mit dem Statistikprogramm spss 21 (IBM Corporation, New York, USA). In dieser Studie handelte es sich nicht um normalverteilte Datenwerte, daher wurden nichtparametrische statistische Tests verwendet. Als Vortest (*overall*

*test*) zur Überprüfung auf Signifikanzen wurde der *Kruskal-Wallis*-Test durchgeführt. Für die Auswertungen der Mikro-CT-Ergebnisse und der Histologie wurde aufgrund von abhängigen Proben der *Wilcoxon*-Test verwendet.

Bei der ELISA-Auswertung wurde der *Mann-Whitney-U*-Test durchgeführt. Bei dem Parameter BALP wurde aufgrund von  $n=1$  in der Gruppe Norm als Ausnahme ein t-test zum Vergleich mit einer Stichprobe verwendet.

Zusammenhänge ohne Linearität wurden mit dem Korrelationskoeffizienten nach Spearman untersucht.

Die Werte der statistischen Analyse wurden in den Abbildungen und Tabellen als Median und Minimum/Maximum oder Spannweite (*range*) angegeben und als Box-Whisker-Diagramme dargestellt.

Signifikant unterschiedliche Mediane mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit  $p$  von  $< 0,05$  (signifikant) wurden mit \*, von  $p < 0,01$  (sehr signifikant) mit \*\* und von  $p < 0,001$  (hoch signifikant) mit \*\*\* gekennzeichnet. Ein p-Wert von  $\leq 0,10$  wurde als Trend gewertet.

Die restlichen Daten wurden als arithmetische Mittelwerte (MW) mit Standardabweichung (STABW, Maß für die Streuung der Einzelwerte) dargestellt.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Pilotstudie

In der Pilotstudie wurde der Versuch unternommen nur mithilfe eines Traumas eine heterotope Ossifikation (HO) bei paraplegischen Tieren auszulösen. Hierzu wurden bei 8 Tieren je 4 Kollagenschwämme in die Rückenmuskulatur operativ implantiert. Bei 4 dieser Tiere wurde zusätzlich ein spinales Trauma (ASCI) ausgelöst (Gruppe Pilotstudie-ASCI (PA) n=4; Gruppe Pilotstudie-Kontrolle (PK)) n=4). Bei der Explantation nach 28 Tagen konnten die implantierten Kollagenkonstrukte in der Rückenmuskulatur nicht wieder aufgefunden werden, da sie vollständig resorbiert waren. Die Regionen, an denen die Kollagenimplantate lokalisiert waren, wurden sowohl histologisch als auch mithilfe der Mikro-Computertomographie (Mikro-CT) untersucht. Es ließ sich weder in Gruppe PA noch in Gruppe PK eine Knochenneubildung feststellen. Das Trauma-induzierte Modell kam daher nicht zur Weiterführung der Studie in Frage. Um sicherzustellen, dass sich zuverlässig bei jedem Tier eine HO ausbildete, wurde das HO-Modell der heterotopen Implantation eines Konstruktes mit einem knocheninduzierenden Wachstumsfaktor zur Fortführung der Studie verwendet. Die geeignete Dosis des Wachstumsfaktors *bone morphogenetic protein-2* (BMP-2) und die geeignete Lokalisation für die Implantation mussten zuvor in Dosisfindungsstudien ermittelt werden.

### 4.2 Dosisfindungsstudien

Es wurden zwei Dosisfindungsstudien durchgeführt: Dosisfindung A (DF A) und Dosisfindung B (DF B). In DF A wurden die zwei Träger  $\beta$ -Trikalziumphosphat ( $\beta$ -TCP) (DF A1) und Kollagen (DF A2) mit den Mengen 0, 5, 50 und 150  $\mu$ g des Wachstumsfaktors BMP-2 bei je drei Tieren operativ in die Muskulatur der Vorder- und Hintergliedmaße (M. trapezius und M. semitendinosus) eingebracht. Dosisfindung B diente der Optimierung der Lokalisation der Implantate und wurde an zwei Tieren durchgeführt.

#### 4.2.1 Klinische Beobachtungen

Die Operationen verliefen ohne Komplikationen. Bei einem Tier aus der Gruppe Dosisfindung A1 trat nach der Operation eine ausgeprägte Form des sogenannten Pica-Verhaltens auf. Es handelt sich dabei um unkontrolliertes Fressen von nicht nahrhaften Substanzen, in den häufigsten Fällen von Einstreu (sog. Allotriophagie). Es führte zu einer

Verlegung der Atemwege und damit zum Versterben des Tieres. Somit reduzierte sich in der Gruppe Dosisfindung A1 die Tieranzahl auf n=2.

An den Lokalisationen mit der höchsten BMP-2-Menge (150 µg) kam es innerhalb von 3-5 Tagen zu einer Schwellung die über 2-4 Tage anhielt. An den restlichen Lokalisationen traten keine Auffälligkeiten auf; die Wundnähte verheilten ohne Komplikationen. Alle Implantate wurden von den Tieren gut toleriert.

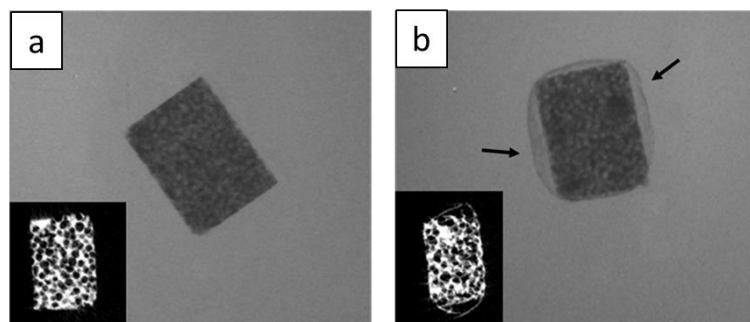
## 4.2.2 Mikro-CT-Untersuchungen

### 4.2.2.1 Dosisfindung A

#### 4.2.2.1.1 β-TCP - Dosisfindung A1

Die Mikro-CT-Aufnahmen im Scout Scan zeigten bei 50 und 150 µg BMP-2 in Kombination mit dem β-TCP-Träger eine Veränderung der Struktur in Form einer Knochenneubildung auf der Außenseite der Blöckchen (Abbildung 4-1, B).

Dies war bei Mengen von 0 und 5 µg BMP-2 nicht der Fall (Abbildung 4-1, A). Das Knochenvolumen (*bone volume* (BV)) konnte aufgrund der nahezu identischen Dichte von Knochen und β-TCP nicht quantitativ bestimmt werden.



**Abbildung 4-1: Mikro-CT-Darstellung Dosisfindung A1, Träger: β-TCP**

Repräsentative Übersichtsaufnahmen (*Pixel size*: 18 µm; 1076 SkyScan) für die Mengen 5 µg (**a**) und 150 µg BMP-2 (**b**) in Kombination mit β-TCP; Inlay: Querschnittsbild aus den rekonstruierten Daten (NRecon, SkyScan); Pfeile: aufgelagerte Knochenneubildung; Gruppe: Dosisfindung A1.

#### 4.2.2.1.2 Kollagen - Dosisfindung A2

Mit den Kollagenträgern konnte im Mikro-CT bei allen drei Tieren mit einer Menge von 150 µg BMP-2 und bei einem Tier mit der Menge 50 µg BMP-2 eine Knochenneubildung innerhalb der Muskulatur quantitativ bestimmt werden. Die Werte des Knochenvolumens (BV) in mm<sup>3</sup> sind in Tabelle 4-1 dargestellt. Ohne BMP-2, bei der Menge 5 µg und bei 2 von 3 Tieren mit Mengen von 50 µg sind keine Knochenneubildungen im Mikro-CT festgestellt worden. Es wurde damit gezeigt, dass die Entstehung einer Knochenneubildung abhängig von der BMP-2-

Dosis war und die Größe des neugebildeten Knochens mit steigender Menge an BMP-2 proportional zunahm. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass es jedoch erhebliche individuelle Unterschiede in der Größe der Knochenneubildung zwischen den Versuchstieren gab.

**Tabelle 4-1: Ergebnisse Mikro-CT Dosisfindung A2, Träger: Kollagen**

Träger	rhBMP-2 (µg)	Knocheninduktion sichtbar im Mikro-CT	Volumen des induzierten Knochengewebes (mm <sup>3</sup> )
Kollagen	0 (K1)	0/3	0
	5 (K2)	0/3	0
	50 (K3)	1/3	0,79
	150 (K4)	3/3	4,06
			1,94
			5,05

Knocheninduktion sichtbar im Mikro-CT (Proben mit Knocheninduktion/Gesamtzahl der Proben) und Volumen des neugebildeten Knochengewebes nach der Implantation von unterschiedlichen Mengen BMP-2 in Kombination mit dem Träger Kollagen in die Muskulatur für 4 Wochen; Gruppe Dosisfindung A2; K: Konstrukt; K1: 0 µg, VGM rechts; K2: 5 µg, HGM rechts; K3: 50 µg, HGM links; K4: 150 µg, VGM links; VGM: Vordergliedmaße; HGM: Hintergliedmaße.

#### 4.2.2.2 Dosisfindung B

In Dosisfindung B wurde aufgrund der Ergebnisse in Dosisfindung A die niedrigste knochenbildende Dosis (50 µg) und eine vermutlich sicher knochenbildende Dosis von 100 µg an einer neuen Lokalisation verwendet. Konstrukte ohne BMP-2 dienten als Kontrolle. Die sicher intramuskuläre Implantation in den zuvor verwendeten M. trapezius erwies sich in DF A als schwierig aufgrund der geringen Größe des Muskels. Daher wurde in DF B der M. triceps brachii verwendet. Es wurde darauf geachtet sowohl an der VGM als auch an der HGM alle Dosierungen zu testen, um Einflüsse der Lokalisation auf die Knochenbildungsfähigkeit zu erkennen.

Für alle Implantate mit BMP-2 konnte eine Knocheninduktion festgestellt und quantitativ bestimmt werden (siehe Tabelle 4-2). Das Knochenvolumen nahm proportional zur BMP-2-Menge zu. Ferner konnte beobachtet werden, dass sich an der VGM bei gleicher Dosis des BMP-2 größere Knochenneubildungen entwickelt haben.

**Tabelle 4-2: Mikro-CT Ergebnisse Dosisfindung B**

rhBMP-2 ( $\mu\text{g}$ )	Lokalisation	Knocheninduktion sichtbar im Mikro-CT	Volumen des induzierten Knochengewebes ( $\text{mm}^3$ )
0	vorne	0/1	0
	hinten	0/1	0
50	vorne	1/1	1,49
	hinten	1/1	0,67
100	vorne	2/2	5,18
			5,6
	hinten	2/2	1,09
			2

Knocheninduktion sichtbar im Mikro-CT (Proben mit Knocheninduktion/Gesamtanzahl der Proben) und Volumen des neugebildeten Knochengewebes (BV) nach der Implantation von unterschiedlichen Mengen BMP-2 in Kombination mit Kollagen in die Muskulatur (vorne: M. triceps brachii, hinten: M. semitendinosus) für 4 Wochen.

### 4.2.3 Histologische Untersuchung

#### 4.2.3.1 Dosisfindung A

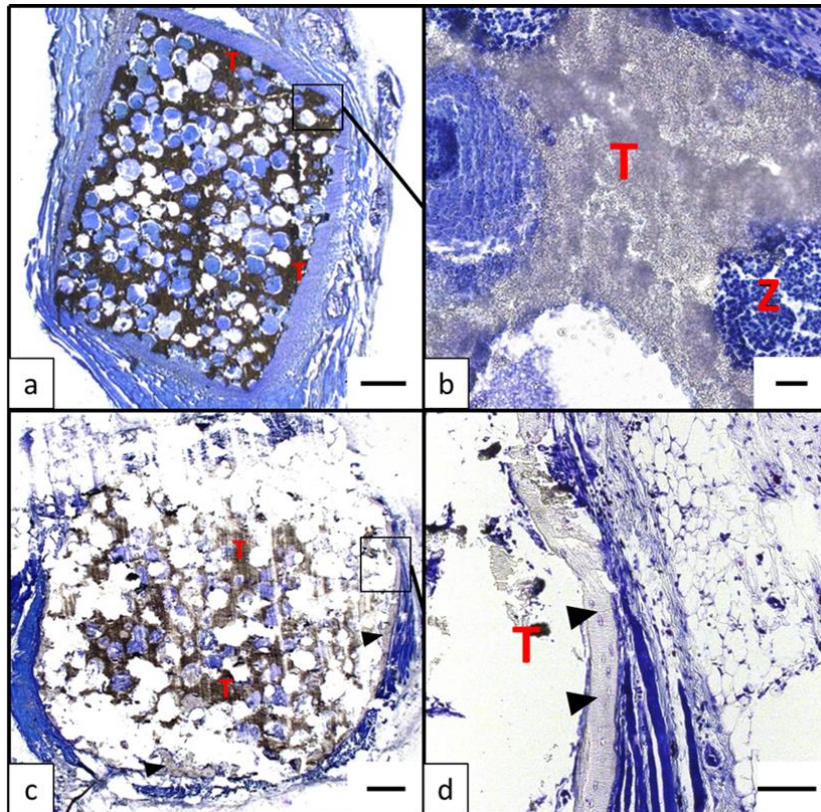
##### 4.2.3.1.1 $\beta$ -TCP - Dosisfindung A1

Bei der histologischen Auswertung der Präparate mit dem Träger  $\beta$ -TCP konnte mit einer Dosis von 50  $\mu\text{g}$  und 150  $\mu\text{g}$  BMP-2 in der histologischen Untersuchung eine Knochenneubildung sicher festgestellt werden. Diese befand sich hauptsächlich am Rand der Implantate, aber auch innerhalb der Poren (Abbildung 4-2, a und b).

Ohne BMP-2 und mit der Dosis 5  $\mu\text{g}$  kam es zu keiner Knochenentwicklung.

Es bildete sich eine Bindegewebshülle um das  $\beta$ -TCP Blöckchen und innerhalb der Poren konnte man eine Einwanderung von Zellen, hauptsächlich Entzündungszellen, beobachten (Abbildung 4-2, c und d).





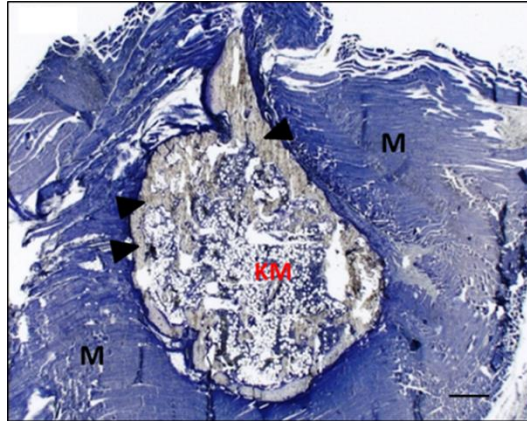
**Abbildung 4-2: Histologie Dosisfindung A1, Träger:  $\beta$ -TCP**

Aufnahmen repräsentativer histologischer Präparate 4 Wochen nach Implantation von  $\beta$ -TCP (4x3x2 mm); **a**) 5  $\mu$ g BMP-2; Obj. 1,25x, Maßstabsbalken 100  $\mu$ m; **b**) Ausschnitt aus **a**, Obj. 20x, Maßstabsbalken 100  $\mu$ m; **c**) 150  $\mu$ g BMP-2; Obj. 1,25x, Maßstabsbalken 1000  $\mu$ m; **d**) Ausschnitt aus **c**, Obj. 10x, Maßstabsbalken 100  $\mu$ m). T:  $\beta$ -TCP-Reste; Z: Zelleinwanderung; Pfeilspitzen: Knochenbälkchen. Toluidinblau.

#### 4.2.3.1.2 Kollagen - Dosisfindung A2

Mit dem Träger Kollagen konnte mit der Dosis 150  $\mu$ g BMP-2 bei allen drei Tieren, mit der Dosis 50  $\mu$ g bei zwei von drei Tieren histologisch eine Knocheninduktion festgestellt werden (Abbildung 4-3). Es wurde folglich bei einem Tier an der Lokalisation mit der Dosis 50  $\mu$ g BMP-2 eine Knochenneubildung in der Histologie entdeckt, die zuvor in der Mikro-CT-Auswertung nicht gemessen werden konnte. Dies ist darauf zurückzuführen, dass es sich um eine so kleine Menge Knochen handelte, die im Mikro-CT nicht erfasst werden konnte.

In der Histologie war innerhalb der Muskulatur ein knöcherner Ossikel mit intramedullärem Knochenmark zu sehen. Tabelle 4-3 fasst die Ergebnisse der histologischen Auswertung der Dosisfindung A zusammen.



**Abbildung 4-3: Histologie Dosisfindung A2, Träger: Kollagen**

Repräsentatives histologisches Präparat 4 Wochen nach Implantation von 150 µg BMP-2 auf einem Kollagenvlies; M: Muskulatur; KM: Knochenmark; Pfeilspitzen: Knochenbälkchen. Obj. 1,25x; Maßstabsbalken 500 µm. Toluidinblau.

**Tabelle 4-3: Zusammenfassung Histologische Auswertung Dosisfindung A**

Trägermaterial	rh BHP-2 (µg)	Lokalisation	Knocheninduktion histologisch
β-TCP	0	vorne	0/2
	5	hinten	0/2
	50	hinten	2/2
	150	vorne	2/2
Kollagen	0	vorne	0/3
	5	hinten	0/3
	50	hinten	2/3
	150	vorne	3/3

Knocheninduktion (Proben mit Knocheninduktion/Gesamtanzahl der Proben) nach der Implantation unterschiedlicher Mengen an BMP-2 in Kombination mit zwei verschiedenen Trägermaterialien in die Muskulatur von Sprague-Dawley-Ratten für vier Wochen

#### 4.2.3.2 Dosisfindung B

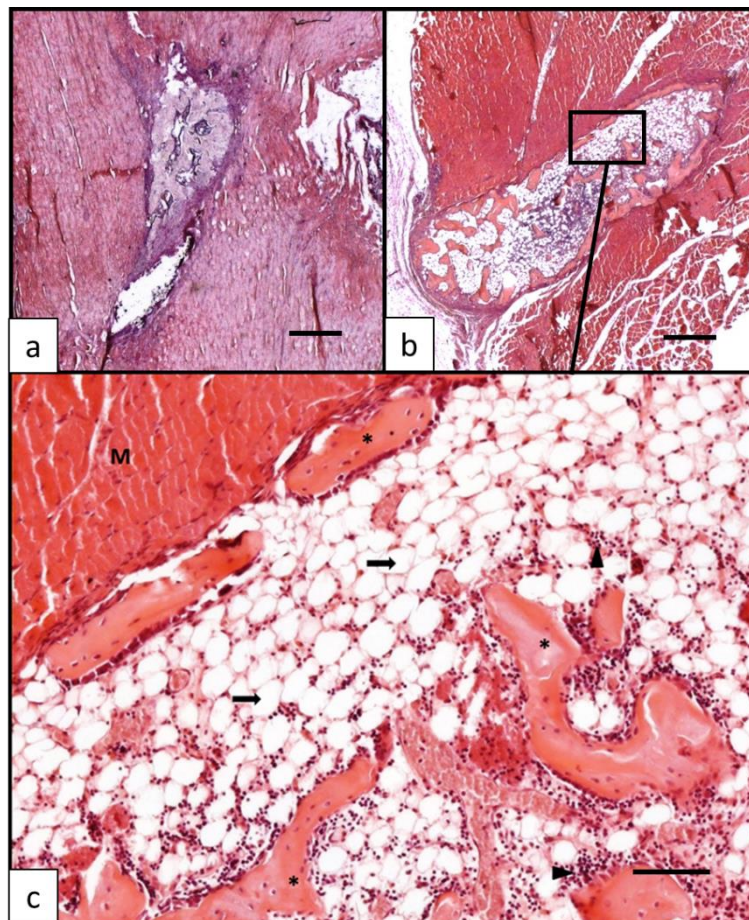
Da es schwierig war, eine komplette intramuskuläre Implantation im M. trapezius zu gewährleisten, wurde in Dosisfindung B der M. triceps brachii als Implantationsstelle an der Vordergliedmaße verwendet. Der Muskel erwies sich als gut geeignet und eine komplette intramuskuläre Implantation konnte gewährleistet werden.

In allen Proben mit BMP-2 konnten Knochenneubildungen unterschiedlicher Größe innerhalb der Muskulatur festgestellt werden. Sie enthielten in unterschiedlichem Ausmaß blutbildendes Knochenmark und Adipozyten (Abbildung 4-4). Die Ergebnisse sind in Tabelle 4-4 aufgeführt.

**Tabelle 4-4: Histologische Auswertung Dosisfindung B**

Trägermaterial	rh BHP-2 (µg)	Lokalisation	Knocheninduktion histologisch
Kollagen	0	M. triceps brachii	0/1
		M. semitendinosus	0/1
	50	M. triceps brachii	1/1
		M. semitendinosus	1/1
	100	M. triceps brachii	2/2
		M. semitendinosus	2/2

Knocheninduktion (Proben mit Knocheninduktion/Gesamtanzahl der Proben) nach der Implantation unterschiedlicher Mengen an BMP-2 in Kombination mit Kollagen in die Muskulatur von Sprague-Dawley-Ratten für vier Wochen



**Abbildung 4-4: Histologie Dosisfindung B**

Repräsentative lichtmikroskopische Aufnahmen der Dosisfindung B vier Wochen nach Implantation eines Kollagenträgers mit **a)** 50 µg BMP-2 und **b)** 100 µg BMP-2; Implantation erfolgte in den M. triceps brachii; Obj. 1,25x; Maßstabsbalken 500 µm; **c)** Ausschnitt aus B; M: Muskulatur; Pfeilspitze: Hämatopoetisches KM; Pfeil: Adipozyt; Stern: Knochenbälkchen mit Osteozyten; Maßstabsbalken 100 µm. HE.

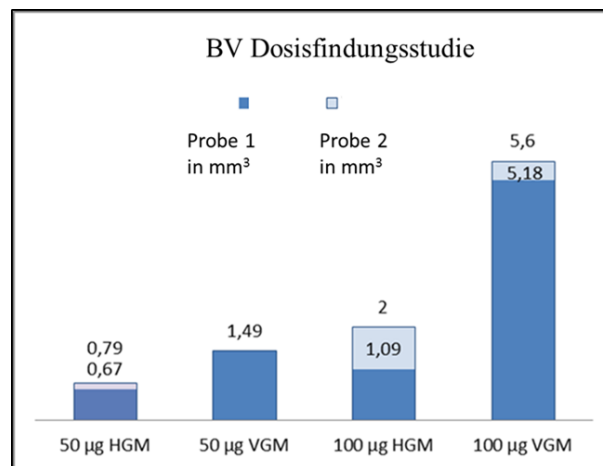
#### 4.2.4 Zusammenfassung der Dosisfindungsstudien

Vor allem in DF B wurde deutlich, dass sich an der vorderen Extremität deutlich mehr Knochen entwickelt hat als an der hinteren (Abbildung 4-5). Die Menge des neugebildeten Knochens



nahm in beiden Studien proportional zu der erhöhten Menge an BMP-2 zu. Aufgrund der geringen Fallzahlen wurde auf eine statistische Auswertung verzichtet.

Für die Fortführung der Studie wurde die niedrigste noch knochenbildende Dosis, in diesem Falle 50 µg gewählt, um Effekte des spinalen Traumas nicht durch zu hohe BMP-2 Dosen zu überdecken.



**Abbildung 4-5: Zusammenfassung der Dosisfindungsstudie mit dem Träger Kollagen**

Ergebnisse der Bestimmung des Knochenvolumens (BV) in mm<sup>3</sup> mittels Mikro-CT vier Wochen nach Implantation. Angabe der Menge BMP-2 in µg; HGM: Hintergliedmaße, VGM: Vordergliedmaße.

## 4.3 Hauptstudie

### 4.3.1 Klinische Beobachtungen

Alle Tiere der Hauptstudie überlebten die Operation und die gesamte Versuchsdauer ohne Komplikationen. Ein Tier aus Gruppe ASCI zeigte *post* OP keine neurologischen Ausfälle und wurde daher nicht in die Studie mit aufgenommen. Um die Gruppengröße n=5 zu erhalten, wurde das Tier ersetzt und die Operation erfolgreich wiederholt. Direkt nach der OP zeigten alle Tiere das sogenannte Pica- Verhalten in Form von unkontrolliertem Fressverhalten nicht nahrhafter Substanzen, das jedoch nach wenigen Stunden abklang.

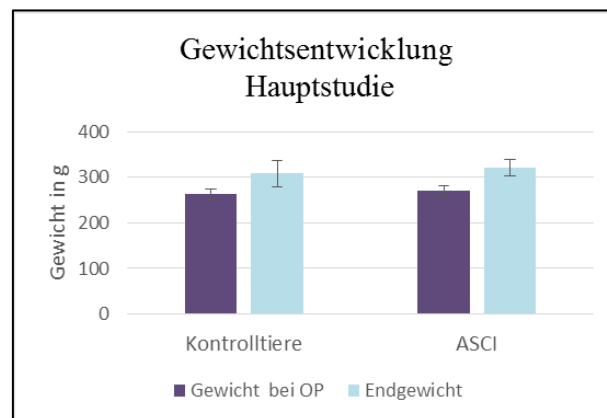
Bei keinem Tier wurden Anzeichen einer Infektion festgestellt. Manipulationen der Operationswunden durch Artgenossen oder Autotomien traten nicht auf. Bei den Tieren waren anhand eines Schmerzprotokolls keine Anzeichen von Schmerzzuständen zu erkennen, die Tiere zeigten ab dem zweiten Tag keine Brillenbildung und normales Fressverhalten (siehe Gewichtsentwicklung). Die Blasenfunktion setzte bei den Tieren der Gruppe ASCI im Schnitt 7-10 Tage nach dem spinalen Trauma wieder ein. Die Operationswunden heilten komplikationslos ab. Es zeigte sich lediglich in den ersten Tagen *post* OP eine minimale

Schwellung an den Implantationsstellen des BMP-2-Konstrukts und bei zwei Tieren entwickelte sich ein leichtes Serom im Bereich der Operationsnaht am Rücken.

### Gewichtsentwicklung

Das durchschnittliche Anfangsgewicht in der ASCI-Gruppe betrug  $269,8 \pm 12$  g und in der Kontrollgruppe:  $262,6 \pm 13$  g. Das durchschnittliche Endgewicht der ASCI- Tiere betrug  $320 \pm 18$  g, das der Kontrolltiere  $308,6 \pm 28$  g.

Es konnte eine mittlere Gewichtszunahme von 46,0 g (17,5 % des Anfangsgewichts) in der Kontrollgruppe und von 50,2 g (18,6 %) in der ASCI-Gruppe beobachtet werden. Somit ergaben sich keine wesentlichen Unterschiede in der Gewichtszunahme zwischen beiden Gruppen (Abbildung 4-6). Dieses Ergebnis zeigt, dass das spinale Trauma bei den Tieren zu keiner reduzierten Futteraufnahme führte.



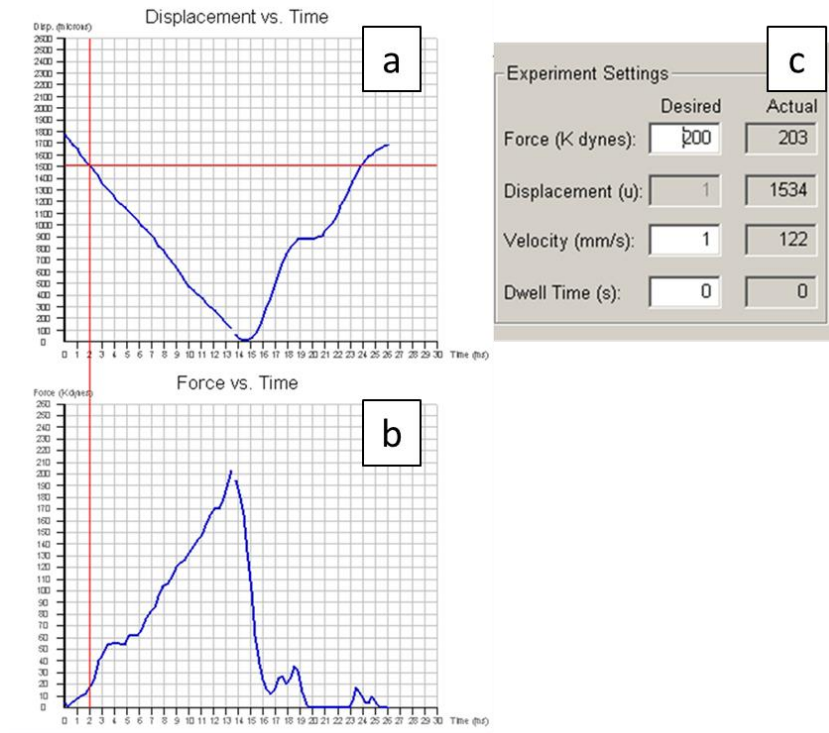
**Abbildung 4-6: Gewichtsentwicklung der Versuchstiere in der Hauptstudie**

Gruppe ASCI (n=5) und Gruppe Kontrolle (n=5); Versuchszeitraum von 4 Wochen; Gewichtsangabe in g (MW  $\pm$  Standardabweichung); Ratten: Sprague-Dawley; Alter zu Beginn der Studie: 3 Monate.

### 4.3.2 Operationen

Die grafische Darstellung des Aufprallvorganges ermöglichte eine sofortige Beurteilung des Operationsergebnisses. Bei allen Tieren zeigten die Grafiken einen korrekten Verlauf.

Beispielhaft wird die Grafik eines Tieres in Abbildung 4-7 dargestellt (Tier 4 Gruppe ASCI; Aufnahme der Rückenmarkläsion des gleichen Tieres in Abbildung 4-8). Das Computerprogramm ergab folgende Messungen: mittleres *Displacement* von  $1347 \pm 243$   $\mu$ m, eine mittlere Kraft (*actual force*) von  $205 \pm 5$  kdyn und eine mittlere Geschwindigkeit (*velocity*) von  $121,6 \pm 1$  mm/s.

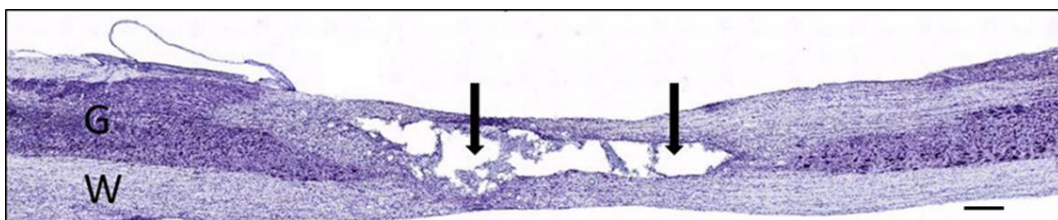


**Abbildung 4-7: Grafiken eines Versuchsablaufes mit dem IH-Impaktor**

Exemplarisch: Tier 4 Gruppe ASCI; **a)** *Displacement versus Time*-Grafik; **b)** *Force versus Time*-Grafik; **c)** Bildschirmansicht der Einstellungen nach ausgeführtem Impact.

#### 4.3.2.1 Lichtmikroskopische Darstellung der Rückenmarkläsion

Um das verwendete Modell des spinalen Traumas zu beurteilen, wurde exemplarisch das Rückenmark eines Tieres aus der Gruppe ASCI (Tier 4, BBB-Score 12 an Tag 28) histologisch aufgearbeitet (Abbildung 4-8). Im Sagittalschnitt des Rückenmarks konnte man im Bereich der Läsion einen Verlust der grauen Substanz erkennen (Abbildung 4-8). Dieser Bereich zeigte eine ausgeprägte Zystenbildung über eine Distanz von ca. 5 mm. Um die Zysten befand sich nur noch ein schmaler Saum weißer Substanz.



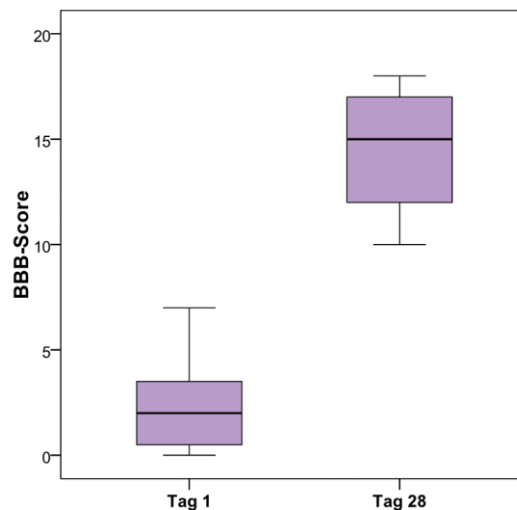
**Abbildung 4-8: Histologie Rückenmarkstrauma**

Exemplarisch Tier 4 Gruppe ASCI, vier Wochen nach spinalem Trauma durch ein Kontusionsmodell mithilfe des IH-Impaktor; Gefrierschnitt; Rückenmark sagittal; ca. 35 µm; G: graue Substanz, W: weiße Substanz, Pfeile: Zystenbildung. Maßstabsbalken 500 µm; Nissl-Färbung.

### 4.3.3 Beurteilung des spinalen Traumas - BBB-Score

Um die motorischen Funktionen der Hintergliedmaßen der Ratten nach dem spinalen Trauma zu beurteilen, wurde eine Modifikation des Standardsystems zur funktionellen Beurteilung eines spinalen Traumas bei der Ratte, der Basso Beattie Bresnahan (BBB)-Score, angewandt. Die Bewertung anhand einer Punkteskala von 0-21 erfolgte an Tag 1 und an Tag 28. Beurteilt wurde aufgrund von Gelenkbewegungen, Pfotenstellung und Belastung der Hinterbeine. Wenn eine eindeutige Klassifizierung nicht möglich war, wurde der niedrigere Wert erteilt. Zur Auswertung wurden erst beide Beine einzeln bewertet und dann die BBB-Werte beider Beine gemittelt (Einzelwerte siehe Anhang).

In der ASCI-Gruppe konnte an Tag 1 ein Medianwert von 2 (Minimum 0, Maximum 7) und an Tag 28 von 15 (Minimum 10, Maximum 18) bestimmt werden (Abbildung 4-9). Bei den ASCI-Tieren erhöhte sich der Anfangswert innerhalb von vier Wochen nach dem spinalen Trauma um 11,5 Punkte (Medianwert). Das bedeutet, dass an Tag 1 die meisten Tiere die Hinterbeine nicht oder in ein bis zwei Gelenken bewegen konnten und nach vier Wochen wieder ein mehr oder weniger koordiniertes Gangbild zeigten. Es handelte sich somit um ein moderates spinale Trauma mit partieller funktioneller Wiederherstellung. Die Tiere der Gruppe Kontrolle zeigten zu keinem Zeitpunkt neurologische Defizite. Bei allen 5 Tieren ergab sich somit an Tag 1 der BBB-Score 21. Auf eine weitere Untersuchung an Tag 28 wurde verzichtet.



**Abbildung 4-9: BBB-Score Gruppe ASCI an Tag 1 und Tag 28**

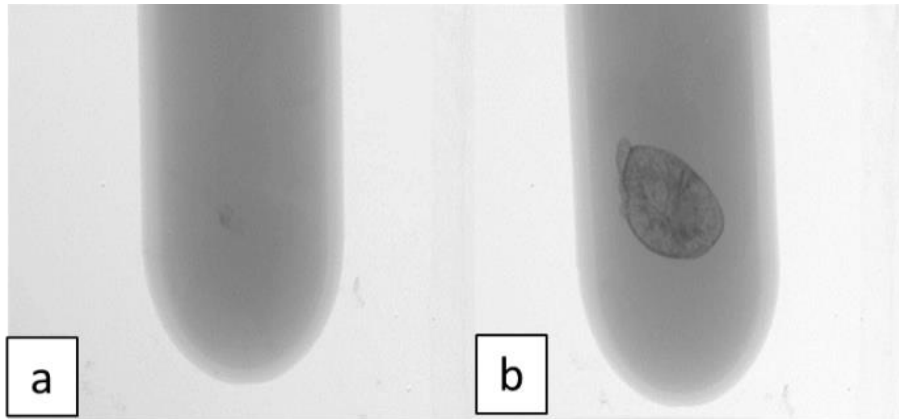
Score 2: ausgiebige Bewegungen von einem Gelenk oder ausgiebige Bewegung von einem Gelenk und geringe Bewegung eines anderen Gelenkes; Score 15: ständiger plantarer Gang und ständige Vorderhand-Hinterhand-Koordination.

*Box and Whisker Plot* : Länge der Box: Interquartilsabstand (IQR), obere Begrenzung: oberes Quartil (75 %), untere Begrenzung: unteres Quartil (25 %); Median: horizontale Linie in der Box; Antennen: minimaler und maximaler Wert bis zu einer Länge des 1,5- fachen IQR; Länge des gesamten Boxplots: Spannweite.

#### 4.3.4 Mikro-CT Untersuchungen

##### 4.3.4.1 Übersichtsaufnahmen

Vor jeder Rekonstruktion wurde zunächst eine Übersichtsaufnahme (Scout Scan), die einem Röntgenbild gleicht, von jeder der 40 Proben durchgeführt. Schon hier waren deutliche Größenunterschiede der heterotopen Knochenstückchen erkennbar (Abbildung 4-10).



**Abbildung 4-10: Übersichtsaufnahmen Mikro-CT**

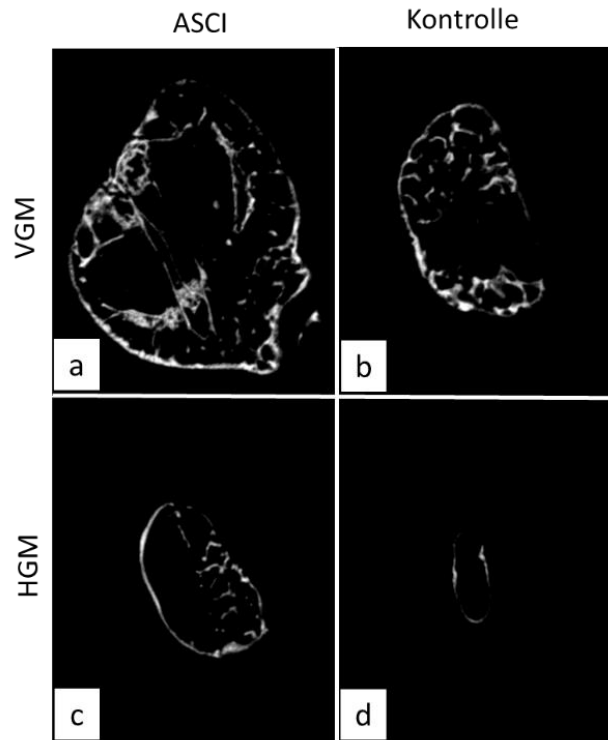
**a)** Probe des neugebildeten Knochens in einer Scout Scan-Aufnahme von Tier 5 Gruppe Kontrolle, Hintergliedmaße rechts, kleinste Probe (BV: 0,37 mm<sup>3</sup>); **b)** Tier 3 Gruppe ASCI Vordegliedmaße links, größte Probe (BV: 32,97 mm<sup>3</sup>). Die Proben befanden sich in einem Eppendorfgefäß mit 2 ml 70 %igem Isopropanol; Filter: Titan (Ti) 0,025 mm; *Pixel size*: 18 µm; SkyScan-1076 in-vivo Mikro-CT-System.

##### 4.3.4.2 Rekonstruktion und dreidimensionale Darstellung (CTVox)

In den rekonstruierten Daten war es möglich, Querschnitte der gesamten Knochenprobe visuell darzustellen. Dabei war in allen Proben eine ähnliche Knochenstruktur zu erkennen (Abbildung 4-11). Außen befand sich eine schmale dichtere Zone, die einen Hohlraum umgab, der in unterschiedlichen Graden mit Knochenbälkchen durchsetzt war. Je größer die Probe war, umso mehr Knochenbälkchen konnten meist im Inneren festgestellt werden.

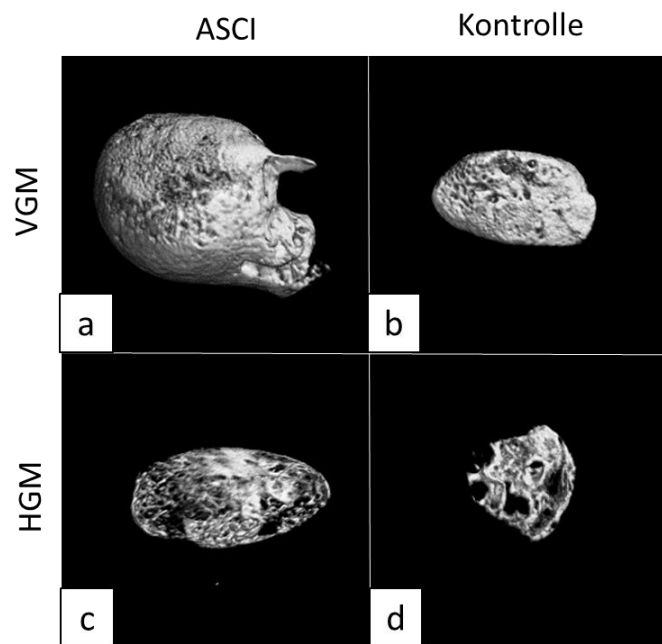
In der dreidimensionalen Darstellung stellte sich die Form der Knochenneubildungen als rund bis oval dar, zum Teil mit spitzen Ausläufern (Abbildung 4-12).





**Abbildung 4-11: Mikro-CT-Darstellung 2D**

Querschnitte durch den heterotopen Knochen im Zentrum des Ossikels; Rekonstruierte Daten NRecon; *thresholding 25-255*; **a)** VGM Gruppe ASCII; **b)** VGM Gruppe Kontrolle; **c)** HGM Gruppe ASCII; **d)** HGM Gruppe Kontrolle. HGM: Hintergliedmaße; VGM: Vordergliedmaße. SkyScan-1076 in-vivo Mikro-CT-System.



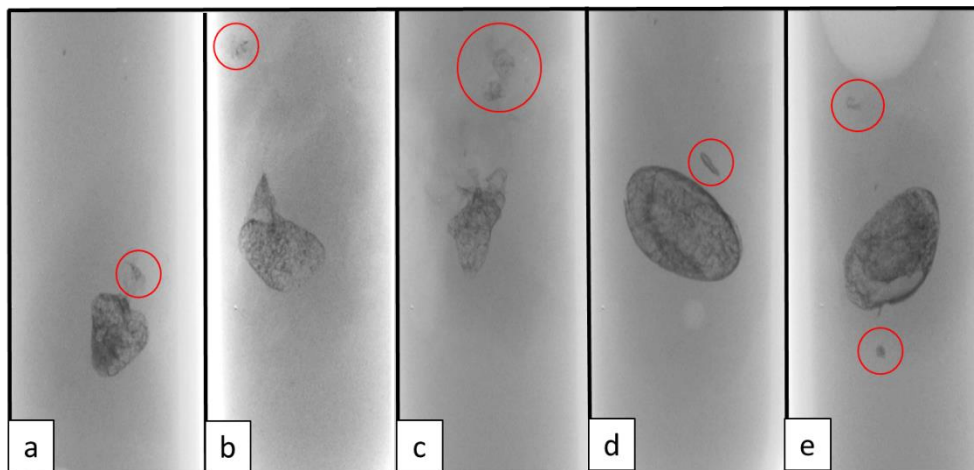
**Abbildung 4-12: Mikro-CT-Darstellung 3D**

Repräsentative 3-dimensionale Darstellung der Oberfläche der Knochenneubildung nach vier Wochen. **a)** VGM Gruppe ASCII; **b)** VGM Gruppe Kontrolle; **c)** HGM Gruppe ASCII; **d)** HGM Gruppe Kontrolle. HGM: Hintergliedmaße; VGM: Vordergliedmaße. SkyScan-1076 in-vivo Mikro-CT-System.

#### 4.3.4.3 3D-Analyse (CT-Analyser)

Es wurden insgesamt 8 morphologische Knochenparameter mittels 3D-Analyse bestimmt: das Knochenvolumen (*bone volume*, BV), das Gesamtvolumen (TV), die Knochenoberfläche (BS), der Anteil des Knochenvolumens am Gesamtvolumen (Knochendichte) (BV/TV), die Knochenoberfläche im Verhältnis zum Knochenvolumen (BS/BV) und drei Strukturparameter. Der Schwerpunkt lag auf dem Volumen des neugebildeten Knochens und dem Vergleich zwischen den Gruppen ASCI und Kontrolle.

Bei drei Tieren der Gruppe ASCI (Tier 2, 3 und 4) befanden sich neben den Knochenneubildungen in der Muskulatur zusätzlich kleine Knochenstückchen in der Haut, meist im Bereich des Fadens (Abbildung 4-13). Bemerkenswerterweise trat dieses Phänomen bei keinem Tier der Gruppe Kontrolle auf. Die zusätzlichen Knochenstückchen wurden aufgrund der geringen Größe nicht in die Berechnung mit einbezogen.



**Abbildung 4-13: Übersichtsaufnahmen Mikro-CT Gruppe ASCI**

Proben in 70 %igem Isopropanol; Filter: Titan (Ti) 0,025 mm; *Pixel size*: 18  $\mu\text{m}$ ; SkyScan-1076 in-vivo Mikro-CT-System; Kreise rot: separate Knochenneubildungen. **a)** Tier 2 vorne rechts; **b)** Tier 2 hinten rechts; **c)** Tier 2 hinten links; **d)** Tier 3 vorne rechts; **e)** Tier 4 vorne rechts.

##### 4.3.4.3.1 Knochenvolumen (BV), Gesamtvolumen (TV) und Knochenoberfläche (BS)

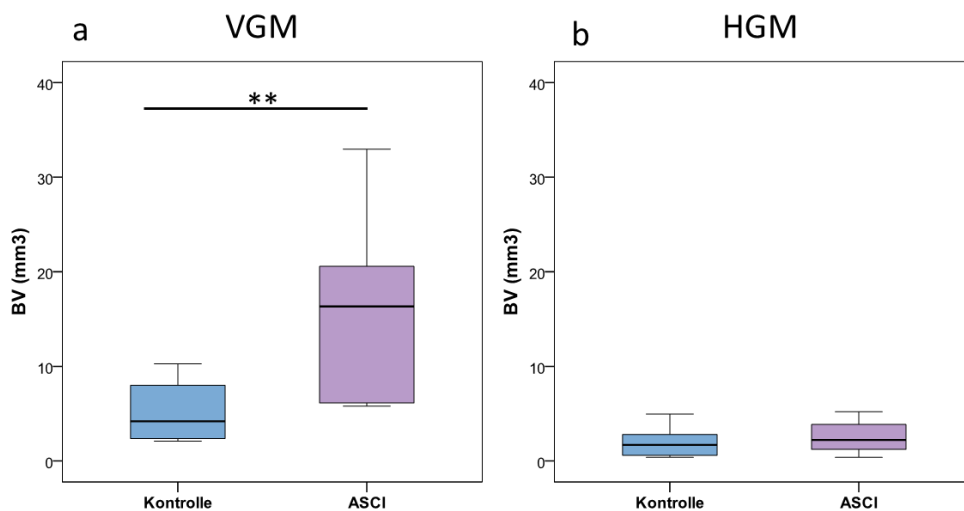
Das geringste Knochenvolumen (BV) über alle Gruppen betrug  $0,37 \text{ mm}^3$  (ASCI Tier 1, HGM; Kontrolle Tier 5, HGM), das größte  $33 \text{ mm}^3$  (ASCI Tier 3, VGM).

Insgesamt lag das Knochenvolumen von 30 Proben unter  $7 \text{ mm}^3$ , das von 10 Proben über  $7 \text{ mm}^3$ . Die großen Volumina waren alle an der Vordergliedmaße lokalisiert und sieben davon gehörten der Gruppe ASCI und drei der Gruppe Kontrolle an.

Vergleiche zwischen den Gruppen ASCI und Kontrolle:

An der Vordergliedmaße war das neugebildete Knochenvolumen in der Gruppe ASCI signifikant größer als das Knochenvolumen der Kontrollgruppe (\*\*  $p = 0,003$ ) (Abbildung 4-14, a). Des Weiteren ergab sich korrespondierend auch ein signifikanter Unterschied in den Parametern TV (\*\*  $p = 0,008$ ) und BS (\*  $p = 0,01$ ). Die Parameter BV/TV und BS/BV unterschieden sich nicht signifikant (BV/TV  $p = 0,226$  und BS/BV  $p = 0,545$ ). Das zeigt, dass die Grundstruktur des Knochens sich in beiden Gruppen nicht wesentlich unterschied; ihr Hauptunterschied lag somit in der Größe der neugebildeten Knochen.

An der Hintergliedmaße gab es im Knochenvolumen und in den anderen Parametern keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen (Abbildung 4-14, b).

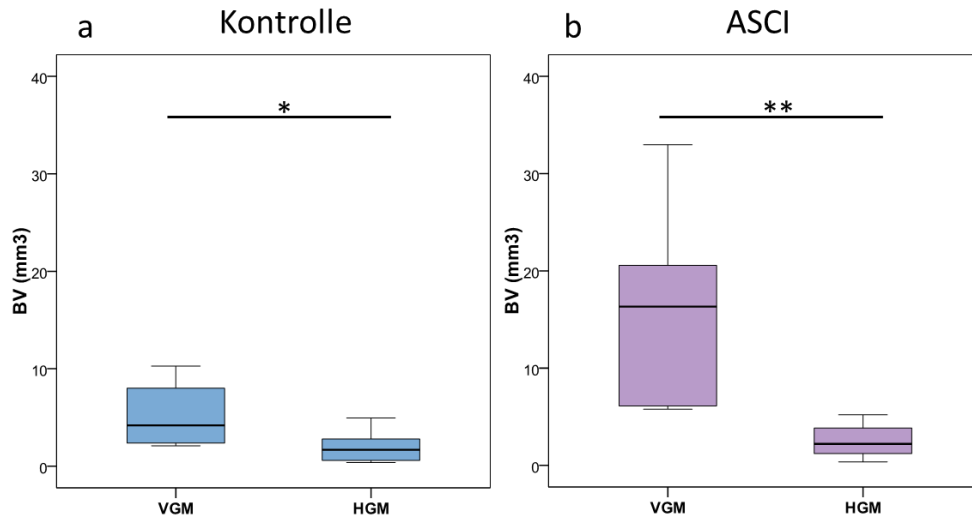


**Abbildung 4-14: Mikro-CT-Analyse: Knochenvolumen (BV) Kontrolle versus ASCI**

Gruppen Kontrolle versus ASCI, *Wilcoxon*-Test,  $n=10$ ; Knochenvolumen (BV) in  $\text{mm}^3$ ; **a)** VGM (Vordergliedmaße) \*\*  $p = 0,003$ ; **b)** HGM (Hintergliedmaße)  $p = 0,571$ . *Box and Whisker Plot*: Länge der Box: Interquartilsabstand (IQR), obere Begrenzung: oberes Quartil (75 %), untere Begrenzung: unteres Quartil (25 %); Median: horizontale Linie in der Box; Antennen: minimaler und maximaler Wert bis zu einer Länge des 1,5-fachen IQR; Länge des gesamten Boxplots: Spannweite; Signifikanz: \*\* =  $p < 0,01$ .

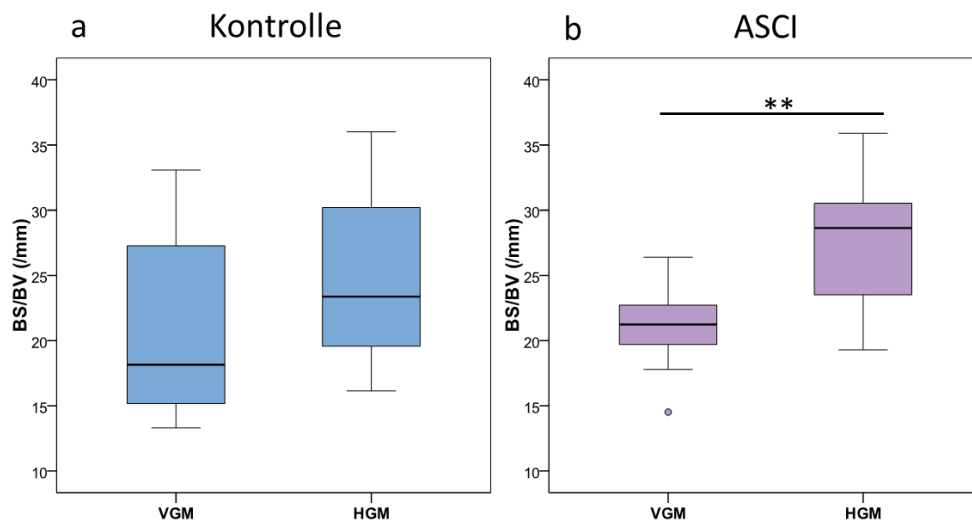
Vergleiche zwischen Vordergliedmaße und Hintergliedmaße:

Innerhalb der Gruppen gab es sowohl in der Gruppe ASCI als auch in der Kontrollgruppe signifikante Unterschiede zwischen der VGM und der HGM. An der Vorderextremität waren in beiden Gruppen Knochenvolumen (BV, Abbildung 4-15), Gesamtvolumen (TV) und Knochenoberfläche (BS) erhöht (ASCI: BV \*\*  $p = 0,005$ ; TV \*\*  $p = 0,007$ ; BS: \*\*  $p = 0,009$ ; Kontrolle: BV \*  $p = 0,017$ ; TV  $p = 0,059$  (Trend); BS \*  $p = 0,047$ ). Dieses Phänomen wurde schon in den Dosisfindungsstudien beobachtet.



**Abbildung 4-15: Mikro-CT-Analyse: Knochenvolumen (BV) Kontrolle und ASCI**

Knochenvolumen (BV) in mm<sup>3</sup>; *Wilcoxon*-Test, n=10; **a)** Gruppe ASCI VGM vs. HGM, \*\* p = 0,005; **b)** Gruppe Kontrolle VGM vs. HGM, \* p = 0,017; VGM: Vordergliedmaße; HGM: Hintergliedmaße. *Box and Whisker Plot*: Länge der Box: Interquartilsabstand (IQR), obere Begrenzung: oberes Quartil (75 %), untere Begrenzung: unteres Quartil (25 %); Median: horizontale Linie in der Box; Antennen: minimaler und maximaler Wert bis zu einer Länge des 1,5-fachen IQR; Länge des gesamten Boxplots: Spannweite; Signifikanz: \* = p < 0,05, \*\* = p < 0,01.



**Abbildung 4-16: Mikro-CT-Analyse: BS/BV pro mm ASCI und Kontrolle**

Knochenoberfläche in Relation zum Knochenvolumen (BS/BV mm<sup>-1</sup>); *Wilcoxon*-Test, n=10; **a)** Gruppe Kontrolle VGM vs. HGM; **b)** Gruppe ASCI VGM vs. HGM, \*\* p = 0,009; VGM: Vordergliedmaße; HGM: Hintergliedmaße. *Box and Whisker Plot*: Länge der Box: Interquartilsabstand (IQR), obere Begrenzung: oberes Quartil (75 %), untere Begrenzung: unteres Quartil (25 %); Median: horizontale Linie in der Box; Antennen: minimaler und maximaler Wert bis zu einer Länge des 1,5-fachen IQR; Ausreißer (1,5- 3-fache des IQR): Kreise; Länge des gesamten Boxplots (inklusive Ausreißer): Spannweite; Signifikanz: \*\* = p < 0,01.

In der Gruppe ASCI war zusätzlich der Parameter BS/BV (Knochenoberfläche im Verhältnis zum Knochenvolumen) an der Hinterextremität signifikant größer als an der Vorderextremität

(\*\* p = 0,009). Je größer BS/BV, umso dünner sind die Trabekel. Je kleiner der Parameter BS/BV umso kompakter ist der Knochen. Dies zeigte, dass an der VGM der Knochen nicht nur größer, sondern auch kompakter war als an der HGM. Diese Tendenz zeigte sich auch in der Gruppe Kontrolle (Abbildung 4-16).

Für alle Gruppen sind die Mediane und Maxima/Minima des Knochenvolumens (BV), des Gesamtvolumens (TV), der Knochenoberfläche (BS), des Anteils des Knochenvolumens am Gesamtvolumen (BV/TV) und die Knochenoberfläche in Relation zum Knochenvolumen (BS/BV) in Tabelle 4-5 aufgeführt.

**Tabelle 4-5: Mikro-CT-Auswertung: 3D-Analyse**

		BV (mm <sup>3</sup> )	TV (mm <sup>3</sup> )	BS (mm <sup>2</sup> )	BV/TV (%)	BS/BV (mm <sup>-1</sup> )
<b>Kontrolle</b>	Median VGM	<b>4,19 *</b>	<b>14,09</b>	<b>101,81 *</b>	47,09	18,15
	Maximum	10,27	25,30	219,52	66,31	33,08
	Minimum	2,09	3,87	31,62	22,72	13,30
	Median HGM	1,69 *	4,40	39,52 *	45,20	23,37
	Maximum	4,95	22,30	119,49	58,67	36,01
	Minimum	0,37	0,80	8,19	22,18	16,13
		BV (mm <sup>3</sup> )	TV (mm <sup>3</sup> )	BS (mm <sup>2</sup> )	BV/TV (%)	BS/BV (mm <sup>-1</sup> )
<b>ASCI</b>	Median VGM	<b>16,33 **</b>	<b>52,22 **</b>	<b>358,00 **</b>	32,11	21,23 **
	Maximum	32,97	110,23	696,40	49,80	26,39
	Minimum	5,78	11,76	85,14	22,94	14,51
	Median HGM	2,21 **	8,01 **	63,28 **	32,57	28,63 **
	Maximum	5,20	21,03	159,33	57,77	35,90
	Minimum	0,37	0,81	9,94	16,63	19,28

Implantate: BMP-2 (50 µg), Träger: Kollagenvlies; ASCI: Rückenmarkkontusion mit *IH Spinal Cord Impactor* (IH-0400); Kontrolle: Sham-OP (Laminektomie); Versuchstiere: Ratten, Stamm Sprague-Dawley, n=5; Explantation der Proben nach 4 Wochen (n=20); VGM: Vordergliedmaße (n=10); HGM: Hintergliedmaße (n=10); Parameter: BV in mm<sup>3</sup> (*bone volume*, Knochenvolumen), TV in mm<sup>3</sup> (*total volume*, Gesamtvolumen des neugebildeten Knochens), BS in mm<sup>2</sup> (*bone surface*, Knochenoberfläche), BV/TV in % (Anteil des Knochenvolumens am Gesamtvolumen), BS/BV (mm<sup>-1</sup>) (Knochenoberfläche in Relation zum Knochenvolumen); Signifikanzen innerhalb der Gruppen: \* = p < 0,05, \*\* = p < 0,01; *kursiv*: p = 0,1 Trend. Fettschrift: Signifikanzen zwischen den Gruppen.

#### 4.3.4.3.2 Strukturparameter

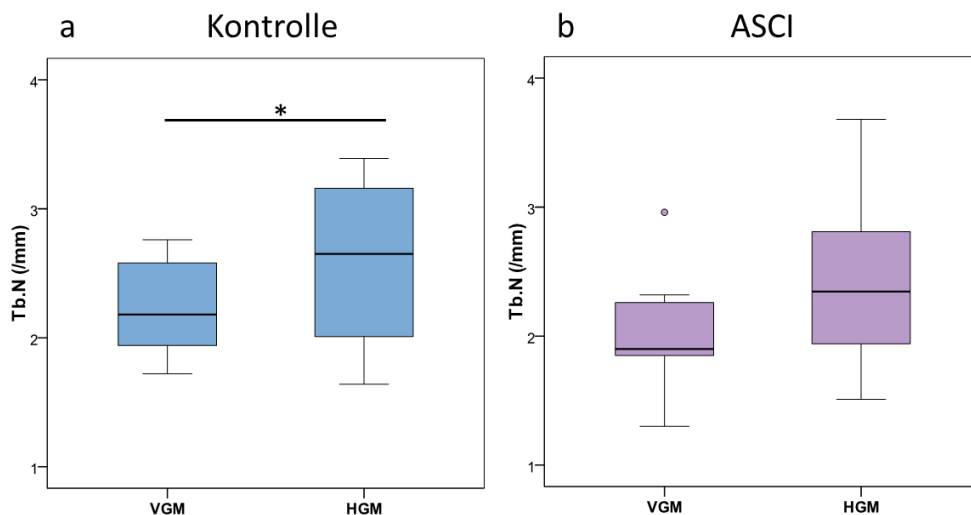
Da es sich bei den Präparaten um heterotop gebildeten Knochen und nicht um orthotopen Knochen handelte, bestand die klassische Einteilung in Kortikalis und Trabekel nur andeutungsweise (siehe Abb 4-10 und 4-11). Es wurde daher keine Unterscheidung in Kortikalis und Trabekel vorgenommen und die Gesamtheit der Knochenbälkchen analysiert und diese der Einfachheit halber als „Trabekel“ bezeichnet. Es wurden zwar die Standardbezeichnungen Trabekelanzahl (Tb. N), Trabekeldurchmesser (Tb. Th) und Trabekelabstand (Tb. Sp) nach ASBMR verwendet, jedoch beziehen sich die Begriffe in dieser Studie nicht nur auf die Spongiosa, sondern auf die gesamte Knochenneubildung.

Vergleiche zwischen den Gruppen ASCI und Kontrolle:

Es gab keine signifikanten Unterschiede in den Trabekelparametern (Tb. N, Tb. Th und Tb. Sp) zwischen den Gruppen ASCI und Kontrolle im Vergleich der Vorder- und Hintergliedmaßen untereinander.

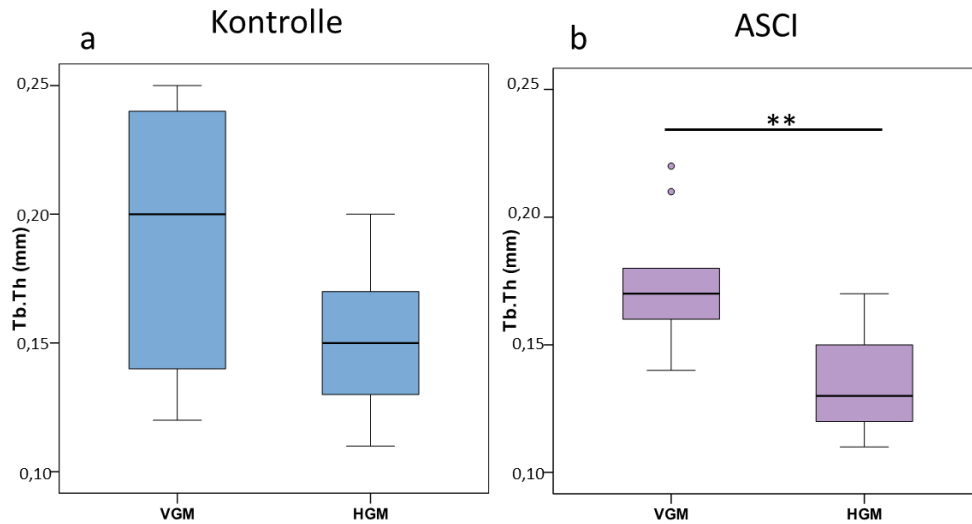
Vergleiche zwischen der Vordergliedmaße und der Hintergliedmaße:

In der Gruppe Kontrolle konnte eine signifikant größere Trabekelzahl (Tb. N) an der Hintergliedmaße festgestellt werden (\*  $p = 0,037$ ; Abbildung 4-17). In der Gruppe ASCI war der Trabekeldurchmesser an der Vordergliedmaße signifikant größer (\*\*  $p = 0,011$ ; Abbildung 4-18). Die Tendenz zur größeren Trabekelzahl an der HGM zeigte sich ebenso in der Gruppe ASCI, wie sich die Tendenz zum größeren Trabekeldurchmesser an der VGM in der Gruppe Kontrolle widerspiegelte. Die Mediane und Maxima/Minima der Trabekelparameter für alle Gruppen sind in Tabelle 4-6 aufgeführt.



**Abbildung 4-17: Mikro-CT-Auswertung Strukturparameter Trabekelanzahl**

Trabekelanzahl (Tb. N) pro mm; **a)** Gruppe Kontrolle, \*  $p = 0,037$ ; **b)** Gruppe ASCI; *Box and Whisker Plot*: Länge der Box: Interquartilsabstand (IQR), obere Begrenzung: oberes Quartil (75 %), untere Begrenzung: unteres Quartil (25 %); Median: horizontale Linie in der Box; Antennen: minimaler und maximaler Wert bis zu einer Länge des 1,5-fachen IQR; Ausreißer (1,5- 3-fache des IQR): Kreise; Länge des gesamten Boxplots (inklusive Ausreißer): Spannweite; Signifikanz: \* =  $p < 0,05$ .



**Abbildung 4-18: Mikro-CT-Auswertung Strukturparameter Trabekeldurchmesser**

Trabekeldurchmesser (Tb. Th) in mm; **a)** Gruppe Kontrolle; **b)** Gruppe ASCI, \*\* p = 0,011.

*Box and Whisker Plot:* Länge der Box: Interquartilsabstand (IQR), obere Begrenzung: oberes Quartil (75 %), untere Begrenzung: unteres Quartil (25 %); Median: horizontale Linie in der Box; Antennen: minimaler und maximaler Wert bis zu einer Länge des 1,5-fachen IQR; Ausreißer (1,5- 3-fache des IQR): Kreise; Länge des gesamten Boxplots (inklusive Ausreißer): Spannweite; Signifikanz: \*\* = p < 0,01.

**Tabelle 4-6: Mikro-CT-Auswertung 3D-Analyse Strukturparameter**

		Tb. N (mm <sup>-1</sup> )	Tb. Th (mm)	Tb. Sp (mm)
<b>Kontrolle</b>	Median VGM	2,18 *	0,20	0,36
	Maximum	2,76	0,25	0,58
	Minimum	1,72	0,12	0,26
	Median HGM	2,65 *	0,15	0,47
	Maximum	3,39	0,20	0,99
	Minimum	1,64	0,11	0,24
		Tb. N (mm <sup>-1</sup> )	Tb. Th (mm)	Tb. Sp (mm)
<b>ASCI</b>	Median VGM	1,90	0,17 **	0,44
	Maximum	2,96	0,22	0,85
	Minimum	1,30	0,14	0,26
	Median HGM	2,35	0,13 **	0,32
	Maximum	3,68	0,17	0,88
	Minimum	1,51	0,11	0,27

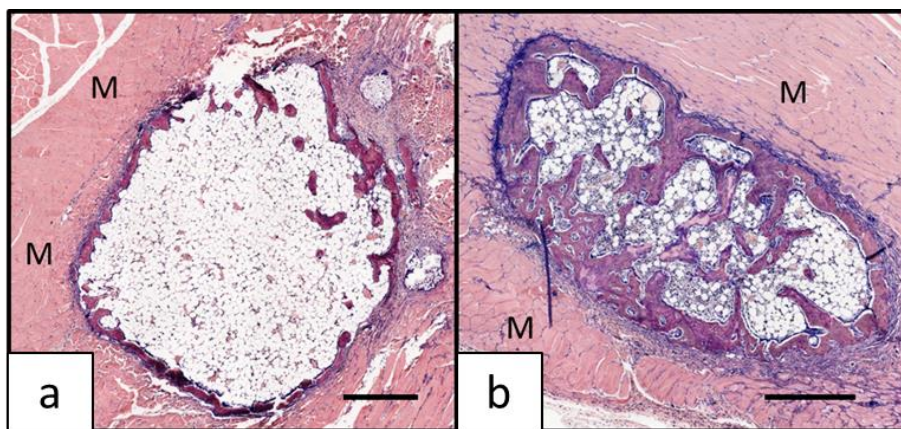
Implantate: BMP-2 (50 µg); Träger: Kollagenvlies; ASCI: Rückenmarkkontusion mit IH Spinal Cord Impactor (IH-0400); Kontrolle: Sham-OP (Laminektomie); Versuchstiere: Ratten, Stamm Sprague-Dawley, n=5; Explantation der Proben nach 4 Wochen (n=20); VGM: Vordergliedmaße (n=10); HGM: Hintergliedmaße (n=10); Parameter: Tb. N pro mm (Anzahl der Trabekel), Tb. Th in mm (Durchmesser der Trabekel), Tb. Sp in mm (Abstand der Trabekel voneinander); Signifikanz: \* = p < 0,05, \*\* = p < 0,01.

### 4.3.5 Histologische Untersuchung

#### 4.3.5.1 Deskriptive Histologie

Alle Implantate konnten lokalisiert werden, so dass von jedem Tier (5 Tiere je Gruppe) vier Proben, zwei an der Vordergliedmaße und zwei an der Hintergliedmaße, entnommen werden konnten. Es wurden insgesamt also 40 Knochenneubildungen unterschiedlicher Größe mit umgebender Muskulatur histologisch in zwei Ebenen untersucht (E1 und E2, Mindestabstand 50  $\mu\text{m}$ , Färbung Giemsa, HE und Immunhistologie (CD68)). Beide Ebenen befanden sich in der Mitte der Knochenneubildung, um einen möglichst großen Durchmesser zu erhalten. Da deshalb zwischen den Ebenen keine wesentlichen Unterschiede beobachtet werden konnten, erfolgt die Beschreibung für beide Ebenen gemeinsam.

In allen Proben der Gruppe ASCI und der Gruppe Kontrolle konnte eine heterotope Knochenneubildung innerhalb der Muskulatur festgestellt werden. Sie bestand aus einem rundlichen Ossikel mit einer Kortikalis-ähnlichen, kompakteren Randzone und intramedullärem Knochenmark. Es konnten weniger dichte und kompaktere Ossikel in Bezug auf ihre Knochenmatrix unterschieden werden (Abbildung 4-19).

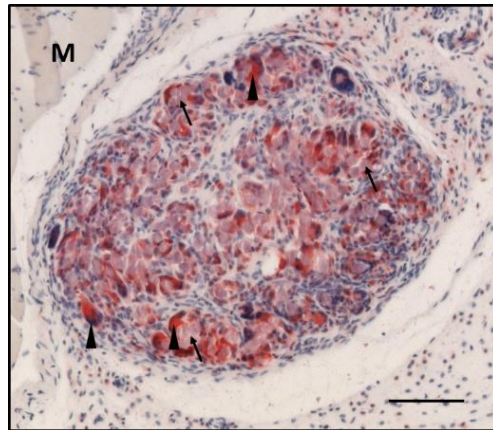


**Abbildung 4-19: Histologie: Beispiel unterschiedlich dichter Ossikel**

a) Tier 5 Gruppe ASCI, Hintergliedmaße; b) Tier 5 Gruppe Kontrolle, Vordergliedmaße; M: Muskulatur. Obj. x 10, Maßstabsbalken 500  $\mu\text{m}$ , Giemsa.

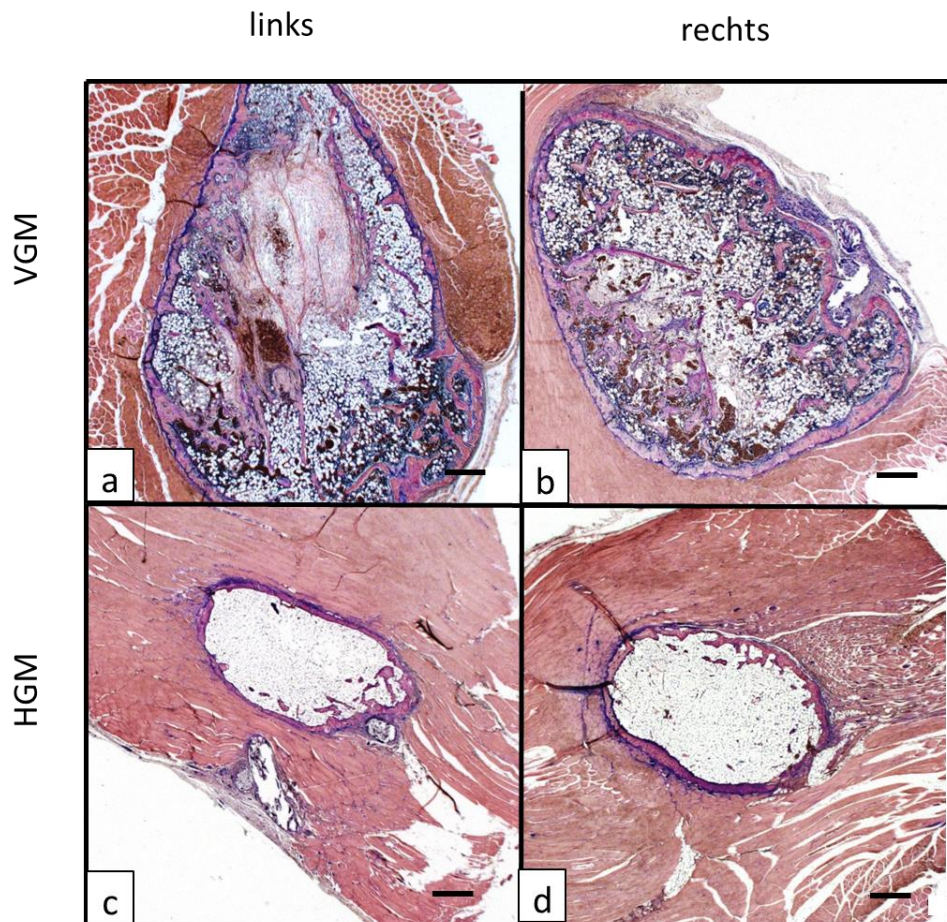
Alle Ossikel waren von einer Bindegewebsschicht unterschiedlicher Dicke umhüllt und in der umgebenden Muskulatur waren Anzeichen von Muskelregeneration und vereinzelte Mastzellen zu erkennen. Entzündungsanzeichen oder abbauende Riesenzellen um den neugebildeten Knochen als Reaktion auf das Implantat waren nicht zu erkennen, jedoch zahlreiche mehrkernige Riesenzellen um die Reste der Operationsfäden (Abbildung 4-20).





**Abbildung 4-20: Fremdkörperriesenzellen**

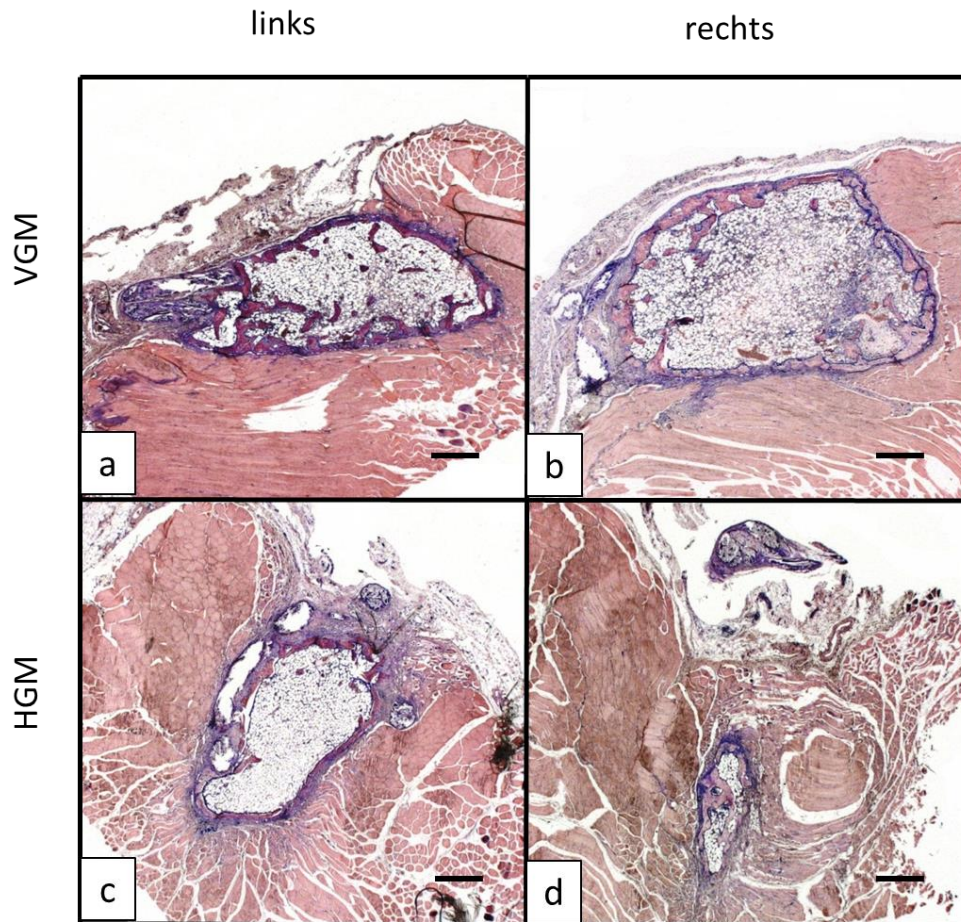
Gruppe Kontrolle Tier 1 vorne links; M: Muskulatur; Pfeilspitzen: mehrkernige Fremdkörperriesenzellen; Pfeile: Fadenreste. Obj. x 10; Maßstabsbalken 100  $\mu$ m; anti-Maus CD68 (Fast Red), Avidin-Biotin-Komplex-Alkalische Phosphatase (ABC-AP), Hämalaun Gegenfärbung.



**Abbildung 4-21: Histologie: Querschnitte der HO - Gruppe ASCI**

Tier 3 aus Gruppe ASCI, **a**) Vordergliedmaße (VGM) links, **b**) VGM rechts, **c**) Hintergliedmaße (HGM) rechts, **d**) HGM links. Muskel an der VGM: M. triceps brachii, Muskel an der HGM: M. semitendinosus. Obj. x 1,25; Maßstabsbalken 500  $\mu$ m; Giemsa.

Die schmale Bindegewebsschicht um die Ossikel hatte Kontakt zu direkt anliegenden oder entfernteren bindegewebigen Anteilen des Muskels. In Abbildung 4-21 und Abbildung 4-22 sind beispielhaft für jede Gruppe zentrale Querschnitte der Knochenneubildungen eines Tieres dargestellt.



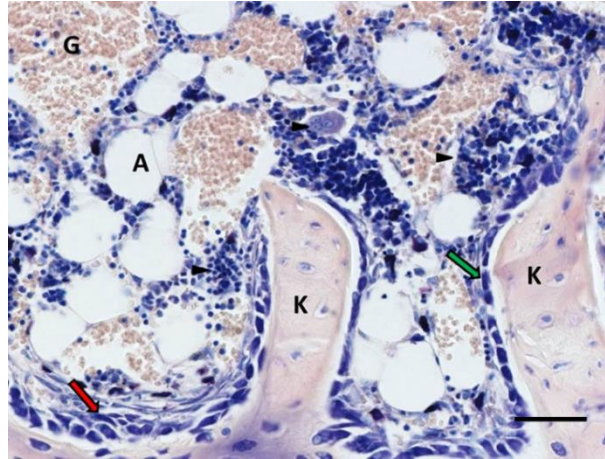
**Abbildung 4-22: Histologie: Querschnitte der HO - Gruppe Kontrolle**

Tier 3 aus der Gruppe Kontrolle, **a)** Vordergliedmaße (VGM) links; **b)** VGM rechts; **c)** Hintergliedmaße (HGM) rechts; **d)** HGM links. Obj. x 1,25; Maßstabsbalken 500  $\mu$ m; Giemsa.

Es ließen sich alle typischen Knochenzellen differenzieren: Osteoblasten, sowohl ruhend als auch aktiv (Abbildung 4-23), Osteozyten und Osteoklasten. Das Knochenmark bestand zu unterschiedlichen Teilen aus Fettmark und reich durchblutetem, hämatopoietisch aktivem Knochenmark mit Granulopoese, Erythropoese und Thrombopoese (Abbildung 4-23). Hämatopoetisches Knochenmark war in der Kontrollgruppe an der VGM bei 9 von 10 Tieren und an der HGM bei 6 von 10 Tieren vorhanden. In der ASCI-Gruppe war die Verteilung mit 10 von 10 Tieren an der VGM und 5 von 10 Tieren an der HGM ähnlich ausgeprägt. Knochenauf- und abbauprozesse (Remodeling), charakterisiert durch die Menge an aktiven

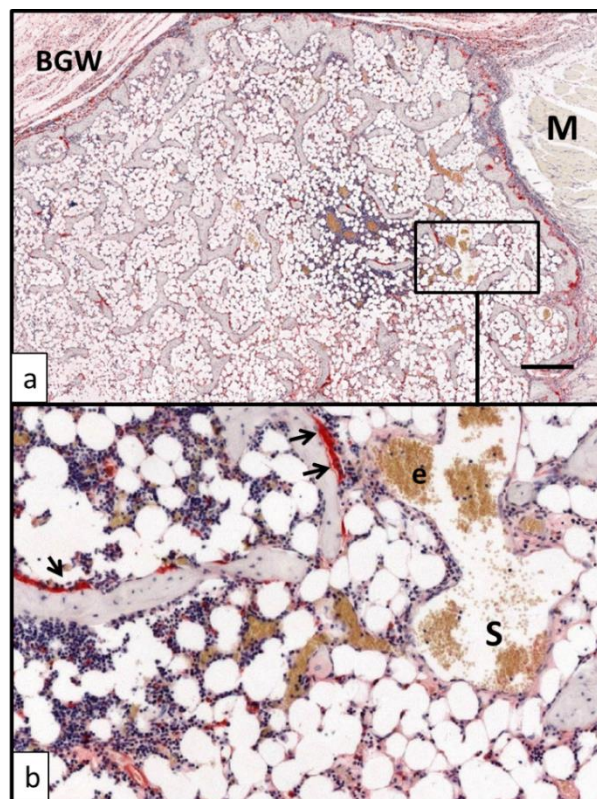


Osteoblasten und Osteoklasten (Abbildung 4-24), waren in größeren Knochenneubildungen häufiger zu sehen. Knorpelgewebe oder knorpelähnliche Zellen konnten in keiner Probe beobachtet werden. Auch war der Kollagenträger nicht mehr zu identifizieren.



**Abbildung 4-23: Histologie: Hämatopoetisches Knochenmark und Osteoblasten**

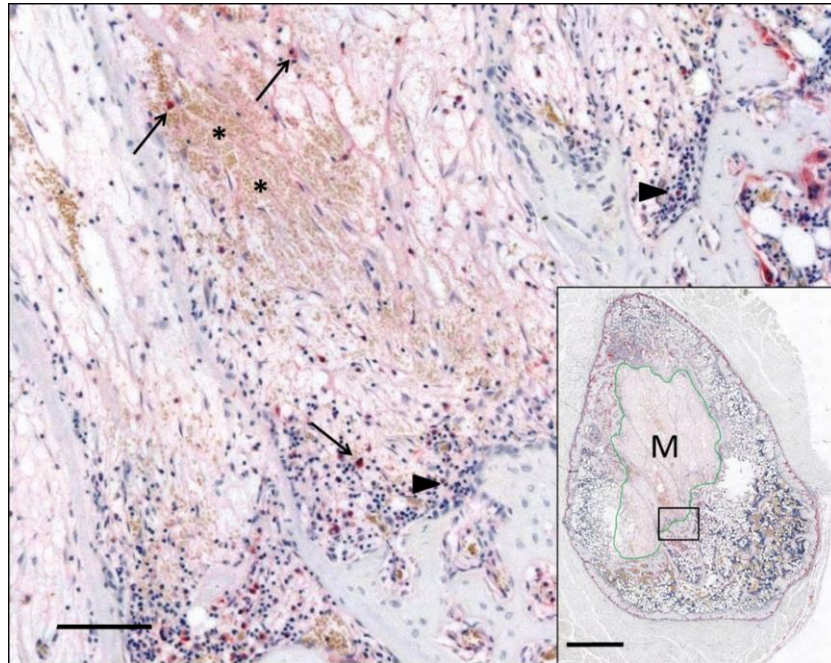
K: Knochenbälkchen; A: Adipozyt; G: Gefäß; Pfeilspitze: Zellen der Thrombopoese und Erythropoese; Pfeil grün: Osteoblasten ruhend (Deckzellen); Pfeil rot: Osteoblasten aktiv. Obj. x 20; Maßstabsbalken 50 µm; Giemsa.



**Abbildung 4-24: Immunhistologie (CD68): Knochenmark mit Osteoklasten**

a) Tier 2 Gruppe ASCI an der VGM; b) Ausschnitt aus a; S: Knochenmarksinus; Pfeile: Osteoklasten; BGW: Bindegewebe, M: Muskulatur; e: Erythrozyten. Maßstabsbalken 500 µm; anti-Maus CD68 (*Fast Red*), ABC-AP, Hämalaun Gegenfärbung.

In 11 Proben befand sich eine reich durchblutete bindegewebsreiche Struktur innerhalb des Knochens, die einem Frakturkallus ähnelte. Da die Vermutung nahe lag, es könnte sich um Mikrofrakturen innerhalb des neugebildeten Knochens handeln, wurde diese Struktur der Einfachheit halber in vorliegender Arbeit als „Mikrokallus“ bezeichnet. Das Bindegewebe beinhaltete viele Entzündungszellen in Form von Lymphozytenansammlungen und CD68-positiven Zellen (Abbildung 4-25).



**Abbildung 4-25: Immunhistologie: Ausschnitt Mikrokallus**

Tier 3 Gruppe ASCI. \*: Blutung; Pfeile: CD68-positive Zellen; Pfeilspitzen: Lymphozytenansammlung; M: Mikrokallus. Obj. 10 x, Maßstabsbalken 100  $\mu$ m; Inlay: Maßstabsbalken 1000  $\mu$ m; anti-Maus CD68 (*Fast Red*), ABC-AP, Hämalaun Gegenfärbung.

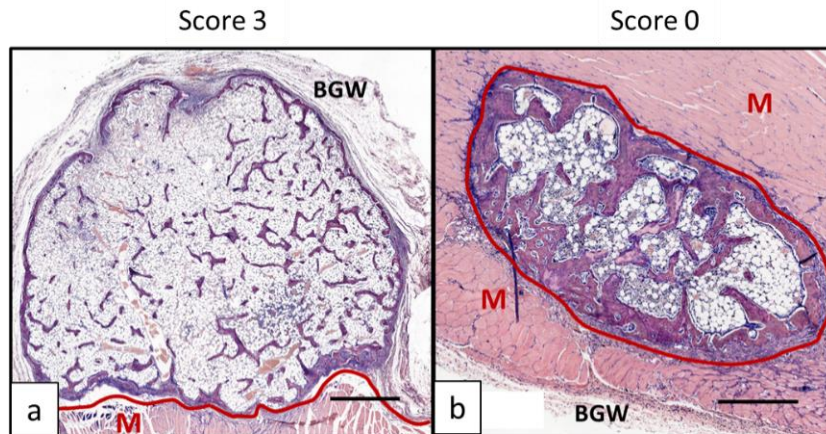
#### 4.3.5.2 Lichtmikroskopische semiquantitative Auswertung

Um den heterotopen Knochen weiter charakterisieren zu können und eventuelle Unterschiede zwischen den Gruppen ASCI und Kontrolle zu finden, wurde ein semiquantitativer Score für die histologische Auswertung in Anlehnung an Publikationen von Luca et al. (2010, 2011) angewandt. Die Parameter 1-4 wurden eigens für diese Arbeit ergänzt.

Parameter 1 (BGW) sollte die Lage des neugebildeten Knochens im Muskel und den Kontakt zu bindegewebigen Strukturen charakterisieren. Parameter 2 (KM) stellte die „Dichte“ des Knochens dar, als Vergleich zur Mikro-CT-Auswertung des Parameters BV/TV, welche Osteoid nicht mit einbeziehen konnte.

Die Auswertung erfolgte an Giemsa-gefärbten, HE-gefärbten und immunhistologischen Schnitten (AK: CD68). Anhand einer Skala von 0-3 (0=kein/nicht vorhanden, 1=gering, 2=mittelgradig, 3=hochgradig) wurden folgende Parameter beurteilt:

- 1) Kontakt der Knochenneubildung mit bindegewebigen Anteilen des Muskels (BGW); Beispiel für BGW Score 3 in Abbildung 4-26, a. Beispiel für BGW Score 0 (kein direkter Kontakt) Abbildung 4-26, b



**Abbildung 4-26: Histologie: Beispiele für Parameter 6 (BGW-Kontakt)**

**a)** BGW Score 3 (hochgradiger direkter Kontakt zu bindegewebigen Strukturen) und **b)** BGW Score 0 (kein direkter Kontakt zu bindegewebigen Strukturen); **a)** Maßstabsbalken 1000  $\mu$ m; **b)** Maßstabsbalken 500  $\mu$ m; rote Linie: Kontaktfläche mit Muskulatur; M: Muskulatur, BGW: Bindegewebe; Giemsa.

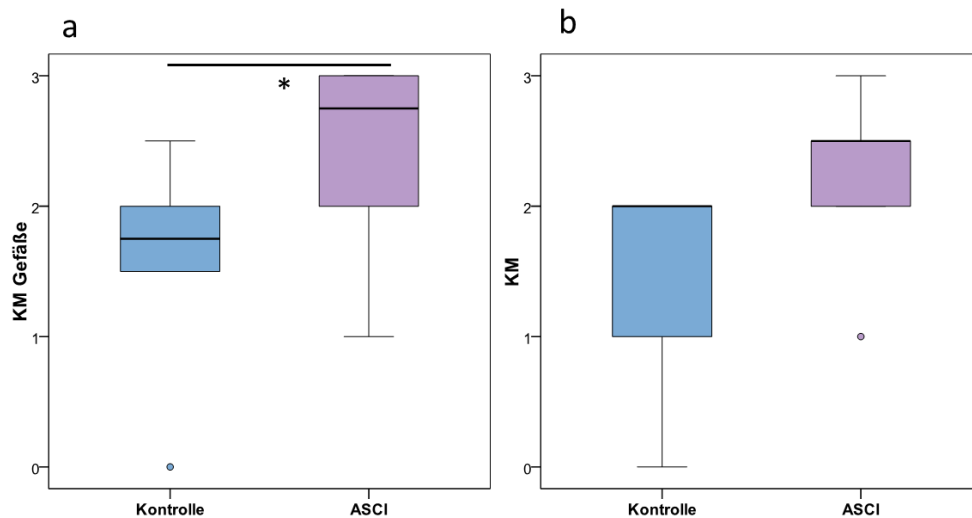
- 2) Anteil des Markraumes (Knochenmark inklusive bindegewebige Strukturen) im Verhältnis zu Knochen (Knochen trabekel und Kortikalis) (KM); Beispiel: KM Score 2 = 2:1 Verhältnis von Markraum zu Knochenmatrix; Beispiel für KM Score 3 Abbildung 4-21, c und d
- 3) Bindegewebe innerhalb des Knochens, ähnlich einem Frakturkallus (Mikrokallus); Score 1-3 charakterisieren die Größe des Mikrokallus; Beispiel: Abbildung 4-25 Inlay, Mikrokallus Score 2
- 4) Menge der CD68-positiven Zellen ohne Berücksichtigung der mehrkernigen Zellen (CD68+)
- 5) Menge an Gefäßen im Knochenmark (Knochenmarks sinus) (KM-Gefäße)
- 6) Anteil des hämatopoietisch aktiven Knochenmarks am Gesamtknochenmark (negative Korrelation zu Adipozytenmenge) (HKM).

Signifikante Unterschiede in der semiquantitativen Auswertung zwischen den Gruppen ASCI und Kontrolle gab es an der Vordergliedmaße nur für den Parameter KM-Gefäße (Abbildung 4-27). Es konnten signifikant mehr KM-Gefäße in der Gruppe ASCI festgestellt werden (\*  $p = 0,024$ ). Weiterhin zeigten sich Trends mit  $p = 0,057$  für den Parameter KM (Abbildung 4-27) und mit  $p = 0,103$  für den Parameter HKM. Beide waren in der Gruppe ASCI an der



VGM erhöht im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Parameter Mikrokallus, CD68-positive Zellen und BGW-Kontakt zeigten keine signifikanten Unterschiede. Der fehlende Unterschied im BGW-Kontakt zeigte, dass die Lokalisation des Implantates innerhalb des Muskels nicht für den Größenunterschied der Knochenneubildung an der VGM verantwortlich sein konnte.

An der Hintergliedmaße gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen ASCI und Kontrolle.



**Abbildung 4-27: Semiquantitative Auswertung der Histologie**

**a)** Parameter Knochenmark (KM)-Gefäße; Kontrolle vs. ASCI an der VGM; \*  $p = 0,024$ ; **b)** Parameter Knochenmark (KM); Kontrolle vs. ASCI an der VGM;  $p = 0,057$ .

*Box and Whisker Plot:* Länge der Box: Interquartilsabstand (IQR), obere Begrenzung: oberes Quartil (75 %), untere Begrenzung: unteres Quartil (25 %); Median: horizontale Linie in der Box; Antennen: minimaler und maximaler Wert bis zu einer Länge des 1,5-fachen IQR; Ausreißer (1,5- 3-fache des IQR): Kreise; Länge des gesamten Boxplots (inklusive Ausreißer): Spannweite; Signifikanz: \* =  $p < 0,05$ .

Innerhalb der Gruppen ASCI und Kontrolle gab es in 3 Parametern signifikante Unterschiede zwischen der VGM und der HGM. Die Parameter Mikrokallus (Gruppe ASCI: \*  $p = 0,045$  und in der Gruppe Kontrolle: \*  $p = 0,031$ ), KM-Gefäße (ASCI: \*\*  $p = 0,007$ ; Kontrolle:  $p = 0,01$  (Trend)) und der Parameter HKM (ASCI: \*\*  $p = 0,011$ ; Kontrolle: \*\*  $p = 0,012$ ) waren an der Vorderextremität signifikant höher als hinten (Tabelle 4-7). In der Gruppe Kontrolle gab es vorne zusätzlich signifikant mehr CD68-positive Zellen (\*  $p = 0,037$ ). In der Gruppe ASCI zeigte sich auch ein Trend zu einer erhöhten Menge CD68-positiver Zellen an der VGM ( $p = 0,121$ ).

Die Mediane und Maxima/Minima für alle Parameter und Gruppen sind in Tabelle 4-7 dargestellt. Die Ergebnisse zeigten, dass sich die Mikrofrakturen fast ausschließlich an der Vordergliedmaße ereigneten und somit eine Verbindung zur Größe des Ossikels zu bestehen

schien. Gleichzeitig ließ sich so auch die erhöhte Anzahl der CD68-positiven Zellen an der VGM erklären, da diese ja in den Mikrokallusbereichen vermehrt anzutreffen waren. Sowohl die KM-Gefäße als auch die Menge des HKM stiegen proportional zur Größe der Knochenneubildungen.

**Tabelle 4-7: Semiquantitative lichtmikroskopische Auswertung**

Kontrolle						
	BGW-Kontakt	KM	Mikro-kallus	CD68+	KM-Gefäße	HKM
Median VGM	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>0,75 *</b>	<b>1,5 *</b>	<b>1,75</b>	<b>2 **</b>
Maximum	2	2	2	2,5	2,5	2,5
Minimum	0	0	0	0,5	0	0
Median HGM	<b>1</b>	<b>1,25</b>	<b>0 *</b>	<b>1 *</b>	<b>0,5</b>	<b>0,5 **</b>
Maximum	1	3	0,5	1,5	2	1,5
Minimum	0	0	0	0	0	0

ASCI						
	BGW-Kontakt	KM	Mikro-kallus	CD68+	KM-Gefäße	HKM
Median VGM	<b>1</b>	<b>2,5</b>	<b>0,75 *</b>	<b>2</b>	<b>2,75 **</b>	<b>2,25 **</b>
Maximum	3	3	3	3	3	3
Minimum	0	1	0	0	1	1
Median HGM	<b>0</b>	<b>2,5</b>	<b>0 *</b>	<b>1,5</b>	<b>0,75 **</b>	<b>0,25 **</b>
Maximum	2	3	1	3	1	1,5
Minimum	0	0	0	0	0	0

Semiquantitative Beurteilung anhand 6 Parametern mit einer Skala von 0-3:

0=keine/nicht vorhanden, 1=gering; 2=mittelgradig; 3=hochgradig;

1. Lokalisation des Knochens im Muskel (Kontakt zu bindegewebigen Anteilen im Muskelgewebe, Abkürzung: BGW-Kontakt)

2. Anteil des Markraumes (Knochenmark und bindegewebige Anteile im Knochengewebe) im Verhältnis zur Knochenmatrix („Dichte des Knochens“, Abkürzung KM)

3. Bindegewebige Anteile innerhalb des Knochens (Abkürzung Mikrokallus)

4. Menge an CD68-positiven mononukleären Zellen (Abkürzung CD68+)

5. Vorhandene Gefäße (Sinus) im Knochenmark (Abkürzung KM-Gefäße)

6. Menge an hämatopoetisch aktivem Knochenmark (Abkürzung HKM)

VGM: Vordergliedmaße; HGM: Hintergliedmaße; Signifikanz: \* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,01$ ;  $p = 0,1$  Trend.

#### 4.3.6 Biochemische Marker

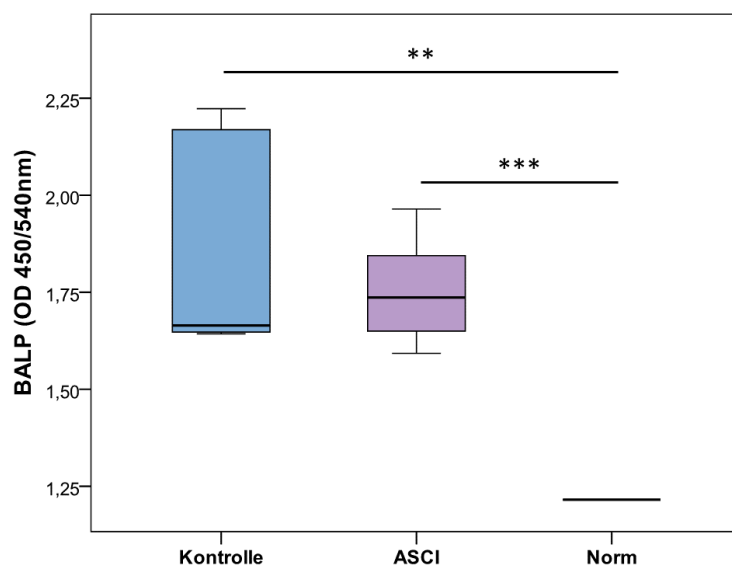
Um zusätzliche Informationen über den Knochenstoffwechsel und zirkulierende Wachstumsfaktoren zu gewinnen, wurden im Plasma der Versuchstiere für diese Studie relevante Faktoren bestimmt. Dazu wurden *post mortem* Plasmaproben von 3 Versuchsgruppen genommen und vergleichend mittels eines ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*) untersucht. Die Gruppe ASCI umfasste alle Tiere der Hauptstudie mit einem spinalen Trauma und einer heterotopen Implantation (ASCI). Die Gruppe Kontrolle beinhaltete alle Kontrolltiere der Hauptstudie. An ihnen wurden eine Laminektomie und eine heterotope Implantation

durchgeführt (Kontrolle). Die dritte Gruppe wurde aus den Kontrolltieren der Vorstudie gebildet. An ihnen wurde nur eine Kontrollimplantation von einem Kollagenschwamm ohne Wachstumsfaktor vorgenommen (Norm).

#### 4.3.6.1 Knochenspezifische alkalische Phosphatase (BALP)

Der Gehalt an knochenspezifischer alkalischer Phosphatase (*bone-specific alkaline phosphatase* (BALP)) wurde untersucht, um die Knochenbildungsaktivität der Osteoblasten innerhalb der Gruppen zu vergleichen.

Zwischen den Gruppen ASCI und Kontrolle gab es keine signifikanten Unterschiede bezüglich des im Plasma bestimmten Gehaltes an BALP (Abbildung 4-28). Leider hatten wir nur einen Wert für die Normgruppe zur Verfügung, daher erfolgte der statistische Vergleich mit dem Normwert mithilfe eines *t-tests* mit einer Stichprobe. Gegenüber dem Normwert waren die Werte beider Gruppen signifikant erhöht (ASCI vs. Norm \*\*\*  $p = 0,001$ ; Kontrolle vs. Norm \*\*  $p = 0,008$ ).



**Abbildung 4-28: ELISA: Auswertung Marker BALP**

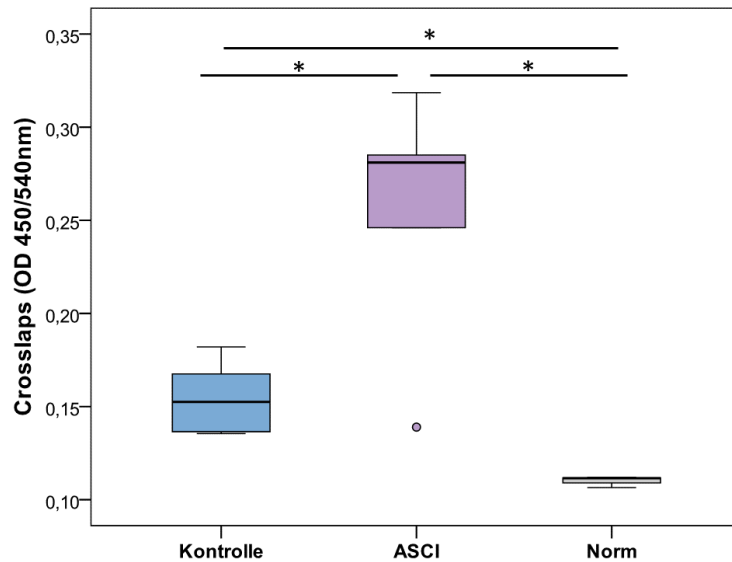
Messung der optischen Dichte (OD) in Plasmaproben mittels ELISA (450 nm, Referenzwellenlänge 540 nm); HS: Hauptstudie; Norm: Pilotstudie Gruppe Kontrolle; HS Kontrolle:  $n=5$ ; HS ASCI:  $n=5$ ; Norm  $n=1$ . *Box and Whisker Plot*: Länge der Box: Interquartilsabstand (IQR), obere Begrenzung: oberes Quartil (75 %), untere Begrenzung: unteres Quartil (25 %); Median: horizontale Linie in der Box; Antennen: minimaler und maximaler Wert bis zu einer Länge des 1,5-fachen IQR; Ausreißer; Länge des gesamten Boxplots: Spannweite; Signifikanz: \*\* =  $p < 0,01$  und \*\*\* =  $p < 0,001$ .

#### 4.3.6.2 Crosslaps

Um auch Informationen über die Abbauvorgänge durch Osteoklasten zu gewinnen, wurde als Knochenresorptionsmarker das C-terminale Telopeptid des Typ 1 Kollagens (synonyme



Bezeichnung: *Crosslaps*) bestimmt. Die Plasmawerte für *Crosslaps* unterschieden sich zum Untersuchungszeitpunkt signifikant in allen 3 Gruppen (Kontrolle vs. ASCI \*  $p = 0,047$ ; Kontrolle vs. Norm \*  $p = 0,025$ ; ASCI vs. Norm \*  $p = 0,025$ ). Die höchsten Gehalte konnten wir in der Gruppe ASCI feststellen, gefolgt von der Kontrolle und der Norm (Abbildung 4-29).



**Abbildung 4-29: ELISA: Auswertung Marker Crosslaps**

Messung der optischen Dichte (OD) in Plasmaproben mittels ELISA (450 nm, Referenz 540 nm); HS: Hauptstudie; Norm: Pilotstudie Gruppe Kontrolle; HS Kontrolle:  $n=5$ ; HS ASCI:  $n=5$ ; Norm:  $n=3$ .

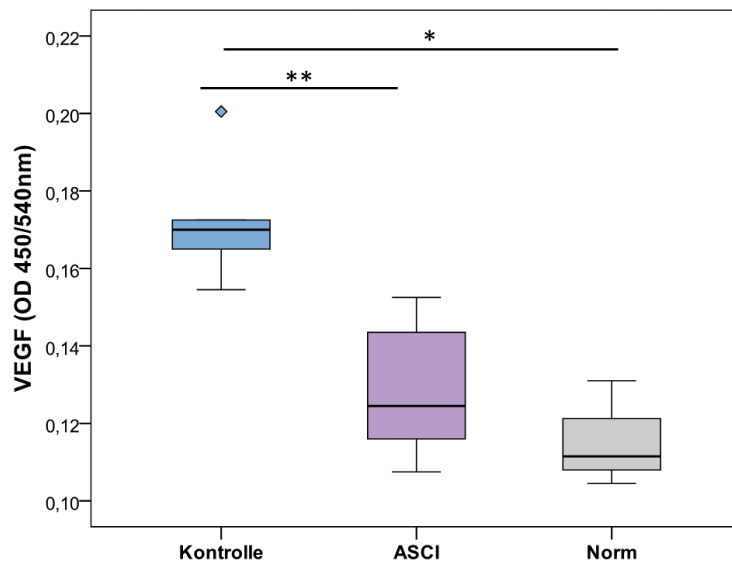
*Box and Whisker Plot*: Länge der Box: Interquartilsabstand (IQR), obere Begrenzung: oberes Quartil (75 %), untere Begrenzung: unteres Quartil (25 %); Median: horizontale Linie in der Box; Antennen: minimaler und maximaler Wert bis zu einer Länge des 1,5-fachen IQR; Ausreißer (1,5- 3-fache des IQR): Kreise; Länge des gesamten Boxplots (inklusive Ausreißer): Spannweite; Signifikanz: \* =  $p < 0,05$ .

#### 4.3.6.3 VEGF

Der Wachstumsfaktor VEGF (*vascular endothelial growth factor*) spielt eine wichtige Rolle in der Gefäßausbildung. Er wurde in dieser Studie bestimmt, da Gefäß- und Knochenentwicklung in engem Zusammenhang stehen.

Die Plasmawerte für VEGF waren in der Gruppe Kontrolle signifikant höher als in den Gruppen ASCI und Norm (Kontrolle vs. ASCI: \*\*  $p = 0,009$ ; Kontrolle vs. Norm: \*  $p = 0,025$ ).

Die Gruppen ASCI und Norm unterschieden sich nicht signifikant ( $p = 0,297$ ) (Abbildung 4-30).



**Abbildung 4-30: ELISA: Auswertung Marker VEGF**

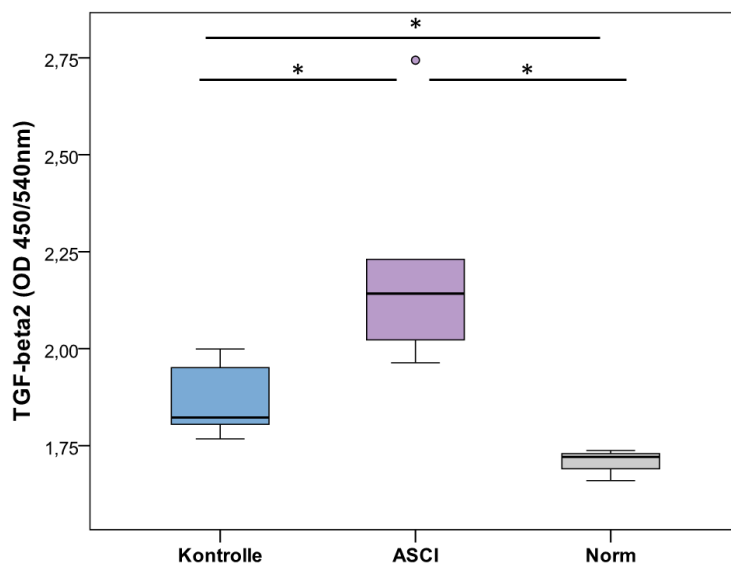
Messung der optischen Dichte (OD) in Plasmaproben mittels ELISA (450 nm, Referenz 540 nm); HS: Hauptstudie; Norm: Pilotstudie Gruppe Kontrolle; HS Kontrolle: n=5; HS ASCI: n=5; Norm: n=3.

*Box and Whisker Plot*: Länge der Box: Interquartilsabstand (IQR), obere Begrenzung: oberes Quartil (75 %), untere Begrenzung: unteres Quartil (25 %); Median: horizontale Linie in der Box; Antennen: minimaler und maximaler Wert bis zu einer Länge des 1,5-fachen IQR; Extremwert (>3-fache des IQR): Raute; Länge des gesamten Boxplots: Spannweite; Signifikanz: \* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,01$ .

#### 4.3.6.4 TGF- $\beta$ 2

TGF- $\beta$  (*transforming growth factor-beta*) ist einer der vielen Wachstumsfaktoren, die bei der Knochenentwicklung eine Rolle spielen. Er wurde für diese Studie ausgewählt, da er mehrfach mit der heterotopen Ossifikation in Verbindung gebracht wurde.

Auch bei dem Wachstumsfaktor TGF- $\beta$ 2 unterschieden sich die Plasmawerte unter allen 3 Gruppen signifikant (Kontrolle vs. ASCI: \*  $p = 0,016$ ; Kontrolle vs. Norm: \*  $p = 0,025$ ; ASCI vs. Norm: \*  $p = 0,025$ ). Am höchsten war der Wert in der Gruppe ASCI, gefolgt von der Gruppe Kontrolle. Am niedrigsten war der Gehalt an TGF- $\beta$ 2 in der Gruppe Norm (Abbildung 4-31).



**Abbildung 4-31: ELISA: Auswertung Marker TGF- $\beta$ 2**

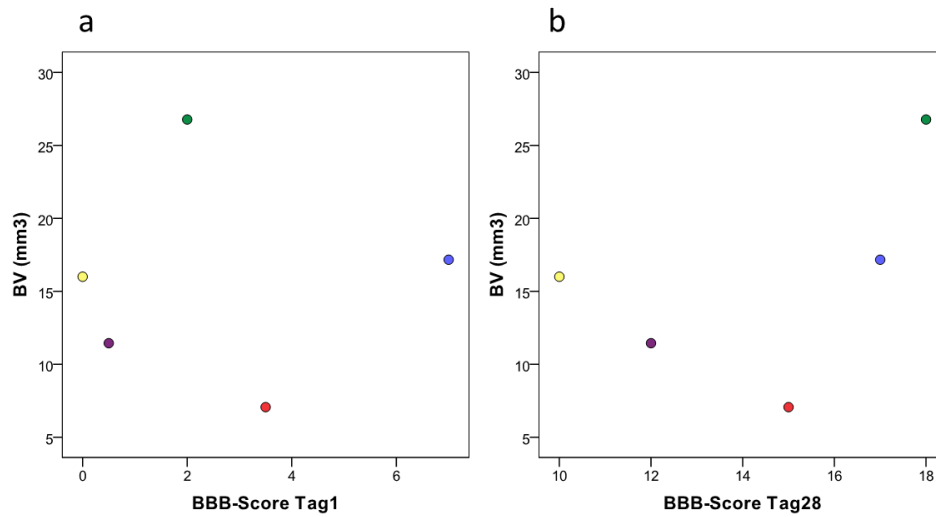
Messung der optischen Dichte (OD) in Plasmaproben mittels ELISA (450 nm, Referenz 540 nm); HS: Hauptstudie; Norm: Pilotstudie Gruppe Kontrolle; HS Kontrolle: n=5; HS ASCI: n=5; Norm: n=3.

*Box and Whisker Plot*: Länge der Box: Interquartilsabstand (IQR), obere Begrenzung: oberes Quartil (75 %), untere Begrenzung: unteres Quartil (25 %); Median: horizontale Linie in der Box; Antennen: minimaler und maximaler Wert bis zu einer Länge des 1,5-fachen IQR; Ausreißer (1,5- 3-fache des IQR): Kreise; Länge des gesamten Boxplots (inklusive Ausreißer): Spannweite; Signifikanz: \* =  $p < 0,05$ .

#### 4.3.7 Statistische Korrelationen

##### 4.3.7.1 Korrelation zwischen Knochenvolumen und BBB-Score

Mithilfe des Korrelationskoeffizienten nach Spearman für nichtparametrische Korrelationen konnte kein Zusammenhang zwischen dem Knochenvolumen (BV) und dem BBB-Score (Klassifizierung der Rückenmarkschädigung) sowohl an Tag 1 als auch an Tag 28 festgestellt werden ( $p = 0,873$  und  $p = 0,285$ ) (Abbildung 4-32).



**Abbildung 4-32: Korrelationen zwischen BV und BBB-Score**

**a)** Korrelation zwischen BV und BBB-Score an Tag 1; **b)** Korrelation zwischen BV und BBB-Score an Tag 28; gelb: Tier 2, lila: Tier 4, grün: Tier 3, rot: Tier 5, blau: Tier 1. BV: Knochenvolumen (*bone volume*).

## 5 Diskussion

Heterotope Ossifikationen (HO) an Gelenken können als schwerwiegende Folgeerscheinungen eines spinalen Traumas auftreten. Die genaue Pathogenese dieses Phänomens ist bis heute unbekannt.

Ziel dieser Studie war es, ein Tiermodell zu etablieren, an dem kausale Faktoren für das Auftreten von heterotopen Ossifikationen nach akutem spinalem Trauma identifiziert werden können. Ein geeignetes Modell für die Hauptstudie musste zuvor in Vorstudien (Pilotstudie und zwei Dosisfindungsstudien) erarbeitet werden.

### 5.1 Pilotstudie: Modellfindung

In der Literatur wurde beschrieben, dass sich die Tierarten in ihrer Empfänglichkeit für ektope Knochenbildung in der Muskulatur erheblich unterscheiden (Feldman, 1986). Das Kaninchen zeigte sich unter mehreren untersuchten Spezies als empfänglichste Tierart für BMP(*bone morphogenetic protein*)- und mechanisch induzierte ektope Ossifikationen, die Maus dagegen am wenigsten empfänglich (Feldman, 1986; Kan und Kessler, 2011). Das könnte mitunter ein Grund dafür sein, dass für Knochenstudien und Studien der HO häufig Kaninchen verwendet wurden (Hollinger et al., 1998a; Schneider et al., 1998; Kroese-Deutman et al., 2005; Rumi et al., 2005; Bartlett et al., 2006; Pearce et al., 2007; Bouxsein et al., 2010; Luca et al., 2011; Tannous et al., 2013).

Untersuchungen neurologischer Erkrankungen wurden dagegen am häufigsten an Ratte und Maus durchgeführt und zahlreiche Modelle des akuten spinalen Traumas etabliert (Gruner, 1992; Stokes, 1992; Khan et al., 1999). Auch in unserem Hause wurden bereits Studien eines spinalen Traumas an Ratten durchgeführt und nach eigenen Erfahrungen stellte sich als großer Vorteil heraus, dass viele Komplikationen eines spinalen Traumas beim Menschen bei den Ratten nicht auftraten, wie z.B. Thrombosen, Druckstellen oder Kreislaufdysbalancen. Bei Kaninchen zeigten sich dagegen in vergangenen Publikationen in Rückenmarkstudien einige Komplikationen. Sie entwickelten unter anderem Druckstellen und Infektionen (Izumi, 1983). Daher haben wir uns für die Ratte als Modelltier entschieden. Der Stamm Sprague-Dawley als Auszuchtstamm wurde bewusst gewählt, um eine Heterogenität zu erreichen und damit der Situation beim Menschen näher zu kommen. Der Stamm hat sich in vorherigen Publikationen sowohl in experimentellen Studien der Paraplegiologie (Khan et al., 1999; Fischer and Peduzzi,

2007) als auch in experimentellen Untersuchungen ektopter Ossifikationen bewährt (Fleet et al., 1996; Kübler et al., 1999; Klammert et al., 2009; Luca et al., 2010, 2011).

Obwohl männliche Tiere häufig für Knochenstudien verwendet wurden (Yoshida et al., 1998; Uludag et al., 1999; Luca et al., 2010), hauptsächlich um die hormonellen Schwankungen des weiblichen Zyklus zu umgehen, fiel für diese Studie die Entscheidung auf weibliche Tiere. Bei weiblichen Ratten gestaltet sich die manuelle Blasenentleerung einfacher (Khan et al., 1999) und nach eigenen Erfahrungen ist auch die Gruppenhaltung unproblematischer. Obwohl spinale Traumata beim Menschen häufiger bei Männern auftreten, konnte den meisten Autoren zufolge kein Zusammenhang mit dem Geschlecht festgestellt werden (Scher, 1976; Knudsen et al., 1982; Lal et al., 1989).

### **5.1.1 Modell der erworbenen HO**

Die Schwierigkeit in der Modellfindung für die erworbene HO liegt nach Kan und Kessler darin, dass bisher keine Modelle auf der Basis zugrundeliegender Mechanismen entwickelt wurden, da diese noch immer weitgehend unbekannt sind (Kan und Kessler, 2011). In einer Publikation von Kan und Kessler (2011) wurden sechs momentan verfügbare Tiermodelle beschrieben, die eine typische HO produzieren können (siehe Literaturübersicht 2.4). Zwei dieser Modelle kamen für vorliegende Fragestellung und Tierart in Frage: die heterotope Implantation (chirurgische Implantation einer BMP-haltigen Matrix an ektopten Stellen) oder ein Trauma-induziertes Modell. In der vorliegenden Arbeit gelang es in der Pilotstudie nicht, eine HO allein durch traumatische Inzision in die Muskulatur in Kombination mit einem spinalen Trauma auszulösen. Diese Ergebnisse stimmen mit Bemühungen anderer Arbeitsgruppen überein, denen es bislang auch nur begrenzt gelungen ist, ein Trauma-induziertes Modell zu etablieren (Kan und Kessler, 2011). Zaccalini und Urist (1964) scheiterten bei dem Versuch in der Oberschenkelmuskulatur des Kaninchens eine HO durch stumpfes Trauma zu induzieren. Ebenso berichteten Walton und Rothwell (1983) über einen begrenzten Erfolg bei der Induktion einer HO im Oberschenkel von Schafen mithilfe von stumpfer Gewalt. Aufgrund dieser Berichte und der eigenen Erfahrungen in der Pilotstudie schien ein rein Trauma-induziertes Modell nicht geeignet zu sein, um es in dieser Studie zu verwenden. Daher wurde eine Methode gewählt, bei der sichergestellt war, dass jedes Tier eine HO ausbildete und die Tierzahlen so gering wie möglich gehalten werden konnten.

Das Modell der heterotopen Implantation wurde von Kan und Kessler (2011) als unkompliziert, reproduzierbar und relevant zur HO beim Menschen beschrieben. Man muss jedoch beachten, dass es sich um ein künstliches System handelt, bei dem unphysiologisch hohe Werte

osteogener Faktoren angewandt werden, die so im menschlichen Organismus nicht vorkommen (Kan und Kessler, 2011). Das heterotope Implantationsmodell allein angewandt hat den Nachteil, dass es sich um ein lokales Ereignis handelt, das eingeschränkt geeignet ist, um ein Zusammenspiel multipler Systeme zu simulieren (Kan und Kessler, 2011). In der vorliegenden Arbeit wurde versucht mit der Kombination des Modells mit einem spinalen Trauma, der Voraussetzung eines Zusammenspiels multipler Faktoren näher zu kommen.

### **Lokalisation der heterotopen Implantation**

Heterotope Ossifikationen werden am häufigsten in großen, gemischten paraartikulären Muskelregionen der Gliedmaßen beobachtet, wie z.B. um Hüfte, Ellbogen und Schulter (Feldman, 1986; Shehab et al., 2002; Leblanc et al., 2011). Diese Tatsache diente bei der Wahl der geeigneten Implantationsstellen als Orientierung und es wurde jeweils ein großer Muskel in der Nähe des Ellbogengelenks und des Hüftgelenks gewählt. An der Vordergliedmaße fiel die Entscheidung auf den *Musculus (M.) triceps brachii*, da in eigenen Vorstudien eine gute Ossifikationsfähigkeit festgestellt werden konnte und die Implantation von den Tieren sehr gut toleriert wurde. Es wurde keine Beeinträchtigung des Gangbildes und keine Automutilation bei den Tieren beobachtet. In der Literaturrecherche wurde keine Arbeitsgruppe gefunden, die diesen Muskel bisher zur ektopen Knochenbildung bei der Ratte verwendet hat.

Unterschiedlichste Lokalisationen wurden im Schrifttum für heterotope Implantationen in Kombination mit BMP-2 bei Nagern beschrieben. Dazu gehörten u.a. der *M. tibialis anterior* (Leblanc et al., 2011), die Abdominalmuskulatur (Aspenberg und Turek, 1996; Kübler et al., 1999), die Wadenmuskulatur (Fujimura et al., 1995; Yoshida et al., 1998), die Unterschenkelmuskulatur (Klammert et al., 2009), die Rückenmuskulatur (Kusumoto et al., 1998) und die Brustmuskulatur (Fujimori et al., 1992). Weitere erprobte heterotope Lokalisationen waren eine eröffnete Gelenkkapsel an der Hüfte (Toom et al., 2010) und ein vaskularisierter Periostlappen in der Leistengegend (Vögelin et al., 2000). Am häufigsten wurde jedoch für heterotope Implantationen das *Subcutaneous rat ectopic model* (subkutane Implantation, meist seitliche Thoraxwand) (Reddi und Huggins, 1972; Sampath und Reddi, 1983; Kantorowitz et al., 1990; Wang et al., 1990; Uludag et al., 1999; Kim et al., 2005) und für die intramuskuläre Implantation der *M. quadriceps* (Cole et al., 1997; Rapuano et al., 2008; Luca et al., 2010; Olabisi et al., 2010) verwendet. Es konnte in dieser Studie der *Quadriceps* nicht verwendet werden, da er für intramuskuläre Injektionen zur Verfügung stehen musste und eine subkutane Implantation für diese Fragestellung nicht geeignet war. In eigenen Voruntersuchungen wurden positive Erfahrungen mit der Implantation in den *M.*

semitendinosus gemacht, der zudem die nötige Größe für die komplette intramuskuläre Implantation gewährleistete.

Der Untersuchungszeitraum von vier Wochen wurde in vorliegender Studie gewählt, da im klinischen Bereich in der Humanmedizin frühestens nach 3-4 Wochen erste klinische Zeichen einer HO beschrieben wurden. Nach Eid et al. (2006) müssen sich daher biochemische Veränderungen und zelluläre Vorgänge, die zur HO führen, innerhalb der ersten drei Wochen nach dem Trauma entwickeln. Außerdem wurde gezeigt, dass die BMP-2-induzierte HO bei der Ratte nach 3-4 Wochen abgeschlossen ist (Kübler, 1997).

## **5.2 Dosisfindungsstudien**

In der Literatur findet man sehr unterschiedliche Angaben über Dosierungen des Wachstumsfaktors BMP-2 zur Knocheninduktion, da viele Faktoren für die Aktivität des BMPs eine Rolle spielen, wie u.a. die Reinheit und Quelle des BMPs, der Implantationsort (z.B. orthotop oder heterotop) und die Tierart (Feldman, 1986; Wang et al., 1990). Daher beschränkte sich die Dosis-Orientierung auf Angaben für die heterotope Knocheninduktion bei Ratten. Das Alter der Tiere (Fleet et al., 1996) und die Kombination mit dem Trägersystem (Wang et al., 1990) sind weitere Faktoren, welche die knocheninduzierende Eigenschaft des BMP-2 zusätzlich beeinflussen und berücksichtigt werden mussten. Zum Beispiel belegte eine Studie von Fleet et al. (1996), dass junge Tiere eine deutlich höhere Bereitschaft zur Knochenneubildung zeigten als ältere Tiere. Für den heterotopen Einsatz von BMP-2 in der Muskulatur bei der Ratte wurden Angaben von 5-150 µg BMP-2 gefunden (Kusumoto et al., 1998; Yoshida et al., 1998; Kübler et al., 1999; Okubo et al., 2000; Vögelin et al., 2000; Klammert et al., 2009; Luca et al., 2010). Eine Dosisfindungsstudie für BMP-2 unter den angewandten Untersuchungsbedingungen war somit für die Hauptstudie unumgänglich. Gewählt wurde eine rekombinante humane (rh) BMP-2-Quelle, die sowohl im klinischen als auch im experimentellen Bereich erfolgreich verwendet wurde (Pekkarinen et al., 2006; Meisel et al., 2008; Kasten et al., 2010; Luca et al., 2010; Forsgren et al., 2011; Luca et al., 2011).

Die Auswertung der Ergebnisse der Dosisfindungsstudien zeigte eine Knochenbildung ab 50 µg BMP-2 in Kombination mit beiden Trägern. Bei steigender Dosis erhöhte sich die gebildete Knochenmenge. Somit nahm das Knochenvolumen proportional zur angewandten Menge an BMP-2 zu. Diese Beobachtung deckt sich mit Angaben einer früheren Studie zu heterotoper Knocheninduktion mit BMP-2 (Kübler, 1997).

Die niedrigste noch knochenbildende Dosierung wurde für die Hauptstudie gewählt, um Effekte des spinalen Traumas nicht durch einen vorherrschenden BMP-2-Einfluss zu überdecken.



Außerdem zeigten sich bei hohen BMP-2-Dosierungen zunehmend Nebenwirkungen in Form von Schwellungen. Diese Beobachtungen stimmen überein mit Berichten sowohl aus der klinischen Anwendung im humanmedizinischen Bereich (Carlisle und Fischgrund, 2005; Shields et al., 2006; Crawford et al., 2009) als auch im Tiermodell (Zara et al., 2011).

Es wurde gezeigt, dass BMPs bei flüssiger Applikation schnell abgebaut werden (Nakahara et al., 1989; Lutolf et al., 2003) und daher einen Träger benötigen, wie z.B. Kollagen, der das BMP speichern und wieder abgeben kann (Lutolf et al., 2003; Bikram et al., 2007; Olabisi et al., 2010). Es wurden etliche sowohl natürliche als auch synthetische Materialien als Träger für BMPs untersucht.

Der Vorteil des Kollagens besteht in seiner natürlichen Affinität zu BMP-2 (Lutolf et al., 2003; Olabisi et al., 2010). Kollagen kann BMPs in bestimmtem Ausmaß binden und wird direkt mit Zellen infiltriert und zu Knochengewebe umgebaut (Boyne, 1996; Hollinger et al., 1998b). Weitere Vorteile boten sich bei der Auswertung in der Mikro-Computertomographie (Mikro-CT). Das Kollagen war nach vier Wochen vollständig resorbiert und somit nicht im Mikro-CT sichtbar. Des Weiteren wurde in eigenen Vorstudien bei den Ratten eine sehr gute Verträglichkeit des Kollagens festgestellt, da es eine weiche und verformbare Struktur aufweist. Darin besteht allerdings auch der Nachteil von Kollagen im Gegensatz zu  $\beta$ -Trikalziumphosphat ( $\beta$ -TCP): da es keine stabile Form beibehält, besitzt es keine einheitliche Größe und Struktur für die Auswertung. Manche Autoren berichten, dass die Bioverfügbarkeit von BMP in Kombination mit Kollagen reduziert wird und so größere Mengen für eine therapeutische Antwort benötigt werden (Lutolf et al., 2003; Schmoekel et al., 2005; Bikram et al., 2007).

$\beta$ -TCP wurde von vielen Arbeitsgruppen erfolgreich als Trägermaterial für BMP-2 verwendet (Wang et al., 1999; Kim et al., 2005; Toom et al., 2010), aber es führte in den Vorstudien zu Schwierigkeiten in der Mikro-CT-Analyse. Die Dichte des  $\beta$ -TCP entsprach weitestgehend der Dichte des Knochens und konnte somit in der quantitativen Auswertung nicht von diesem unterschieden werden.

In der Literatur findet man darüber hinaus die Kombination von Wachstumsfaktoren mit flüssigen Trägern (Seeherman et al., 2003; Berger et al., 2005; Luca et al., 2011). Sie bieten den Vorteil, dass sie injizierbar sind und daher keine chirurgische Implantation benötigen (Kan und Kessler, 2011). Nachteilig ist jedoch, dass noch größere Mengen BMP-2 für die heterotope Knocheninduktion notwendig sind, wie z.B. in einer Studie von Luca et al. (2010), in der 150  $\mu$ g BMP-2 in Kombination mit Matrigel verwendet wurde.

Sowohl  $\beta$ -TCP als auch Kollagen erwiesen sich in der Dosisfindungsstudie als geeignete Trägermaterialien für das BMP-2. Die erschwerte Bestimmung des Knochenvolumens mittels Mikro-CT beim  $\beta$ -TCP-Träger führte letztendlich zur Entscheidung für den Träger Kollagen zur Durchführung der Hauptstudie.

Erstaunlich ist die Tatsache, dass bei gleicher Menge des BMP-2 und dem gleichen Träger an den Vordergliedmaßen ein deutlich größeres Knochenvolumen induziert werden konnte als an den Hintergliedmaßen. Ein direkter Vergleich eines solchen Phänomens konnte in der Literatur nicht gefunden werden, da in keiner Publikation bei einem Versuchstier Knocheninduktionen an zwei unterschiedlichen Muskellokalisationen durchgeführt wurden. Eine ähnliche Beobachtung zeigen jedoch die Ergebnisse von Heinen et al. (1949). Dort lag in einem Modell der HO ausgelöst durch intramuskuläre Alkoholinjektionen beim Kaninchen die Inzidenz für ektopische Knochenbildung an der Vordergliedmaße bei 62 % (M. triceps) und an der Hintergliedmaße nur bei 30 % (M. quadriceps). Die Tatsache, dass unterschiedliche Lokalisationen unterschiedliche Knochenbildungskapazitäten aufweisen können und dass es sehr individuelle Unterschiede in der Knochenbildungsfähigkeit gibt, wurde schon öfters beschrieben (Feldman, 1986; Wang et al., 1990). Die unterschiedliche Knochenbildungskapazität der Muskeln kann möglicherweise durch das Verteilungsmuster der Muskelfasertypen beeinflusst sein. Eine Rolle spielen könnte auch die Beanspruchung der Muskeln und die dadurch bedingte unterschiedliche Vaskularisation.

### **5.3 Modell des spinalen Traumas**

Die Mehrheit der spinalen Traumata beim Menschen aufgrund von Motorradunfällen, Stürzen und Sportverletzungen führen zu einer plötzlichen Kompression des Rückenmarks. Sie entsteht gewöhnlich als Folge einer Verletzung der Wirbelsäule, die dazu führt, dass Knochen- oder Bandscheibenstücke in den Wirbelkanal gelangen. Kontusions- und Kompressionsmodelle haben die größte Ähnlichkeit zu den meisten spinalen Verletzungen des Menschen und sind nach Blight (2000) gut geeignet, um die Folgen eines spinalen Traumas zu untersuchen. Beide Modellarten führen im Gewebe des Rückenmarks zu einer zentralen hämorrhagischen Nekrose. In vorliegender Studie wurde der *PSI Infinite Horizon Impactor* verwendet. Es handelt sich um ein gut etabliertes Kontusionsmodell, das schon in einigen Studien an Ratten erfolgreich eingesetzt wurde (Scheff et al., 2003). Das Modell zeigte Vorteile in der Standardisierung und Kontrollierbarkeit. Es ergaben sich lediglich Nachteile in der Handhabung durch die Tatsache, dass die Tiere während der Operation aus dem sterilen Umfeld verbracht werden mussten um den *Impact* auszuführen. Probleme in Form von Infektionen sind dadurch jedoch nicht

entstanden. Eine gewisse, vertretbare Variabilität ließ sich auch mit der konstanten Anwendung von 200 kdyn nicht ausschließen, wie sich u.a. im *Displacement* zeigte (mittleres *Displacement*:  $1347 \pm 243 \mu\text{m}$ ). Unterschiede in der spinalen Schädigung sind zusätzlich bedingt durch individuelle Unterschiede zwischen den Tieren, die bei einem Auszuchtstamm zu erwarten sind. Ähnliche Variabilität zeigte sich auch in vorherigen Publikationen (Scheff et al., 2003). In der histologischen Untersuchung des Rückenmarks eines Tieres aus Gruppe ASCI (*acute spinal cord injury*) konnte gezeigt werden, dass die histologischen Beobachtungen denen beim Menschen sehr nahe kommen (Norenberg et al., 2004). Norenberg et al. (2004) beschrieben in einer histologischen Studie spinaler Traumata beim Menschen (n=180), dass es in 49 % der Fälle zu einer Verletzung kam, die als *Contusion/Cavity*-Form klassifiziert wurde (Bunge et al., 1993). Das histologische Bild ist charakterisiert von Verlusten der grauen Substanz mit Entwicklung von zystenartigen Hohlräumen. Dieses histologische Bild konnte auch in vorliegender Studie beobachtet werden. Peripher war ein schmaler Saum weiße Substanz erkennbar, während die graue Substanz zum Großteil nekrotisch verändert war und eine ausgeprägte Zystenbildung sich zeigte. Auf der Oberfläche des Rückenmarks war keine Verletzung sichtbar. Somit spiegelte das verwendete Modell gut die Verhältnisse beim Menschen wieder.

Zur funktionellen Beurteilung des spinalen Traumas verwendeten wir in der vorliegenden Studie eine Gangbildanalyse. Es handelte sich um eine Modifikation des Basso Beattie Bresnahan (BBB)-Scores (Basso et al., 1995), ähnlich der von Wong et al. (2009) beschriebenen. Gelenkbewegungen der Hinterbeine, sowie Pfotenstellung und Vorderhand-Hinterhand-Koordination wurden beurteilt und einer Skala von 0 bis 21 zugeordnet (0: vollständige Paraplegie, 21: normales Gangbild). Anstatt wie üblich auf einer freien Fläche, erfolgte die Auswertung jedoch auf einer geraden Strecke. Hierzu wurden die Tiere in einen Laufsteg gesetzt, der die Fußabfolge spiegelte. Wong et al. (2009) haben gezeigt, dass eine hohe Korrelation zwischen der klassischen Auswertung auf freier Fläche und der Modifikation besteht und sie sogar noch Vorteile bringt. Ein zusätzlicher Vorteil bei der von uns angewandten Modifikation bestand in dem Vorhandensein der Spiegelfläche, die ein genaues Beobachten der Fußabfolge mittels Videoanalyse ermöglichte.

Die Kontrolltiere zeigten zu keiner Zeit neurologische Defizite (BBB-Score 21). Die Ergebnisse des BBB-Scores der Gruppe ASCI zeigten an Tag 1 einen Median von 2 und an Tag 28 von 15 (vollständiger BBB-Score siehe Anhang). Die Werte belegen, dass mit der gewählten Stärke von 200 kdyn ein inkomplettes spinale Trauma induziert wurde, bei dem es innerhalb von vier

Wochen zu einer partiellen Wiederherstellung der motorischen Funktionen der Hinterbeine kam.

#### **5.4 Mikro-CT-Analyse des heterotopen Knochens**

Für die Analyse der Knochenmorphologie *ex vivo* in Kleintierstudien bildet das Mikro-CT mittlerweile den Goldstandard (Bouxsein et al., 2010). Darstellung und Charakterisierung der Knochenstruktur mittels Mikro-CT-Analyse, sowohl an orthotopen als auch heterotopen Lokalisationen, wurden in vielen Studien erfolgreich angewandt (Lutolf et al., 2003; Kohler et al., 2007; Kanczler et al., 2010; Luca et al., 2010; Olabisi et al., 2010; Sena et al., 2010; Kondo und Togari, 2011; Luca et al., 2011).

In der vorliegenden Studie waren schon in der Übersichtsaufnahme deutliche Größenunterschiede der Knochenneubildungen aufgefallen. Interessanterweise hatten sich in der Gruppe ASCI bei drei von fünf Tieren an insgesamt sechs Stellen zusätzlich kleine Ossikel im Bereich der Haut, meist nahe der Operationsfäden, entwickelt. Diese Beobachtung wies erstmals auf eine höhere Knochenbildungsbereitschaft der Tiere mit spinalem Trauma hin.

In der visuellen Darstellung im Querschnitt war erkennbar, dass der neugebildete Knochen eine Markhöhle umgab, die eine trabekelartige Struktur enthielt. Alle neugebildeten Ossikel zeigten eine ähnliche Architektur mit einer runden bis ovalen äußeren Form und hatten somit mehr oder weniger die Form des ursprünglichen Trägers angenommen. Diese Beobachtungen decken sich mit vorherigen Mikro-CT-Darstellungen heterotopen Knochens (Kempfen et al., 2010; Olabisi et al., 2010).

Bei der Analyse morphologischer Knochenparameter ging es in dieser Studie ausschließlich um den Vergleich der Gruppen miteinander, um mögliche Unterschiede in der Knochenstruktur zu erkennen. Die Werte der einzelnen Parameter mit denen anderer Publikationen zu vergleichen, war kaum möglich, da gezeigt wurde, dass viele Faktoren die Mikro-CT-Ergebnisse beeinflussen, wie z.B. das Mikro-CT-Gerät, Einstellungen und Filter der 3D-Analyse und das Medium, in welchem das Präparat beim Scan gelagert wird (Bouxsein et al., 2010). Des Weiteren entscheiden letztendlich die unterschiedlichen Einstellungen der Grauwerte (*threshold*) in der 3D-Analyse, welche Strukturen das Gerät als Knochen wertet (Bouxsein et al., 2010). Vergleiche sind daher genau genommen nur möglich mit gleichem Mikro-CT-Gerät, gleichem Scan-Medium und identischen Einstellungen. Leider war keine Publikation mit diesen Übereinstimmungen zum Vergleich zu finden. Außerdem handelte es sich in vorliegender Arbeit um heterotopen Knochen und nicht um orthotopen Knochen. Da sich die Nomenklaturen z.B. nach der *American Society for Bone and Mineral Research*

(ASBMR) definitionsmäßig auf orthotopen Knochen beziehen, konnten die Parameter nicht mit Ergebnissen aus Studien mit orthotopem Knochen verglichen werden.

Der Schwerpunkt vorliegender Arbeit lag auf dem Volumen des neugebildeten heterotopen Knochens (*bone volume*, BV). Die Möglichkeit der genauen Bestimmung der Menge an neugebildetem heterotopem Knochen mittels Mikro-CT wurde im Forschungsbereich in letzter Zeit mehrfach genutzt (Kempen et al., 2010; Luca et al., 2010; Olabisi et al., 2010; Luca et al., 2011).

Wie in der Dosisfindungsstudie konnte auch in der Hauptstudie an der Vordergliedmaße (VGM) ein signifikant größeres Knochenvolumen im Vergleich zur Hintergliedmaße (HGM) gemessen werden. Dieses Phänomen betraf beide Gruppen (ASCI und Kontrolle). Daher wurden die Knochenvolumina zwischen Kontroll- und ASCI-Gruppe getrennt für VGM und HGM verglichen.

Die Tiere der Gruppe ASCI bildeten an der Vordergliedmaße signifikant mehr Knochen als die Tiere der Kontrollgruppe (BV ASCI: Median 16,33 mm<sup>3</sup>, Spannweite 5,78-32,97 mm<sup>3</sup>; BV Kontrolle: Median 4,19 mm<sup>3</sup>, Spannweite 2,09-10,2 mm<sup>3</sup>). An der HGM dagegen war die Knochenbildung in der ASCI-Gruppe zwar leicht erhöht, jedoch nicht statistisch signifikant (BV ASCI: Median 2,21 mm<sup>3</sup>, Spannweite 0,37-5,20 mm<sup>3</sup>; BV Kontrolle: Median 1,94 mm<sup>3</sup>, Spannweite 0,37-4,95 mm<sup>3</sup>).

Die Knochendichte (BV/TV) und das Verhältnis von Knochenoberfläche zu Knochenvolumen (BS/BV) sowie die Strukturparameter (Trabekelanzahl, Trabekeldicke und Trabekelabstand) unterschieden sich bei paraplegischen und nichtparaplegischen Tieren nicht signifikant.

Zwischen der VGM und der HGM zeigten sich jedoch innerhalb beider Gruppen eine höheres BS/BV, eine höhere Trabekelanzahl (Tb. N) und ein geringerer Trabekeldurchmesser (Tb. Th) an der HGM. Dies kann dadurch erklärt werden, dass sich an der HGM die Trabekel noch nicht zusammengefunden hatten und somit mehrere einzelne Knochenbälkchen gezählt wurden. Der größere Trabekeldurchmesser an der VGM im Vergleich zur HGM korrespondiert mit dem Parameter BS/BV.

Vergleicht man nun die Knochenneubildungen an der VGM zwischen Gruppe ASCI und den Kontrolltieren, so unterscheiden sich die Versuchsbedingungen in beiden Gruppen nur dahingehend, dass die Gruppe ASCI ein spinales Trauma erhalten hatte. Das spinale Trauma scheint also die Knochenneubildung in der ASCI-Gruppe durch einen oder mehrere Faktoren beeinflusst zu haben, die entweder synergistisch zu BMP-2 wirkten oder zu einer geringeren Konzentration an BMP-2-Inhibitoren führten.

Das spinale Trauma könnte dabei auch indirekt für die erhöhte Knochenbildung verantwortlich sein. Die vermehrte Beanspruchung der Vordergliedmaßen der ASCI-Tiere in der Zeit als die Hinterbeine gelähmt waren, könnte zu Konditionen geführt haben, die die Knochenbildung gefördert haben (Hypothese 1). Heinen et al. (1949) konnten in ihren Studien beobachten, dass Muskeltraining die ektope Knochenbildung beim Kaninchen verstärkte. Auch Trueta (1963) beobachtete, dass die Muskelaktivität die Durchblutung und damit den orthotopen Knochenstoffwechsel beeinflusste. In der Konsequenz müsste dann aber das Knochenvolumen an der HGM der ASCI-Tiere durch die Muskelinaktivität signifikant niedriger sein als in der Kontrollgruppe und die Tiere mit dem stärksten spinalen Trauma müssten auch am meisten Knochen ausgebildet haben. Dies war jedoch nicht der Fall. Es zeigte sich keine Korrelation zwischen Knochenvolumen und dem Grad des spinalen Traumas, beschrieben durch den BBB-Score an Tag 1 und Tag 28. Dieses Ergebnis stimmt mit Beobachtungen der vorausgegangenen Studie überein (Holschbach, 2014). Interessant ist jedoch, dass das Tier mit der deutlichsten funktionellen Wiederherstellung der Hinterbeine auch die höchste Knochenbildungsfähigkeit an der Vordergliedmaße zeigte.

Möglich wäre in diesem Zusammenhang daher die Beteiligung eines zirkulierenden Faktors, der durch das spinale Trauma ausgeschüttet wurde (Hypothese 2). Nun stellt sich jedoch die Frage, wieso an der Hintergliedmaße kein signifikanter Unterschied im Knochenvolumen entstanden ist. Ein möglicher Grund wäre, dass ein potentiell knochenbildender zirkulierender Faktor, ausgelöst durch das spinale Trauma, durch die Mehrbeanspruchung der Muskulatur und dadurch bessere Durchblutung an der Vordergliedmaße dort seine Wirkung deutlicher entfalten konnte. Eine andere Erklärung wäre, dass die gewählte Lokalisation an der Hintergliedmaße ein ungeeigneteres Milieu für die Knochenbildung besaß als die Muskulatur an der Vordergliedmaße und die maximale Knochenbildungskapazität an der Hintergliedmaße schon mit der Menge an implantiertem BMP-2 erreicht war. Mögliche Gründe für ein ungeeigneteres Milieu des Muskels wären u.a. das Vorhandensein weniger ansprechender Zellen, ungeeignete Muskelfasertyp-Zusammensetzung oder eine generell niedrigere Vaskularisation. Diese Vermutung wird durch die Tatsache gestützt, dass auch in der Kontrollgruppe und in der Dosisfindungsstudie vorne deutlich mehr Knochen gebildet wurde als hinten. In der Literatur wurde diese Beobachtung schon von Uludag et al. (2000) in Studien über unterschiedliche Trägermaterialien in Kombination mit BMPs gemacht, in denen durch Erhöhung der Wachstumsfaktoren keine weitere Erhöhung der Knochenbildung induziert werden konnte, da die maximale Knochenbildungsfähigkeit an einer bestimmten Lokalisation erreicht war.

Es wurden in der Literatur viele Gründe für unterschiedliches Ansprechen auf BMP-2 genannt, darunter Unterschiede in Reinheit und Quelle des BMP, Implantationsort, Abgabemodus des Wachstumsfaktors oder Anwesenheit von anderen nicht definierten Wachstumsfaktoren (Wang et al., 1990). Unterschiede im Operationszeitpunkt und damit mögliche unterschiedlich lange Lagerzeiten des BMP-2 vor der Implantation wurden bedacht. Es wurde kein Zusammenhang zwischen Operationszeitpunkt und Knochenvolumina gefunden. Daher kann davon ausgegangen werden, dass der Operationszeitpunkt die Aktivität des BMP nicht beeinflusst hat. Von den genannten Faktoren kamen in der vorliegenden Arbeit u.a. die Faktoren Implantationsort und Anwesenheit von anderen nicht definierten Wachstumsfaktoren als Variablen zwischen den Gruppen in Frage. Kleinste Abweichungen unter den einzelnen Tieren in der Platzierung innerhalb des Muskels, die die Knochenbildungskapazität beeinflusst haben, können natürlich nicht ausgeschlossen werden. Signifikante Unterschiede konnten jedoch in der histologischen Untersuchung nicht festgestellt werden, da sich der Parameter für die Lokalisation innerhalb des Muskels (Parameter BGW-Kontakt) nicht signifikant unterschied. Es wurden in der Literatur zahlreiche Wachstumsfaktoren genannt, welche die induktive Aktivität von BMPs *in vitro* beeinflussen konnten, darunter TGF- $\beta$  (*transforming growth factor-beta*), EGF (*epidermal growth factor*), IGF-1 (*insulin-like growth factor 1*), FGF (*fibroblast growth factor*) und *Nerve growth factor* (Kawamura und Urist, 1988; Kübler, 1997). Daneben spielte auch endogen produziertes BMP-2 eine Rolle in der durch exogenes BMP-2 induzierten Knochenbildung (Nakagawa et al., 2005). Eine verstärkte BMP-2-Wirkung konnte in Studien der gleichen Arbeitsgruppe durch subkutane Injektionen von Simvastatin erreicht werden (Nakagawa et al., 2005).

Eine weitere Publikation, die sich mit dem Einfluss unterschiedlicher Faktoren auf die knochenbildenden Fähigkeiten von BMP-2 beschäftigte, stammt von Kübler et al. (2000). Er nannte neben der Bindung des BMPs an das Trägermaterial und die extrazelluläre Matrix die Anzahl der perivaskulär lokalisierten, mesenchymalen Zielzellen der BMPs im Implantatlager als maßgeblich für das Ausmaß der induzierten Knochenbildung. Diese sei abhängig von der Spezies, dem Lebensalter und der Vaskularisation. Von den genannten Parametern wären eine erhöhte Anzahl an Zielzellen für BMP-2 und Veränderungen in der Vaskularisation Variablen, die durch das spinale Trauma beeinflusst worden sein können.

Welche dieser zahlreichen möglichen Faktoren hier für die verstärkte Knocheninduktion jedoch verantwortlich gewesen ist, kann derzeit nicht abschließend geklärt werden. Hinweise ergaben sich in vorliegender Arbeit jedoch für eine Beteiligung des Wachstumsfaktors TGF- $\beta$ 2 (siehe 5.6.2).

## 5.5 Histologie des heterotopen Knochens

Eine histologische Untersuchung der Proben sollte die quantitative Mikro-CT-Untersuchung ergänzen, da in dieser Knochenmark und Osteoid nicht erfasst werden können. Dabei war es nicht Ziel dieser Untersuchung, eine genaue quantitative Aussage zu machen, sondern vielmehr einen Eindruck über die Gewebezusammensetzung der neugebildeten Knochen zu bekommen. Alle 40 Knochenneubildungen stellten sich in der histologischen Untersuchung als typische Ossikelbildungen innerhalb von 3-4 Wochen nach BMP-2-Induktion dar, wie sie u.a. Kübler et al. (1999) beschrieben haben. Eine zeitliche Kaskade zellulärer Vorgänge stammt von Reddi (1981) für die Implantation demineralisierter Knochenmatrix. Demnach erfolgt an Tag 1 die Immigration von polymorphkernigen Leukozyten, gefolgt von der Migration und Anlagerung von mesenchymalen Stammzellen an Tag 3. Von Tag 6-7 an proliferieren und differenzieren die mesenchymalen Vorläuferzellen zu Chondroblasten und Chondrozyten. Ab Tag 9 erfolgen Vaskularisation und Kalzifizierung der hypertrophen Knochenmatrix. Knorpelresorption und Ersatz des neuen Knochens erfolgen an Tag 10-12. Knochenremodeling und Differenzierung von hämatopoetischen Zellen findet zwischen dem 12. und 18. Tag statt, so dass an Tag 21 die Formation eines kompletten Ossikels mit allen Knochenmarkselementen abgeschlossen ist.

In der vorliegenden Studie besaßen 30 von 40 Proben hämatopoetisches Knochenmark, jedoch waren die Gehalte an diesem sehr unterschiedlich; in keiner Probe konnte Knorpelgewebe festgestellt werden, so dass, wenn von einer enchondralen Ossifikation ausgegangen wird, die Phase des Knorpelersatzes durch Knochen komplett abgeschlossen war.

Vergleicht man das histologische Bild mit histologischen Untersuchungen resezierter HO beim Menschen (Suutre et al., 2009), so ähneln sie Beschreibungen einer reifen HO, charakterisiert durch Spongiosa und reifen Lammelenknochen mit Blutgefäßen und Hämatopoese (Vanden Bossche und Vanderstraeten, 2005).

In 11 Proben konnte eine reich durchblutete bindegewebsreiche Struktur innerhalb des Knochens beobachtet werden, die reich an CD68-positiven einkernigen Zellen war und einem Frakturkallus ähnelte. Es könnte sich um Mikrofrakturen einzelner Trabekel innerhalb des Knochengerüsts handeln, an der sich Kallus-ähnliches Gewebe gebildet hat. Diese Struktur trat an der Vordergliedmaße bei 5 von 10 Tieren in der ASCI-Gruppe und bei 6 von 10 Tieren in der Kontrollgruppe auf; an der Hintergliedmaße in beiden Gruppen nur bei je 1 von 10 Tieren. Es scheint daher einen Zusammenhang mit der Größe und der mechanischen Belastung der Knochenneubildung zu geben. Diese Instabilität des heterotopen Knochens könnte auf eine erhöhte Remodeling-Rate zurückzuführen sein, die schon in früheren Studien bei heterotopem Knochen beobachtet wurde (Puzas et al., 1989).



In der semiquantitativen Auswertung war der Wert des Parameters KM-Gefäße (Knochenmarkgefäße) an der VGM in der Gruppe ASCI signifikant größer als in der Gruppe Kontrolle. Auch zeigte sich für die Parameter KM (Anteil des Markraumes (Knochenmark inklusive bindegewebige Strukturen) im Verhältnis zu Knochen (Knochen trabekel und Kortikalis)) und HKM (Hämatopoetisches Knochenmark) ein Trend.

Das zeigt, dass die Ossikel der ASCI-Tiere einen aktiveren Knochenstoffwechsel hatten und sich somit in einem reiferen Stadium befanden. Anscheinend hat sich durch das spinale Trauma nicht nur ein größeres Knochenvolumen gebildet, sondern die Knochenreifung ist schneller abgelaufen als bei den Tieren der Kontrollgruppe.

Im Vergleich zwischen Histologie und den Messungen des Knochenvolumens, konnte eine Tendenz dahingehend festgestellt werden, dass sich mehr Knochen gebildet hatte, wenn sich das Implantat in der Nähe der bindegewebigen Anteile bzw. Hüllen des Muskels befand. Eine ähnliche Beobachtung wurde auch schon von Heinen et al. (1949) gemacht. Sie konnten beobachten, dass bei Injektion einer knocheninduzierenden Substanz in der Nähe von Ansatz oder Ursprung des Muskels eine größere Tendenz zur Knochenbildung bestand. Der Parameter BGW-Kontakt in der semiquantitativen Auswertung, der den Kontakt zu bindegewebigen Anteilen im Muskel klassifizierte, unterschied sich jedoch in beiden Gruppen nicht signifikant und scheint daher für die unterschiedliche Größe der Knochenneubildungen zwischen den Gruppen ASCI und Kontrolle nicht hauptsächlich verantwortlich zu sein.

Innerhalb der Gruppen ASCI und Kontrolle gab es Unterschiede zwischen der Vordergliedmaße und der Hintergliedmaße: die Parameter Mikrokallus, KM-Gefäße, HKM und CD68-positive Zellen waren an der Vordergliedmaße signifikant höher. Auch das weist darauf hin, dass die Unterschiede im Milieu der Muskulatur an der HGM nicht nur ein geringeres Knochenvolumen, sondern auch eine langsamere Entwicklung hervorriefen. Der Mineralisierungsgrad des Osteoids konnte aufgrund der Entkalkung der Proben nicht eindeutig bestimmt werden.

### **5.6 Serologische Marker**

Untersuchungen serologischer Marker wurden in der klinischen HO-Forschung häufig durchgeführt. Untersucht wurden u.a. Gehalte an alkalischer Phosphatase (Furman et al., 1970), b-FGF und TGF- $\beta$  in Serum oder Plasma von Patienten mit einem spinalem Trauma oder einem Schädel-Hirn-Trauma (Furman et al., 1970; Wildburger et al., 1995; Quinlan et al., 2006).

Beim Menschen sind tägliche Blutuntersuchungen möglich, die allerdings bei der geringen Körpergröße einer Ratte nicht durchzuführen sind. Die Menge an benötigtem Material für die

ELISAs machte nur eine einmalige Blutentnahme nach der Euthanasie an Tag 28 möglich. Die Daten liefern also nur eine Momentaufnahme, die Hinweise für weitere Studien mit einem Zeitverlauf geben kann. Aufgrund des Mangels an Referenzwerten in der Literatur und bedingt durch die Tatsache, dass für die vorliegende Studie lediglich die relativen Unterschiede zwischen den Gruppen relevant waren, wurde auf die Angabe eines Absolutwertes verzichtet. Zum Vergleich mit Normwerten von Tieren ohne Laminektomie oder ASCI wurden Basiswerte aus der Kontrollgruppe der Pilotstudie (PK) untersucht. Diese Tiere hatten das gleiche Alter, die Blutentnahme erfolgte zum gleichen Zeitpunkt (nach vier Wochen), sie hatten die gleiche Belastung durch eine einmalige Narkose, aber nur die Implantation eines Kollagenschwammes ohne Wachstumsfaktor.

### 5.6.1 Biochemische Knochenmarker

Die alkalische Phosphatase (ALP) im Serum wurde in zahlreichen klinischen Studien über HO nach Rückenmarkverletzung (SCI) untersucht (Furman et al., 1970; Kim et al., 1990; Singh et al., 2003). Die Aussagen dieser Autoren über ihren prädiktiven Wert für die Ausbildung einer HO waren jedoch kontrovers. Während bei Furman et al. (1970) die alkalische Phosphatase bei SCI-Patienten, die eine HO entwickelten, signifikant erhöht war, war nach Kim et al. (1990) der Wert nur in Kombination mit dem Phosphatgehalt prädiktiv und Singh et al. (2003) konnten gar keinen signifikanten Unterschied zu Patienten ohne HO feststellen. Eine erhöhte ALP muss jedoch nicht notwendigerweise mit einer HO verbunden sein, sondern kann auch durch Lebererkrankungen oder Frakturen ausgelöst werden. Trotzdem handelt es sich um einen Marker, der auch heute noch zusätzlich in der Frühdiagnostik und zur Beurteilung des Verlaufs sowie der Reifung der HO hinzugezogen wird (Vanden Bossche und Vanderstraeten, 2005).

Die knochenspezifische alkalische Phosphatase (*bone-specific alkaline phosphatase*, BALP) ist spezifischer als die ALP und unabhängig von der Beeinflussung durch Lebererkrankungen. Sie wird von Osteoblasten direkt synthetisiert und dient als Knochenaufbau- und Remodeling-Marker (Seibel, 2005).

Die Werte der BALP zwischen den Gruppen ASCI und Kontrolle unterschieden sich nicht signifikant. Es wurde in der Literatur gezeigt, dass bei der heterotopen Knocheninduktion durch BMPs die Aktivität der alkalischen Phosphatase ab dem 20.-30.Tag fällt (Kübler, 1997). Eine Erhöhung gegenüber dem Basiswert ist jedoch plausibel, da die Aktivität der ALP in der Remodeling-Phase zwar abfällt, aber dennoch vorhanden ist.

Alle 3 Gruppen unterschieden sich in dem Gehalt an dem Knochenresorptionsmarker *Crosslaps* signifikant. Die höchsten Werte konnten wir in der Gruppe ASCI feststellen, gefolgt von der

Kontrollgruppe und dem Basiswert. Der erhöhten Werte der Gruppen ASCI und Kontrolle gegenüber der Norm lassen sich durch den ablaufenden Remodeling Prozess der HOs erklären. Der höhere Gehalt der ASCI-Gruppe gegenüber der Kontrolle weist auf einen stärkeren Knochenumbau hin und korrespondiert mit der Vermutung der schnelleren Knochenreifung durch das spinale Trauma.

### 5.6.2 Wachstumsfaktoren

In dieser Studie wurde der Wachstumsfaktors VEGF (*vascular endothelial growth factor*) untersucht, da gezeigt worden ist, dass er in der Angiogenese der endochondralen Knochenentwicklung eine große Rolle spielt (Gerber et al., 1999). In verschiedenen Phasen der Frakturheilung, beginnend mit dem Frakturhämatom bis zur Phase des Remodeling, ist die Konzentration an VEGF sowohl lokal als auch systemisch erhöht (Beamer et al., 2010). In Publikationen wurde außerdem berichtet, dass endogenes und exogenes VEGF synergistisch die Wirkung von BMP-2 bei der ektopen Knochenentwicklung beeinflussen (Peng et al., 2005; Kakudo et al., 2006).

Die Plasmawerte für VEGF waren in der Gruppe Kontrolle signifikant höher im Vergleich zu den Gruppen ASCI und Norm (Kontrolle vs. ASCI:  $p = 0,009$ ; Kontrolle vs. Norm:  $p = 0,014$ ). Auch in der Gruppe ASCI lagen die Werte höher im Vergleich zur Norm, jedoch nicht signifikant, aber deutlich als Trend erkennbar ( $p = 0,142$ ). Diese Ergebnisse stimmen mit Beobachtungen von Deckers et al. (2002) überein, die besagen, dass BMP-2 die VEGF-Expression hochreguliert. Die Tatsache, dass in der ASCI-Gruppe die Werte von VEGF niedriger und die von *Crosslaps* höher waren, könnte darauf hinweisen, dass die Vorgänge der Knocheninduktion in den ASCI-Tieren nicht nur verstärkt, sondern auch beschleunigt abliefen. Das würde zu den Ergebnissen von Wang et al. (1990) passen, die besagen, dass eine verstärkte BMP-Wirkung nicht nur das Knochenvolumen erhöht, sondern auch die Knochenbildung beschleunigt. Da VEGF während der Knochenentwicklung v.a. die Angiogenese, die Apoptose von Chondrozyten und das Knorpelremodeling moduliert (Gerber et al., 1999; Bouletreau et al., 2002; Deckers et al., 2002) und diese Phasen in unseren Präparaten bereits weitgehend abgeschlossen waren, ist der Zeitpunkt zur Untersuchung von VEGF möglicherweise zu spät gewählt worden. Folgestudien mit unterschiedlichen Untersuchungszeitpunkten wären nötig, um die Bedeutung von VEGF weiter zu klären.

Im TGF- $\beta$ 2-Gehalt zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen allen drei Gruppen. Der Gehalt an TGF- $\beta$ 2 war in der Gruppe ASCI am höchsten, gefolgt von der Gruppe Kontrolle. Der Normwert war nochmals deutlich niedriger.

Die Tatsache, dass der TGF- $\beta$ -Gehalt im Serum nach spinalem Trauma ansteigen kann, stimmt mit Untersuchungen von Quinlan et al. (2006) überein. In einer klinischen Studie über heterotope Ossifikationen nach spinalem Trauma wurde der Gehalt an TGF- $\beta$  nach akuten Verletzungen des Rückenmarks zu fünf verschiedenen Zeitpunkten untersucht. Es gab drei Gruppen: Patienten mit einer Wirbelfraktur alleine, mit einer Wirbelfraktur in Kombination mit einer Verletzung des Rückenmarks, und eine Gruppe, die alleine eine Fraktur eines langen Röhrenknochens erlitten hatte. Es konnte in der Gruppe mit der Rückenmarkverletzung an Tag 84 ein signifikanter Anstieg des Gehaltes an TGF- $\beta$  gemessen werden. Die anderen beiden Gruppen zeigten einen Anstieg an Tag 42 und der Gehalt war an Tag 84 bereits gesunken. Quinlan et al. (2006) vermuteten deshalb, dass erhöhte Werte von TGF- $\beta$  im Serum querschnittgelähmter Patienten an dem erhöhten Knochenstoffwechsel nach Verletzungen des zentralen Nervensystems beteiligt sein könnten. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten ferner, dass eine Fraktur alleine initial auch zu einer Erhöhung des TGF- $\beta$ -Gehalts im Serum führte. Erhöhte Werte aller TGF- $\beta$ -Isoformen während der Frakturheilung wurden auch von Cho et al. (2002) beobachtet. Dies könnte in der vorliegenden Studie die erhöhten Werte der Kontrollgruppe gegenüber der Norm erklären, da bei ihnen eine Laminektomie durchgeführt wurde, die mit einer Verletzung des Knochens einherging, was mit einer Fraktur vergleichbar ist.

In mehreren Publikationen wurde ein Zusammenhang von TGF- $\beta$  und heterotopen Ossifikationen untersucht (Cunningham et al., 1992; Toom et al., 2007; Ripamonti et al., 2009; Suutre et al., 2009; Ripamonti und Roden, 2010; Suutre et al., 2010). Toom et al. (2007) fanden in unreifen HOs beim Menschen erhöhte Gehalte an BMP-2, TGF- $\beta$ 2 und TGF- $\beta$ 3 im Vergleich zu orthotopem Knochen. Sie vermuteten daher, dass diese drei Wachstumsfaktoren eine Rolle in der HO-Formation spielen könnten. Suutre et al. (2009) haben die Anwesenheit von TGF- $\beta$  in reifen und unreifen heterotopen Ossifikationen beim Menschen immunhistochemisch untersucht und festgestellt, dass v.a. die Isoform TGF- $\beta$ 2 in unreifen HOs vorhanden ist.

Ripamonti et al. (2009) haben gezeigt, dass bei Primaten (Bärenpavian, *Papio ursinus*) im Gegensatz zu anderen Säugetieren die alleinige Implantation aller Säugetier-Isoformen von TGF- $\beta$  zu einer heterotopen Knocheninduktion führte. Interessant ist in diesem Zusammenhang auch die Beobachtung von Mathews et al. (1990), der zeigte, dass die systemische Gabe von TGF- $\beta$ 1 und - $\beta$ 2 zu einer Stimulation der Knochenbildung in wachsenden Nagern führte. Jedoch alleinig lokal heterotop implantiert führte TGF- $\beta$  bei Nagern zu keiner Knocheninduktion (Kübler, 1997).

## 5.7 Tiermodell der NHO

Ein erfolgreiches Tiermodell für die NHO gibt es nach Literaturrecherche bislang nicht. Lediglich eine Publikation von Izumi (1983) untersuchte den Einfluss einer Paraplegie auf die Knocheninduktion beim Kaninchen. Sie implantierten demineralisierte Knochenmatrix in den Quadricepsmuskel und verwendeten in einem weiteren Experiment das Michelsson-Modell an den Hintergliedmaßen der Kaninchen. Sie konnten keinen signifikanten Unterschied zwischen der Inzidenz der Knochenbildung zwischen paraplegischen und nichtparaplegischen Tieren feststellen, jedoch fanden sie in der histologischen Untersuchung mehr Chondrozyten und eine erhöhte endochondrale Ossifikationen bei den paraplegischen Tieren. Eine Quantifizierung wurde jedoch nicht vorgenommen.

Um Effekte des spinalen Traumas ober- und unterhalb des Querschnittsniveaus zu untersuchen, wurde in vorliegendem Modell die Knochenbildung an Vorder- und Hintergliedmaßen induziert. Die maximale Anzahl an Proben wurde durch die Implantation auf der rechten und der linken Seite jeweils im kontralateralen Muskel erreicht. Es konnte bei jedem Tier eine HO ausgelöst werden und es wurde ein Modell des spinalen Traumas angewendet, bei dem es zu keinen Komplikationen kam und das zeitnah zu einer partiellen funktionellen Wiederherstellung führte. Die gleichen Gewichtszunahmen in Kontrollgruppe und ASCI zeigten, dass das spinale Trauma zu keiner veränderten Futteraufnahme führte und sie somit keine Ursache von metabolischen Veränderungen sein konnte. Zudem konnte keine Korrelation zwischen dem Knochenvolumen und der spinalen Verletzung (BBB-Score an Tag 1) festgestellt werden; die Ausbildung der HO zeigte sich damit unabhängig vom Grad des spinalen Traumas. Dementsprechend könnte in Folgestudien eine noch geringere Stärke des spinalen Traumas verwendet werden und die Belastung der Tiere und der Pflegeaufwand nochmals verringert werden.

In dieser Arbeit ist es gelungen ein Modell zu etablieren, bei dem es möglich ist, die Mechanismen zu untersuchen, die zu einer verstärkten HO nach SCI bei der Ratte führen und weitere Einsichten in die Pathogenese der traumatischen, erworbenen HO bieten können. Ob die Ergebnisse auf die spontane HO nach spinalem Trauma beim Menschen übertragbar sind und sich die Ratte als Modelltier für diese Fragestellung eignet, bleibt fraglich und kann nur in Folgestudien geklärt werden. Eine kritische Betrachtung ist vor allem im Zusammenhang mit Studienergebnissen von Ripamonti et al. (2001a, 2006) notwendig. Ihre Studien zeigten deutlich unterschiedliche Antworten auf osteogene Proteine der TGF- $\beta$ -Superfamilie zwischen Nagern und Primaten (Ripamonti et al., 2001a, 2006). Ihre Untersuchungen an Bärenpavianen (*Papio ursinus*) haben gezeigt, dass alle drei Isoformen des TGF- $\beta$  bei alleiniger Implantation

in den Muskel (*M. rectus abdominis*) eine HO auslösen konnten (Ripamonti et al., 1997; Duneas et al., 1998; Ripamonti et al., 2000; Ripamonti et al., 2008). Allerdings trat dieses Phänomen nur bei Primaten und nicht bei Nagern oder Hasenartigen auf (Roberts et al., 1986). Diese Unterschiede könnten eine Erklärung dafür sein, dass spontane HOs bei Tieren bisher selten beobachtet wurden. Natürlich vorkommende HOs bei Tieren wurden bisher bei Schweinen (Seibold und Davis, 1967) und am häufigsten bei Katzen beschrieben (Norris et al., 1980; Warren und Carpenter, 1984; Waldron et al., 1985; Valentine et al., 1992; Asano et al. 2006, Yabuzoe et al., 2009). Die betroffenen Tiere zeigten Symptome und Verteilungsmuster ähnlich der *Fibrodysplasia ossificans progressiva* des Menschen mit Ossifikationen der Muskulatur und der Bänder.

## **5.8 Pathogenese der NHO im Tiermodell**

In der Literatur findet man viele Ergebnisse, die einen systemisch vermittelten Faktor für die erhöhte Knochenbildungsfähigkeit nach Verletzung des zentralen Nervensystems vermuten lassen (Bidner et al., 1990; Boes et al., 2006; Eid et al., 2006; Cadosch et al., 2009, 2010b). Auch in vorliegendem Modell weist die Tatsache, dass die verstärkte Knochenbildung an der nicht gelähmten Extremität auftrat, auf einen zirkulierenden Faktor oder eine generell höhere Bereitschaft des Körpers zur Knochenbildung nach einer Verletzung des Rückenmarks hin. Eine signifikant höhere Knochenbildung wurde jedoch nur an der vorderen Extremität beobachtet, was darauf schließen lässt, dass weitere Faktoren eine Rolle spielen müssen. Dies ist nicht verwunderlich, da es auch beim Menschen ein multifaktorielles Geschehen ist, welches zudem nicht bei allen paraplegischen Patienten auftritt. Schon Dejerine und Ceillier (1918) haben vermutet, dass ein lokaler und ein zentraler Faktor neurogenen Ursprungs für die Knochenformation verantwortlich sind (Damanski, 1961). Auch im Tiermodell wurde häufig gezeigt, dass zur ektopen Knochenbildung mehrere Faktoren zusammentreffen müssen. In einer Arbeit von Leblanc et al. (2011) z.B. hat die alleinige Injektion von BMP-9, einem hoch osteogenen BMP, bei Mäusen zu keiner HO geführt. In Kombination mit einem Muskeltrauma jedoch führte es zu einer deutlichen Knochenneubildung in der Muskulatur. Ein weiteres Beispiel für die Kombination mehrere Faktoren zeigt auch eine Studie von Kempen et al. (2010) an Ratten, die gezeigt hat, dass ein erhöhter Parathormonspiegel alleine nicht zu ektoper Knochenbildung führte, sondern nur in Kombination mit BMP-2.

Neuroimmunologische lokale Faktoren jedoch, die auch häufig in der Literatur als mögliche Auslöser der HO erwähnt wurden, können in vorliegendem Modell für die verstärkte Knochenbildung an der vorderen Extremität nicht verantwortlich sein. Die Ergebnisse decken

sich also von der Lokalisation nicht mit klinischen Beobachtungen der spontanen HO nach spinalem Trauma, die hauptsächlich an der gelähmten Extremität vorkommen.

Die Ergebnisse dieser Studie deuten auf eine Kombination aus lokalen und systemischen Faktoren hin, wobei die genaueren Zusammenhänge noch unklar sind. Diese müssen in Folgestudien weiter untersucht werden. Möglich wäre eine Beteiligung des erhöhten TGF- $\beta$ -Wertes im Plasma, wie schon von anderen Autoren vermutet (Quinlan et al., 2006).

## **5.9 Schlussfolgerung**

Die vorliegende Studie hat gezeigt, dass das spinale Trauma auch bei der Ratte einen Einfluss auf die Knochenbildung hat. Die Vermutung der verstärkten Knochenneubildung nach akutem spinalem Trauma wurde bestätigt. Unklar ist jedoch bislang, wieso sich das Phänomen nur auf die vordere Extremität beschränkte. Ob es sich um den gleichen Mechanismus handelt, der auch beim Menschen zur HO führt und der somit die Relevanz dieses Modelles bestätigt, muss noch in Folgestudien geklärt werden. Fraglich ist jedoch, ob die Ratte als Modelltier eine ausreichende Übertragbarkeit auf den Menschen gewährleistet, da Studien gezeigt haben, dass zwischen Nagern und Primaten deutliche Unterschiede in der Knocheninduktion bestehen (Ripamonti et al., 2001b, 2006). Eine weitere Limitierung des Modells besteht ohne Frage in der Tatsache, dass unphysiologisch hohe Werte des BMP-2 zur Induktion der HO angewandt wurden, die beim Menschen unter normalen Bedingungen nicht vorkommen (Kan und Kessler, 2011).

Bemerkenswert ist die Tatsache, dass, wie beim Menschen schon beobachtet (Quinlan et al., 2006), auch bei den Ratten 4 Wochen nach spinalem Trauma erhöhte serologische Werte an TGF- $\beta$ 2 im Vergleich zur Kontrollgruppe festgestellt werden konnten. Die Beteiligung von TGF- $\beta$  an der Induktion von heterotopen Ossifikationen nach spinalem Trauma ist ein vielversprechender Ansatz, den schon andere Arbeitsgruppen vermuteten und der in weiteren Studien untersucht werden sollte (Quinlan et al., 2006; Toom et al., 2007). Welcher Faktor in dieser Studie aber letztendlich für den mit BMP-2 synergistischen Effekt zuständig war, kann derzeit nicht abschließend geklärt werden. Weitere Untersuchungen an unterschiedlichen Lokalisation und zu unterschiedlichen Zeitpunkten müssen folgen, um die induzierenden Faktoren für die Promotion der HO zu identifizieren.

## 6 Zusammenfassung / Summary

### 6.1 Zusammenfassung

Heterotope Ossifikation (HO) bezeichnet die Bildung von Knochen außerhalb des normalen Skeletts und ist bekannt als Komplikation nach spinalen Traumata. Der Pathomechanismus ist jedoch noch immer weitgehend ungeklärt und es fehlt an relevanten Tiermodellen.

Ziel dieser Arbeit war es, ein Tiermodell in der Ratte zu etablieren, an dem kausale Faktoren für das Auftreten von heterotopen Ossifikationen nach akutem spinalem Trauma (*acute spinal cord injury* (ASCI)) identifiziert werden können. Dafür wurde ein Modell des spinalen Traumas, relevant zur Situation des Menschen, mit einem heterotopen Implantationsmodell kombiniert. Zur Unterscheidung lokaler gegenüber systemischen Faktoren des spinalen Traumas sollte die heterotope Ossifikation gleichzeitig kranial und kaudal des Querschnittsniveaus intramuskulär induziert und mit Kontrolltieren verglichen werden.

Die Literaturübersicht erläutert den Begriff der neurogen bedingten heterotopen Ossifikation (NHO) und stellt die Problematik in der Humanmedizin dar. Im Weiteren werden der Stand der Forschung in Bezug auf Ätiologie und Pathogenese der HO und die verfügbaren Tiermodelle umrissen. Danach folgen eine kurze Ausführung über das spinale Trauma und die Modelle der Forschung sowie ein Überblick über die biochemischen Marker und Wachstumsfaktoren, die in dieser Studie untersucht wurden.

Zur Entwicklung eines geeigneten HO-Modells für die Hauptstudie wurden zunächst unterschiedliche HO-Modelle, Implantationsorte, Trägermaterialien und BMP-2-Dosierungen an insgesamt 16 Tieren in Vorstudien getestet.

Die Hauptstudie wurde an 10 Sprague-Dawley-Ratten in einem Alter von drei Monaten durchgeführt. Als Implantat wurde ein Kollagenvlies mit 50 µg BMP-2 verwendet. Dieses wurde an der Vordergliedmaße in den M. triceps brachii und an der Hintergliedmaße in den M. semitendinosus operativ bei allen Versuchstieren beidseits eingebracht. Die akute Rückenmarkschädigung wurde in Form einer Rückenmarkkontusion mit dem *IH Spinal Cord Impactor* (IH-0400) an fünf Tieren durchgeführt. Die Kontrolltiere erhielten eine *Sham-Operation* in Form einer Laminektomie. Nach vier-wöchiger Implantation wurde der heterotop gebildete Knochen mittels Mikro-Computertomographie (Mikro-CT) analysiert (Hauptparameter: Knochenvolumen). Des Weiteren wurden die entnommenen Proben histologisch und immunhistologisch (CD68) untersucht. Zusätzlich wurden mittels ELISA die



Plasmagehalte von Markern des Knochenstoffwechsels (*bone-specific alkaline phosphatase* (BALP), *crosslaps*) und ausgewählten Wachstumsfaktoren (*vascular endothelial growth factor* (VEGF), *transforming growth factor-beta* (TGF- $\beta$ 2)) bestimmt.

Die Rückenmarkkontusion führte zu einer moderaten inkompletten Querschnittlähmung mit partieller funktioneller Wiederherstellung nach vier Wochen. Es wurde bei allen Tieren eine HO induziert und in quantitativen Mikro-CT-Analysen ein signifikant vergrößertes Knochenvolumen (3,9-fach) der HO an der Vordergliedmaße von Ratten mit einem spinalen Trauma im Vergleich zur Kontrollgruppe festgestellt. An der Hintergliedmaße konnten jedoch keine signifikanten Unterschiede im Knochenvolumen festgestellt werden. Die restlichen Parameter der Mikro-CT-Analyse und der Histologie unterschieden sich nicht signifikant zwischen den beiden Gruppen, jedoch traten Unterschiede zwischen Vorder- und Hintergliedmaße auf, die auf unterschiedliche Reifegrade der HO hindeuten. Bei der Analyse von Plasmaproben wurden bei den Ratten mit spinalem Trauma erhöhte serologische Werte an *Crosslaps* und TGF- $\beta$ 2 im Vergleich zur Kontrollgruppe festgestellt. BALP-Werte unterschieden sich nicht signifikant, die VEGF-Werte waren jedoch in der Kontrollgruppe signifikant höher. Die Ergebnisse deuten auf einen fortgeschritteneren Reifezustand der Knochenneubildungen der paraplegischen Tiere hin.

Die Hypothese der verstärkten Knochenneubildung nach akutem spinalem Trauma konnte in dieser Studie teilweise bestätigt werden, jedoch zeigten sich Diskrepanzen verglichen mit der Situation beim Menschen. Weitere Studien sind notwendig, um zu klären, weshalb sich das Phänomen nur auf die vordere Extremität beschränkt und welche Faktoren für die gesteigerte Knochenbildung verantwortlich sind. Erhöhte Plasmawerte von TGF- $\beta$  vier Wochen nach dem spinalen Trauma könnten an dem Prozess der HO beteiligt sein.

## 6.2 Summary

Heterotopic ossification (HO) is the formation of bone outside of the normal skeleton. It is a common complication following spinal cord injury. However, the pathomechanism is still widely unknown and there is a lack of relevant animal models.

The purpose of this study was to establish a rat animal model to identify the causative factors of heterotopic ossification after acute spinal cord injury (ASCI). Therefore we combined a spinal cord injury model relevant to the situation in humans with a heterotopic implantation model. To differentiate local and systemic factors as a consequence of spinal cord injury, we induced

the heterotopic ossification in muscles above and below the spinal lesion and compared results with a control group.

The literature review elucidates the term neurogenic heterotopic ossification and the difficulties present in human medicine in dealing with this entity. Moreover, the state of research concerning the etiology and pathogenesis of HO is presented and the available animal models are outlined. Furthermore, spinal cord injury and the relevant research models are described, followed by an overview of the biochemical markers and growth factors examined in this study.

To find a suitable model for the main study, different HO models, implantation sites, carriers and BMP-2 doses were tested in 16 animals in a preliminary study. The main study was performed with 10 three months old sprague dawley rats. We used a collagenous carrier loaded with 50 µg BMP-2. It was implanted in the biceps brachii muscle and the semitendinosus muscle on both sides. The acute spinal cord injury was produced in five rats using a contusion model (device: IH Spinal Cord Impactor (IH-0400)). In control animals, laminectomy was performed as sham operation. After four weeks of implantation, the heterotopically formed bone was analyzed by microcomputed tomography (micro-CT) (mean parameter: bone volume). Furthermore, explanted specimens were analyzed by histology and by immunohistochemical techniques (CD68). In addition, plasma levels of biochemical markers of bone turnover (bone-specific alkaline phosphatase (BALP)), crosslaps) and relevant growth factors (vascular endothelial growth factor (VEGF), transforming growth factor-beta (TGF-β2)) were assessed with ELISA technique.

The contusion model produced a moderate incomplete spinal cord injury with partial functional recovery after four weeks. HO was induced in all animals and quantitative micro-CT analysis showed that heterotopic bone formation at the forelimb was significantly higher (3.9-fold) in the ASCI group compared to the control group. However, significant differences in bone volume at the hindlimb were not observed. The rest of the examined parameters of micro-CT-analysis and histology did not significantly differ between both experimental groups, but there were differences between HO at fore- and hindlimb, that indicate a different level of bone maturity. In the ASCI group, significantly higher plasma levels of crosslaps and TGF-β2 were measured compared to the control group. The plasma values of BALP did not differ significantly between the groups whereas the levels of VEGF were significantly higher in the control group. These results indicate an advanced stage of bone maturation in the ASCI group.

In this study, the hypothesis of enhanced bone formation after spinal cord injury was partially verified, but differences compared to human HO were shown. Further investigations are necessary to elucidate why the phenomenon is restricted to the forelimb and to identify the causative factors for enhanced bone formation. Elevated levels of TGF- $\beta$  four weeks after spinal cord injury could be involved in the process of HO.

## 7 Literaturverzeichnis

- Abel, R., Meiners, T., Gerner, H.J., 2002. Die Resektion von heterotopen Ossifikationen des Hüftgelenks Querschnittgelähmter. *Operat Orthop Traumatol* 14, 16-28.
- Abramson, A.S., 1948. Bone disturbances in injuries to the spinal cord and cauda equina (paraplegia). Their prevention by ambulation. *J Bone Joint Surg Am* 30 (4), 982-987.
- Abramson, D.J., Kamberg, S., Jefferson, B., 1949. Spondylitis, pathological ossification, and calcification associated with spinal-cord injury. *J Bone Joint Surg Am.* 31 (2), 275-283.
- Aho, H.J., Aro, H., Juntunen, S., Strengell, L., Michelsson, J.E., 1988. Bone formation in experimental myositis ossificans. Light and electron microscopy study. *APMIS* 96, 933-940.
- Ahrengart, L., Lindgren, U., Reinholt, F.P., 1988. Comparative study of the effects of radiation, indomethacin, prednisolone, and ethane-1-hydroxy-1,1-diphosphonate (EHDP) in the prevention of ectopic bone formation. *Clin Orthop Relat Res*, 265-273.
- Akbar, M., Seyler, T., Abel, R., Gerner, H., 2007. Heterotope Ossifikation bei Querschnittlähmung und Schädel-Hirn-Trauma. *Phys Med Rehab Kuror* 17, 156-171.
- Allen, A.R., 1911. Surgery of experimental lesion of spinal cord equivalent to crush injury of fracture dislocation of spinal column: A preliminary report. *J Am Med Assoc* 57, 878-880.
- Allen, A.R., 1914. Remarks on the histopathological changes in the spinal cord due to impact. An experimental study. *J Nerv Ment Dis* 41, 141-147.
- Asano, K., Sakata, A., Shibuya, H., Kitagawa, M., Teshima, K., Kato, Y., Sasaki, Y., Kutara, K., Seki, M., Edamura, K., Sato, T., Tanaka, S., 2006. Fibrodysplasia ossificans progressiva-like condition in a cat. *J Vet Med Sci* 68, 1003-1006.
- Ashton, B.A., Allen, T.D., Howlett, C.R., Eaglesom, C.C., Hattori, A., Owen, M., 1980. Formation of bone and cartilage by marrow stromal cells in diffusion chambers in vivo. *Clin Orthop Relat Res*, 294-307.
- Aspenberg, P., Turek, T., 1996. BMP-2 for intramuscular bone induction: effect in squirrel monkeys is dependent on implantation site. *Acta Orthop Scand* 67, 3-6.
- Ayers, D.C., Pellegrini, V.D., Jr., Evarts, C.M., 1991. Prevention of heterotopic ossification in high-risk patients by radiation therapy. *Clin Orthop Relat Res*, 87-93.
- Bareyre, F.M., Schwab, M.E., 2003. Inflammation, degeneration and regeneration in the injured spinal cord: insights from DNA microarrays. *Trends Neurosci* 26, 555-563.
- Bartlett, C.S., Rapuano, B.E., Lorich, D.G., Wu, T., Anderson, R.C., To min, E., Hsu, J.F., Lane, J.M., Helfet, D.L., 2006. Early changes in prostaglandins precede bone formation in a rabbit model of heterotopic ossification. *Bone* 38, 322-332.

- Basso, D.M., Beattie, M.S., Bresnahan, J.C., 1995. A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats. *J Neurotrauma* 12, 1-21.
- Beamer, B., Hettrich, C., Lane, J., 2010. Vascular endothelial growth factor: an essential component of angiogenesis and fracture healing. *HSSJ*, 85-94.
- Berger, J., Reist, M., Chenite, A., Felt-Baeyens, O., Mayer, J.M., Gurny, R., 2005. Pseudo-thermosetting chitosan hydrogels for biomedical application. *Int J of Pharm* 288, 17-25.
- Bidner, S.M., Rubins, I.M., Desjardins, J.V., Zukor, D.J., Goltzman, D., 1990. Evidence for a humoral mechanism for enhanced osteogenesis after head injury. *J Bone Joint Surg Am.* 72, 1144-1149.
- Bijvoet, O.L., Nollen, A.J., Slooff, T.J., Feith, R., 1974. Effect of a diphosphonate on par-articular ossification after total hip replacement. *Acta Orthop Scand* 45, 926-934.
- Bikram, M., Fouletier-Dilling, C., Hipp, J.A., Gannon, F., Davis, A.R., Olmsted-Davis, E.A., West, J.L., 2007. Endochondral bone formation from hydrogel carriers loaded with BMP2-transduced cells. *Ann Biomed Eng* 35, 796-807.
- Blight, A.R., 2000. Animal models of spinal cord injury. *Top Spinal Cord Inj Rehabil* 6, 1-13.
- Boes, M., Kain, M., Kakar, S., Nicholls, F., Cullinane, D., Gerstenfeld, L., Einhorn, T.A., Tornetta, P., 3rd, 2006. Osteogenic effects of traumatic brain injury on experimental fracture-healing. *J Bone Joint Surg Am.* 88, 738-743.
- Bouletreau, P.J., Warren, S.M., Spector, J.A., Peled, Z.M., Gerrets, R.P., Greenwald, J.A., Longaker, M.T., 2002. Hypoxia and VEGF up-regulate BMP-2 mRNA and protein expression in microvascular endothelial cells: implications for fracture healing. *Plast Reconstr Surg* 109, 2384-2397.
- Bouxsein, M.L., Boyd, S.K., Christiansen, B.A., Guldberg, R.E., Jepsen, K.J., Muller, R., 2010. Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. *J Bone Miner Res* 25, 1468-1486.
- Boyne, P.J., 1996. Animal studies of application of rhBMP-2 in maxillofacial reconstruction. *Bone* 19, 83S-92S.
- Bravo-Payno, P., Esclarin, A., Arzoz, T., Arroyo, O., Labarta, C., 1992. Incidence and risk factors in the appearance of heterotopic ossification in spinal cord injury. *Paraplegia* 30, 740-745.
- Bresnahan, J.C., Beattie, M.S., Todd, F.D., 3rd, Noyes, D.H., 1987. A behavioral and anatomical analysis of spinal cord injury produced by a feedback-controlled impaction device. *Exp Neurol* 95, 548-570.
- Brooker, A.F., Bowerman, J.W., Robinson, R.A., Riley, L.H., Jr., 1973. Ectopic ossification following total hip replacement. Incidence and a method of classification. *J Bone Joint Surg Am.* 55, 1629-1632.

- Buck, R.C., 1953. Regeneration of tendon. *J Pathol Bacteriol* 66, 1-18.
- Bunge, R.P., Puckett, W.R., Becerra, J.L., Marcillo, A., Quencer, R.M., 1993. Observations on the pathology of human spinal cord injury. A review and classification of 22 new cases with details from a case of chronic cord compression with extensive focal demyelination. *Adv Neurol* 59, 75-89.
- Burt, D.W., 1992. Evolutionary grouping of the transforming growth factor-beta superfamily. *Biochem Biophys Res Commun* 184, 590-595.
- Cadosch, D., Gautschi, O.P., Thyer, M., Song, S., Skirving, A.P., Filgueira, L., Zellweger, R., 2009. Humoral factors enhance fracture-healing and callus formation in patients with traumatic brain injury. *J Bone Joint Surg Am.* 91, 282-288.
- Cadosch, D., Thyer, M., Gautschi, O.P., Lochnit, G., Frey, S.P., Zellweger, R., Filgueira, L., Skirving, A.P., 2010a. Functional and proteomic analysis of serum and cerebrospinal fluid derived from patients with traumatic brain injury: a pilot study. *ANZ J Surg* 80, 542-547.
- Cadosch, D., Toffoli, A.M., Gautschi, O.P., Frey, S.P., Zellweger, R., Skirving, A.P., Filgueira, L., 2010b. Serum after traumatic brain injury increases proliferation and supports expression of osteoblast markers in muscle cells. *J Bone Joint Surg Am.* 92, 645-653.
- Carlisle, E., Fischgrund, J.S., 2005. Bone morphogenetic proteins for spinal fusion. *Spine J* 5, 240S-249S.
- Chalmers, J., Gray, D.H., Rush, J., 1975. Observations on the induction of bone in soft tissues. *J Bone Joint Surg Br* 57, 36-45.
- Chantraine, A., Minaire, P., 1981. Para-osteo-arthropathies. A new theory and mode of treatment. *Scand J Rehabil Med* 13, 31-37.
- Chantraine, A., Nusgens, B., Lapiere, C.M., 1995. Biochemical analysis of heterotopic ossification in spinal cord injury patients. *Paraplegia* 33, 398-401.
- Chantraine, A., Very, J.M., Baud, C.A., 1990. A biophysical study of posttraumatic ectopic ossification. A case report. *Clin Orthop Relat Res*, 289-292.
- Cho, T.J., Gerstenfeld, L.C., Einhorn, T.A., 2002. Differential temporal expression of members of the transforming growth factor beta superfamily during murine fracture healing. *J Bone Miner Res* 17, 513-520.
- Cole, B.J., Bostrom, M.P.G., Pritchard, T.L., Sumner, D.R., Tomin, E., Lane, J.M., Weiland, A.J., 1997. Use of bone morphogenetic protein 2 on ectopic porous coated implants in the rat. *Clin Orthop Relat Res* 345, 219-228.
- Couvee, L.M., 1971. Heterotopic ossification and the surgical treatment of serious contractures. *Paraplegia* 9, 89-94.
- Coventry, M.B., Scanlon, P.W., 1981. The use of radiation to discourage ectopic bone. A nine-year study in surgery about the hip. *J Bone Joint Surg Am* 63, 201-208.

- Crawford, C.H., 3rd, Carreon, L.Y., McGinnis, M.D., Campbell, M.J., Glassman, S.D., 2009. Perioperative complications of recombinant human bone morphogenetic protein-2 on an absorbable collagen sponge versus iliac crest bone graft for posterior cervical arthrodesis. *Spine* 34, 1390-1394.
- Cunningham, N.S., Paralkar, V., Reddi, A.H., 1992. Osteogenin and recombinant bone morphogenetic protein 2B are chemotactic for human monocytes and stimulate transforming growth factor beta 1 mRNA expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 11740-11744.
- Damanski, M., 1961. Heterotopic ossification in paraplegia. A clinical study. *J Bone Joint Surg Br* 43, 286-299.
- Daud, O., Sett, P., Burr, R.G., Silver, J.R., 1993. The relationship of heterotopic ossification to passive movements in paraplegic patients. *Disabil Rehabil* 15, 114-118.
- Deckers, M.M., van Bezooijen, R.L., van der Horst, G., Hoogendam, J., van Der Bent, C., Papapoulos, S.E., Lowik, C.W., 2002. Bone morphogenetic proteins stimulate angiogenesis through osteoblast-derived vascular endothelial growth factor A. *Endocrinology* 143, 1545-1553.
- DeFlicht, C.J., Stryker, J.A., 1993. Postoperative hip irradiation in prevention of heterotopic ossification: causes of treatment failure. *Radiology* 188, 265-270.
- Dejerine, A., Ceillier, A., 1918. Para-ostéo-arthropathies des paraplégiques par lésion médullaire: Étude clinique et radiographique. *Ann Méd* 5, 497.
- Dejerine, M., Ceillier, A., Dejerine, Y., 1919. Para-ostéo-arthropathie des paraplégiques par lésion médullaire: Étude anatomique et histologique. *Rev Neurol* 26, 399-407.
- Dohrmann, G.J., Panjabi, M.M., Banks, D., 1978. Biomechanics of experimental spinal cord trauma. *J Neurosurg* 48, 993-1001.
- Duneas, N., Crooks, J., Ripamonti, U., 1998. Transforming growth factor-beta 1: induction of bone morphogenetic protein genes expression during endochondral bone formation in the baboon, and synergistic interaction with osteogenic protein-1 (BMP-7). *Growth Factors* 15, 259-277.
- Eid, K., Labler, L., Ertel, W., Trentz, O., Keel, M., 2006. Systemic effects of severe trauma on the function and apoptosis of human skeletal cells. *J Bone Joint Surg Br* 88, 1394-1400.
- Ekelund, A., Brosjo, O., Nilsson, O.S., 1991. Experimental induction of heterotopic bone. *Clin Orthop Relat Res*, 102-112.
- Eulert, J., Knelles, D., Barthel, T., 1997. Heterotope Ossifikationen. *Der Orthopäde* 26, 399-406.
- Exner, G., 2004. Der Arbeitskreis „Querschnittlähmungen“ des Hauptverbandes der gewerblichen Berufsgenossenschaften in Deutschland. *Trauma und Berufskrankheit* 6, 147-151.

- Feldman, F., 1986. Soft tissue mineralization: roentgen analysis. *Curr Probl Diagn Radiol* 15, 161-240.
- Feldman, G., Li, M., Martin, S., Urbanek, M., Urtizberea, J.A., Fardeau, M., LeMerrer, M., Connor, J.M., Triffitt, J., Smith, R., Muenke, M., Kaplan, F.S., Shore, E.M., 2000. Fibrodysplasia ossificans progressiva, a heritable disorder of severe heterotopic ossification, maps to human chromosome 4q27-31. *Am J Hum Genet* 66, 128-135.
- Fischer, F.R., Peduzzi, J.D., 2007. Functional recovery in rats with chronic spinal cord injuries after exposure to an enriched environment. *J Spinal Cord Med* 30, 147-155.
- Fleet, J.C., Cashman, K., Cox, K., Rosen, V., 1996. The effects of aging on the bone inductive activity of recombinant human bone morphogenetic protein-2. *Endocrinology* 137, 4605-4610.
- Forsgren, J., Brohede, U., Piskounova, S., Mihranyan, A., Larsson, S., Strømme, M., Engqvist, H., 2011. In vivo evaluation of functionalized biomimetic hydroxyapatite for local delivery of active agents. *J Biomater Nanobiotechnol* 2, 149-154.
- Friedenstein, A.J., Piatetzky, S., II, Petrakova, K.V., 1966. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J Embryol Exp Morphol* 16, 381-390.
- Fujimori, Y., Nakamura, T., Ijiri, S., Shimizu, K., Yamamuro, T., 1992. Heterotopic bone formation induced by bone morphogenetic protein in mice with collagen-induced arthritis. *Biochem Biophys Res Commun* 186, 1362-1367.
- Fujimura, K., Bessho, K., Kusumoto, K., Ogawa, Y., Iizuka, T., 1995. Experimental studies on bone inducing activity of composites of atelopeptide type I collagen as a carrier for ectopic osteoinduction by rhBMP-2. *Biochem Biophys Res Commun* 208, 316-322.
- Furman, R., Nicholas, J.J., Jivoff, L., 1970. Elevation of the serum alkaline phosphatase coincident with ectopic-bone formation in paraplegic patients. *J Bone Joint Surg Am* 52, 1131-1137.
- Garland, D.E., 1991. A clinical perspective on common forms of acquired heterotopic ossification. *Clin Orthop Relat Res*, 13-29.
- Garland, D.E., Toder, L., 1980. Fractures of the tibial diaphysis in adults with head injuries. *Clin Orthop Relat Res*, 198-202.
- Garland, D.E., Orwin, J.F., 1989. Resection of heterotopic ossification in patients with spinal cord injuries. *Clin Orthop Relat Res*, 169-176.
- Garland, D.E., Razza, B.E., Waters, R.L., 1982. Forceful joint manipulation in head-injured adults with heterotopic ossification. *Clin Orthop Relat Res*, 133-138.
- Garland, D.E., Alday, B., Venos, K.G., Vogt, J.C., 1983. Diphosphonate treatment for heterotopic ossification in spinal cord injury patients. *Clin Orthop Relat Res*, 197-200.
- Garland, D.E., Alday, B., Venos, K.G., 1984. Heterotopic ossification and HLA antigens. *Arch Phys Med Rehabil* 65, 531-532.



- Gautschi, O.P., Cadosch, D., Bauer, S., Filgueira, L., Zellweger, R., 2008. Heterotopie Ossifikation. Von der Ätiologie zur aktuellen Therapie. *Der Unfallchirurg* 111, 523-534.
- Gautschi, O.P., Cadosch, D., Frey, S.P., Skirving, A.P., Filgueira, L., Zellweger, R., 2009. Serum-mediated osteogenic effect in traumatic brain-injured patients. *ANZ J Surg* 79, 449-455.
- Gerber, H.P., Vu, T.H., Ryan, A.M., Kowalski, J., Werb, Z., Ferrara, N., 1999. VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation. *Nat Med* 5, 623-628.
- Gerhart, T.N., Kirker-Head, C., Kriz, M., Holtrop, M., Hennig, G., Hipp, J., Schelling, S., Wang, E., 1993. Healing segmental femoral defects in sheep using recombinant human bone morphogenetic protein. *Clin Orthop Relat Res*, 317-326.
- Geschickter, C.F., Maseritz, I., 1938. Myositis ossificans. *J Bone Joint Surg Am* 20, 661-674.
- Goldman, J., 1980. Heterotopic ossification in spinal cord injuries. *Physiotherapy* 66, 219-220.
- Gruner, J.A., 1992. A monitored contusion model of spinal cord injury in the rat. *J Neurotrauma* 9, 123-126; discussion 126-128.
- Hardy, A., Dickson, J., 1963. Pathological ossification in traumatic paraplegia. *J Bone Joint Surg Br* 45, 76-87.
- Hardy, J.R., Rooney, P., 1997. Use of the myositis ossificans model of Michelsson. *Clin Orthop Relat Res*, 340-342.
- Heinen, J.H., Jr., Dabbs, G.H., Mason, H.A., 1949. The experimental production of ectopic cartilage and bone in the muscles of rabbits. *J Bone Joint Surg Am* 31A, 765-775.
- Hernandez, A.M., Forner, J.V., de la Fuente, T., Gonzalez, C., Miro, R., 1978. The par-articular ossifications in our paraplegics and tetraplegics: a survey of 704 patients. *Paraplegia* 16, 272-275.
- Hofmann, G., Röhl, K., 2010. Rückenmarkverletzungen und Querschnittslähmung. *Trauma und Berufskrankheit* 12, 145-146.
- Hollinger, J.O., Schmitt, J.M., Buck, D.C., Shannon, R., Joh, S.P., Zegzula, H.D., Wozney, J., 1998a. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 and collagen for bone regeneration. *J Biomed Mater Res* 43, 356-364.
- Hollinger, J.O., Uludag, H., Winn, S.R., 1998b. Sustained release emphasizing recombinant human bone morphogenetic protein-2. *Adv Drug Deliv Rev* 31, 303-318.
- Holschbach, J.K., 2014. Frakturheilung bei Paraplegie im Rattenmodell. *Vet med Diss, Hannover*.

- Hunter, T., Dubo, H.I., Hildahl, C.R., Smith, N.J., Schroeder, M.L., 1980. Histocompatibility antigens in patients with spinal cord injury or cerebral damage complicated by heterotopic ossification. *Rheumatol Rehabil* 19, 97-99.
- Izumi, K., 1983. Study of ectopic bone formation in experimental spinal cord injured rabbits. *Paraplegia* 21, 351-363.
- Jakeman, L.B., Guan, Z., Wei, P., Ponnappan, R., Dzwonczyk, R., Popovich, P.G., Stokes, B.T., 2000. Traumatic spinal cord injury produced by controlled contusion in mouse. *J Neurotrauma* 17, 299-319.
- Jensen, L.L., Halar, E., Little, J.W., Brooke, M.M., 1987. Neurogenic heterotopic ossification. *Am J Phys Med* 66, 351-363.
- Joyce, M.E., Roberts, A.B., Sporn, M.B., Bolander, M.E., 1990. Transforming growth factor-beta and the initiation of chondrogenesis and osteogenesis in the rat femur. *J Cell Biol* 110, 2195-2207.
- Kakudo, N., Kusumoto, K., Wang, Y.B., Iguchi, Y., Ogawa, Y., 2006. Immunolocalization of vascular endothelial growth factor on intramuscular ectopic osteoinduction by bone morphogenetic protein-2. *Life Sci* 79, 1847-1855.
- Kan, L., Kessler, J.A., 2011. Animal models of typical heterotopic ossification. *J Biomed Biotechnol* 2011, 309287.
- Kan, L., Hu, M., Gomes, W.A., Kessler, J.A., 2004. Transgenic mice overexpressing BMP4 develop a fibrodysplasia ossificans progressiva (FOP)-like phenotype. *Am J Pathol* 165, 1107-1115.
- Kan, L., Liu, Y., McGuire, T.L., Berger, D.M., Awatramani, R.B., Dymecki, S.M., Kessler, J.A., 2009. Dysregulation of local stem/progenitor cells as a common cellular mechanism for heterotopic ossification. *Stem Cells* 27, 150-156.
- Kan, L., Lounev, V.Y., Pignolo, R.J., Duan, L., Liu, Y., Stock, S.R., McGuire, T.L., Lu, B., Gerard, N.P., Shore, E.M., Kaplan, F.S., Kessler, J.A., 2011. Substance P signaling mediates BMP-dependent heterotopic ossification. *J Cell Biochem* 112, 2759-2772.
- Kanczler, J.M., Ginty, P.J., White, L., Clarke, N.M., Howdle, S.M., Shakesheff, K.M., Oreffo, R.O., 2010. The effect of the delivery of vascular endothelial growth factor and bone morphogenetic protein-2 to osteoprogenitor cell populations on bone formation. *Biomaterials* 31, 1242-1250.
- Kantorowitz, D.A., Miller, G.J., Ferrara, J.A., Ibbott, G.S., Fisher, R., Ahrens, C.R., 1990. Preoperative versus postoperative irradiation in the prophylaxis of heterotopic bone formation in rats. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 19, 1431-1438.
- Kaplan, F.S., Glaser, D.L., Shore, E.M., Pignolo, R.J., Xu, M., Zhang, Y., Senitzer, D., Forman, S.J., Emerson, S.G., 2007. Hematopoietic stem-cell contribution to ectopic skeletogenesis. *J Bone Joint Surg Am* 89, 347-357.

- Kaplan, F.S., Shen, Q., Lounev, V., Seemann, P., Groppe, J., Katagiri, T., Pignolo, R.J., Shore, E.M., 2008. Skeletal metamorphosis in fibrodysplasia ossificans progressiva (FOP). *J Bone Miner Metab* 26, 521-530.
- Kasten, P., Beyen, I., Bormann, D., Luginbuhl, R., Ploger, F., Richter, W., 2010. The effect of two point mutations in GDF-5 on ectopic bone formation in a beta-tricalciumphosphate scaffold. *Biomaterials* 31, 3878-3884.
- Kawamura, M., Urist, M.R., 1988. Growth factors, mitogens, cytokines, and bone morphogenetic protein in induced chondrogenesis in tissue culture. *Dev Biol* 130, 435-442.
- Kempen, D.H., Lu, L., Hefferan, T.E., Creemers, L.B., Heijink, A., Maran, A., Dhert, W.J., Yaszemski, M.J., 2010. Enhanced bone morphogenetic protein-2-induced ectopic and orthotopic bone formation by intermittent parathyroid hormone (1-34) administration. *Tissue Eng Part A* 16, 3769-3777.
- Kewalramani, L.S., 1977. Ectopic ossification. *Am J Phys Med* 56, 99-121.
- Khan, T., Havey, R.M., Sayers, S.T., Patwardhan, A., King, W.W., 1999. Animal models of spinal cord contusion injuries. *Lab Anim Sci* 49, 161-172.
- Kibblewhite, D.J., Bruce, A.G., Strong, D.M., Ott, S.M., Purchio, A.F., Larrabee, W.F., Jr., 1993. Transforming growth factor-beta accelerates osteoinduction in a craniofacial onlay model. *Growth Factors* 9, 185-193.
- Kim, C.S., Kim, J.I., Kim, J., Choi, S.H., Chai, J.K., Kim, C.K., Cho, K.S., 2005. Ectopic bone formation associated with recombinant human bone morphogenetic proteins-2 using absorbable collagen sponge and beta tricalcium phosphate as carriers. *Biomaterials* 26, 2501-2507.
- Kim, S.W., Charter, R.A., Chai, C.J., Kim, S.K., Kim, E.S., 1990. Serum alkaline phosphatase and inorganic phosphorus values in spinal cord injury patients with heterotopic ossification. *Paraplegia* 28, 441-447.
- Kjaersgaard-Andersen, P., Schmidt, S.A., 1991. Total hip arthroplasty. The role of antiinflammatory medications in the prevention of heterotopic ossification. *Clin Orthop Relat Res*, 78-86.
- Kjaersgaard-Andersen, P., Nafei, A., Teichert, G., Kristensen, O., Schmidt, S.A., Keller, J., Lucht, U., 1993. Indomethacin for prevention of heterotopic ossification. A randomized controlled study in 41 hip arthroplasties. *Acta Orthop Scand* 64, 639-642.
- Klammert, U., Nickel, J., Wurzler, K., Klingelhoffer, C., Sebald, W., Kubler, A.C., Reuther, T., 2009. Biological activity of a genetically modified BMP-2 variant with inhibitory activity. *Head Face Med* 5, 6.
- Klein, B.Y., Shohami, E., Reikhshtein, Y., Ben-Bassat, H., Liebergall, M., 1999. Serum-mediated osteogenic effects of head injury on cultured rat marrow stromal cells. *Calcif Tissue Int* 65, 217-222.

- Knudsen, L., Lundberg, D., Ericsson, G., 1982. Myositis ossificans circumscripta in para/tetraplegics. *Scand J Rheumatol* 11, 27-31.
- Kobayashi, N.R., Fan, D.P., Giehl, K.M., Bedard, A.M., Wiegand, S.J., Tetzlaff, W., 1997. BDNF and NT-4/5 prevent atrophy of rat rubrospinal neurons after cervical axotomy, stimulate GAP-43 and Talpha1-tubulin mRNA expression, and promote axonal regeneration. *J Neurosci* 17, 9583-9595.
- Kohler, T., Stauber, M., Donahue, L.R., Muller, R., 2007. Automated compartmental analysis for high-throughput skeletal phenotyping in femora of genetic mouse models. *Bone* 41, 659-667.
- Kondo, H., Togari, A., 2011. Continuous treatment with a low-dose beta-agonist reduces bone mass by increasing bone resorption without suppressing bone formation. *Calcif Tissue Int* 88, 23-32.
- Kroese-Deutman, H.C., Ruhe, P.Q., Spauwen, P.H., Jansen, J.A., 2005. Bone inductive properties of rhBMP-2 loaded porous calcium phosphate cement implants inserted at an ectopic site in rabbits. *Biomaterials* 26, 1131-1138.
- Kübler, N., 1997. Osteoinduktion und -reparation. *Mund Kiefer GesichtsChir* 1, 2-25.
- Kübler, N., Würzler, K., Reuther, J., Faller, G., Sieber, E., Kirchner, T., Sebald, W., 1999. EHBMP-2. Erstes BMP-Analog mit osteoinduktiven Eigenschaften. *Mund Kiefer GesichtsChir* 3 Suppl 1, 134-139.
- Kübler, N.R., Würzler, K.K., Reuther, J.F., Sieber, E., Kirchner, T., Sebald, W., 2000. Einfluss unterschiedlicher Faktoren auf die knochenbildenden Eigenschaften von rekombinanten BMPs. *Mund Kiefer GesichtsChir* 4 Suppl 2, 465-469.
- Kurer, M.H., Khoker, M.A., Dandona, P., 1992. Human osteoblast stimulation by sera from paraplegic patients with heterotopic ossification. *Paraplegia* 30, 165-168.
- Kusumoto, K., Bessho, K., Fujimura, K., Akioka, J., Ogawa, Y., Iizuka, T., 1998. Prefabricated muscle flap including bone induced by recombinant human bone morphogenetic protein-2: an experimental study of ectopic osteoinduction in a rat latissimus dorsi muscle flap. *Br J Plast Surg* 51, 275-280.
- Kwon, B.K., Oxland, T.R., Tetzlaff, W., 2002. Animal models used in spinal cord regeneration research. *Spine* 27, 1504-1510.
- Lal, S., Hamilton, B.B., Heinemann, A., Betts, H.B., 1989. Risk factors for heterotopic ossification in spinal cord injury. *Arch Phys Med Rehabil* 70, 387-390.
- Larson, J.M., Michalski, J.P., Collacott, E.A., Eltorai, D., McCombs, C.C., Madorsky, J.B., 1981. Increased prevalence of HLA-B27 in patients with ectopic ossification following traumatic spinal cord injury. *Rheumatol Rehabil* 20, 193-197.
- Le Nihouannen, D., Daculsi, G., Saffarzadeh, A., Gauthier, O., Delplace, S., Pilet, P., Layrolle, P., 2005. Ectopic bone formation by microporous calcium phosphate ceramic particles in sheep muscles. *Bone* 36, 1086-1093.

- Leblanc, E., Trens, F., Haroun, S., Drouin, G., Bergeron, E., Penton, C.M., Montanaro, F., Roux, S., Fauchoux, N., Grenier, G., 2011. BMP-9-induced muscle heterotopic ossification requires changes to the skeletal muscle microenvironment. *J Bone Miner Res* 26, 1166-1177.
- Liberson, M., 1953. Soft tissue calcifications in cord lesions. *J Am Med Assoc* 152, 1010-1013.
- Lo, T.C., Healy, W.L., Covall, D.J., Dotter, W.E., Pfeifer, B.A., Torgerson, W.R., Wasilewski, S.A., 1988. Heterotopic bone formation after hip surgery: prevention with single-dose postoperative hip irradiation. *Radiology* 168, 851-854.
- Lotta, S., Scelsi, L., Scelsi, R., 2001. Microvascular changes in the lower extremities of paraplegics with heterotopic ossification. *Spinal cord* 39, 595-598.
- Lounev, V.Y., Ramachandran, R., Wosczyzna, M.N., Yamamoto, M., Maidment, A.D., Shore, E.M., Glaser, D.L., Goldhamer, D.J., Kaplan, F.S., 2009. Identification of progenitor cells that contribute to heterotopic skeletogenesis. *J Bone Joint Surg Am* 91, 652-663.
- Luca, L., Rougemont, A.L., Walpoth, B.H., Gurny, R., Jordan, O., 2010. The effects of carrier nature and pH on rhBMP-2-induced ectopic bone formation. *J Control Release* 147, 38-44.
- Luca, L., Rougemont, A.L., Walpoth, B.H., Boure, L., Tami, A., Anderson, J.M., Jordan, O., Gurny, R., 2011. Injectable rhBMP-2-loaded chitosan hydrogel composite: osteoinduction at ectopic site and in segmental long bone defect. *J Biomed Mater Res Part A* 96, 66-74.
- Lutolf, M.P., Weber, F.E., Schmoekel, H.G., Schense, J.C., Kohler, T., Muller, R., Hubbell, J.A., 2003. Repair of bone defects using synthetic mimetics of collagenous extracellular matrices. *Nat Biotechnol* 21, 513-518.
- Lynch, C., Pont, A., Weingarden, S.I., 1981. Heterotopic ossification in the hand of a patient with spinal cord injury. *Arch Phys Med Rehabil* 62, 291-293.
- Mathews, M., Armstrong, R., De Leon, E., Bentz, H., Fiedler, L., Carlino, J., Seyedin, S., Mathews, C., Miller, S., Rosen, D., 1990. Systemic delivery of TGF $\beta$  produces a marked increase in osteoblasts, stimulates osteoid synthesis and increases bone formation in long bones and vertebrae in rats and mice. *J Bone Miner Res* 5, S216.
- McCarthy, E.F., Sundaram, M., 2005. Heterotopic ossification: a review. *Skeletal radiology* 34, 609-619.
- McClure, J., 1983. The effect of diphosphonates on heterotopic ossification in regenerating Achilles tendon of the mouse. *J Pathol* 139, 419-430.
- McKay, W.F., Peckham, S.M., Badura, J.M., 2007. A comprehensive clinical review of recombinant human bone morphogenetic protein-2 (infuse bone graft). *Int Orthop* 31, 729-734.
- Mead, S., Cain, H.D., Kelly, R.E., Liebgold, H., 1963. Periarticular calcification in paraplegics: attempted treatment with disodium edetate. *Paraplegia* 1, 62-68.

- Medici, D., Olsen, B.R., 2012. The role of endothelial-mesenchymal transition in heterotopic ossification. *J Bone Miner Res* 27, 1619-1622.
- Medici, D., Shore, E.M., Lounev, V.Y., Kaplan, F.S., Kalluri, R., Olsen, B.R., 2010. Conversion of vascular endothelial cells into multipotent stem-like cells. *Nat Med* 16, 1400-1406.
- Meiners, T., Abel, R., Bohm, V., Gerner, H.J., 1997. Resection of heterotopic ossification of the hip in spinal cord injured patients. *Spinal cord* 35, 443-445.
- Meisel, H.J., Schnoring, M., Hohaus, C., Minkus, Y., Beier, A., Ganey, T., Mansmann, U., 2008. Posterior lumbar interbody fusion using rhBMP-2. *Eur Spine J* 17, 1735-1744.
- Michelsson, J.E., Rauschnig, W., 1983. Pathogenesis of experimental heterotopic bone formation following temporary forcible exercising of immobilized limbs. *Clin Orthop Relat Res*, 265-272.
- Michelsson, J.E., Granroth, G., Andersson, L.C., 1980. Myositis ossificans following forcible manipulation of the leg. A rabbit model for the study of heterotopic bone formation. *J Bone Joint Surg Am* 62, 811-815.
- Miller, L.F., O'Neill, C.J., 1949. Myositis ossificans in paraplegics. *J Bone Joint Surg Am* 31A, 283-294.
- Minaire, P., Betuel, H., Girard, R., Pilonchery, G., 1980. Neurologic injuries, paraosteopathies, and human leukocyte antigens. *Arch Phys Med Rehabil* 61, 214-215.
- Moed, B.R., Resnick, R.B., Fakhouri, A.J., Nallamotheu, B., Wagner, R.A., 1994. Effect of two nonsteroidal antiinflammatory drugs on heterotopic bone formation in a rabbit model. *J Arthroplasty* 9, 81-87.
- Mohan, S., Baylink, D.J., 1991. Bone growth factors. *Clin Orthop Relat Res*, 30-48.
- Mulisch, M., Welsch, U., 2010. *Romeis Mikroskopische Technik*, 18. Auflage, Springer-Verlag, Heidelberg, S. 249, 250-251.
- Naftchi, N.E., Viau, A.T., Sell, G.H., Lowman, E.W., 1979. Spinal cord injury: effect of thyrocalcitonin on periarticular bone formation in three subjects. *Arch Phys Med Rehabil* 60, 280-283.
- Nakagawa, T., Sugiyama, T., Murata, T., Tagawa, T., 2005. The effects of endogenous BMP during the process of BMP-induced bone formation and a possibility of clinical application. *J Hard Tissue Biology* 14, 71-72.
- Nakahara, H., Takaoka, K., Koezuka, M., Sugamoto, K., Tsuda, T., Ono, K., 1989. Periosteal bone formation elicited by partially purified bone morphogenetic protein. *Clin Orthop Relat Res*, 299-305.
- Newman, R.J., Stone, M.H., Mukherjee, S.K., 1987. Accelerated fracture union in association with severe head injury. *Injury* 18, 241-246.

- Nollen, A.J., 1986. Effects of ethylhydroxydiphosphonate (EHDP) on heterotopic ossification. *Acta Orthop Scand* 57, 358-361.
- Norenberg, M.D., Smith, J., Marcillo, A., 2004. The pathology of human spinal cord injury: defining the problems. *J Neurotrauma* 21, 429-440.
- Norris, A., Pallett, L., Wilcock, B., 1980. Generalized myositis ossificans in a cat. *J Am Anim Hosp Assoc* 16, 659-663.
- O'Connor, J.P., 1998. Animal models of heterotopic ossification. *Clin Orthop Relat Res*, 71-80.
- Okubo, Y., Bessho, K., Fujimura, K., Konishi, Y., Kusumoto, K., Ogawa, Y., Iizuka, T., 2000. Osteoinduction by recombinant human bone morphogenetic protein-2 at intramuscular, intermuscular, subcutaneous and intrafatty sites. *Int J Oral Maxillofac Surg* 29, 62-66.
- Olabisi, R.M., Lazard, Z.W., Franco, C.L., Hall, M.A., Kwon, S.K., Sevick-Muraca, E.M., Hipp, J.A., Davis, A.R., Olmsted-Davis, E.A., West, J.L., 2010. Hydrogel microsphere encapsulation of a cell-based gene therapy system increases cell survival of injected cells, transgene expression, and bone volume in a model of heterotopic ossification. *Tissue Eng Part A* 16, 3727-3736.
- Orzel, J.A., Rudd, T.G., 1985. Heterotopic bone formation: clinical, laboratory, and imaging correlation. *J Nucl Med* 26, 125-132.
- Otsuru, S., Tamai, K., Yamazaki, T., Yoshikawa, H., Kaneda, Y., 2007. Bone marrow-derived osteoblast progenitor cells in circulating blood contribute to ectopic bone formation in mice. *Biochem Biophys Res Commun* 354, 453-458.
- Otsuru, S., Tamai, K., Yamazaki, T., Yoshikawa, H., Kaneda, Y., 2008. Circulating bone marrow-derived osteoblast progenitor cells are recruited to the bone-forming site by the CXCR4/stromal cell-derived factor-1 pathway. *Stem Cells* 26, 223-234.
- Pape, H.C., Marsh, S., Morley, J.R., Krettek, C., Giannoudis, P.V., 2004. Current concepts in the development of heterotopic ossification. *J Bone Joint Surg Br* 86, 783-787.
- Parfitt, A.M., Drezner, M.K., Glorieux, F.H., Kanis, J.A., Malluche, H., Meunier, P.J., Ott, S.M., Recker, R.R., 1987. Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols, and units. Report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *J Bone Miner Res* 2, 595-610.
- Pearce, A.I., Richards, R.G., Milz, S., Schneider, E., Pearce, S.G., 2007. Animal models for implant biomaterial research in bone: a review. *Eur Cell Mater* 13, 1-10.
- Pekkarinen, T., Jamsa, T., Maatta, M., Hietala, O., Jalovaara, P., 2006. Reindeer BMP extract in the healing of critical-size bone defects in the radius of the rabbit. *Acta Orthop* 77, 952-959.
- Pellegrini, V.D., Jr., Gregoritch, S.J., 1996. Preoperative irradiation for prevention of heterotopic ossification following total hip arthroplasty. *J Bone Joint Surg Am* 78, 870-881.

- Peng, H., Usas, A., Olshanski, A., Ho, A.M., Gearhart, B., Cooper, G.M., Huard, J., 2005. VEGF improves, whereas sFlt1 inhibits, BMP2-induced bone formation and bone healing through modulation of angiogenesis. *J Bone Miner Res* 20, 2017-2027.
- Perkins, R., Skirving, A.P., 1987. Callus formation and the rate of healing of femoral fractures in patients with head injuries. *J Bone Joint Surg Br* 69, 521-524.
- Pfeilschifter, J., Seyedin, S.M., Mundy, G.R., 1988. Transforming growth factor beta inhibits bone resorption in fetal rat long bone cultures. *J Clin Invest* 82, 680-685.
- Pschyrembel, W., Dornblüth, O., 2002. *Klinisches Wörterbuch*, 259. Auflage, de Gruyter, Berlin, New York, S. 695, 1056, 1123, 1222.
- Puzas, J.E., Miller, M.D., Rosier, R.N., 1989. Pathologic bone formation. *Clin Orthop Relat Res*, 269-281.
- Quinlan, J.F., Watson, R.W., Kelly, G., Kelly, P.M., O'Byrne, J.M., Fitzpatrick, J.M., 2006. Transforming growth factor-beta (TGF-beta) in acute injuries of the spinal cord. *J Bone Joint Surg Br* 88, 406-410.
- Rapuano, B.E., Boursiquot, R., To min, E., Macdonald, D.E., Maddula, S., Raghavan, D., Lane, J.M., Helfet, D.L., 2008. The effects of COX-1 and COX-2 inhibitors on prostaglandin synthesis and the formation of heterotopic bone in a rat model. *Arch Orthop Trauma Surg* 128, 333-344.
- Reddi, A.H., 1981. Cell biology and biochemistry of endochondral bone development. *Coll Relat Res* 1, 209-226.
- Reddi, A.H., Huggins, C., 1972. Biochemical sequences in the transformation of normal fibroblasts in adolescent rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 69, 1601-1605.
- Renfree, K.J., Banovac, K., Hornicek, F.J., Lebowitz, N.H., Villanueva, P.A., Nedd, K.J., 1994. Evaluation of serum osteoblast mitogenic activity in spinal cord and head injury patients with acute heterotopic ossification. *Spine (Phila Pa 1976)* 19, 740-746.
- Riedel, B., 1883. Demonstration eines durch achttagiges Umhergehen total destruierten knieelenkes von einem Patienten mit Stichverletzung des Rückens. *Verh Dtsch Gesellschaft Chirurg* 12, 93.
- Ripamonti, U., Roden, L.C., 2010. Induction of bone formation by transforming growth factor-beta2 in the non-human primate *Papio ursinus* and its modulation by skeletal muscle responding stem cells. *Cell Prolif* 43, 207-218.
- Ripamonti, U., Duneas, N., Van Den Heever, B., Bosch, C., Crooks, J., 1997. Recombinant transforming growth factor-beta1 induces endochondral bone in the baboon and synergizes with recombinant osteogenic protein-1 (bone morphogenetic protein-7) to initiate rapid bone formation. *J Bone Miner Res* 12, 1584-1595.
- Ripamonti, U., Crooks, J., Matsaba, T., Tasker, J., 2000. Induction of endochondral bone formation by recombinant human transforming growth factor-beta2 in the baboon (*Papio ursinus*). *Growth Factors* 17, 269-285.



- Ripamonti, U., Crooks, J., Petit, J.C., Rueger, D.C., 2001a. Periodontal tissue regeneration by combined applications of recombinant human osteogenic protein-1 and bone morphogenetic protein-2. A pilot study in Chacma baboons (*Papio ursinus*). *Eur J Oral Sci* 109, 241-248.
- Ripamonti, U., Crooks, J., Rueger, D.C., 2001b. Induction of bone formation by recombinant human osteogenic protein-1 and sintered porous hydroxyapatite in adult primates. *Plast Reconstr Surg* 107, 977-988.
- Ripamonti, U., Ferretti, C., Heliotis, M., 2006. Soluble and insoluble signals and the induction of bone formation: molecular therapeutics recapitulating development. *J Anat* 209, 447-468.
- Ripamonti, U., Ramoshebi, L.N., Teare, J., Renton, L., Ferretti, C., 2008. The induction of endochondral bone formation by transforming growth factor-beta(3): experimental studies in the non-human primate *Papio ursinus*. *J Cell Mol Med* 12, 1029-1048.
- Ripamonti, U., Ferretti, C., Teare, J., Blann, L., 2009. Transforming growth factor-beta isoforms and the induction of bone formation: implications for reconstructive craniofacial surgery. *J Craniofac Surg* 20, 1544-1555.
- Rivlin, A.S., Tator, C.H., 1978. Effect of duration of acute spinal cord compression in a new acute cord injury model in the rat. *Surg Neurol* 10, 38-43.
- Roberts, A.B., Sporn, M.B., Assoian, R.K., Smith, J.M., Roche, N.S., Wakefield, L.M., Heine, U.I., Liotta, L.A., Falanga, V., Kehrl, J.H., et al., 1986. Transforming growth factor type beta: rapid induction of fibrosis and angiogenesis in vivo and stimulation of collagen formation in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83, 4167-4171.
- Röhl, K., Bosse, A., Bötzel, U., 1993. Ungewöhnliche Lokalisation einer heterotopen Ossifikation im Bereich einer Laparotomienarbe. *Der Unfallchirurg* 96, 662-664.
- Romano, C.L., Duci, D., Romano, D., Mazza, M., Meani, E., 2004. Celecoxib versus indomethacin in the prevention of heterotopic ossification after total hip arthroplasty. *J Arthroplasty* 19, 14-18.
- Rosin, A.J., 1975. Ectopic calcification around joints of paralysed limbs in hemiplegia, diffuse brain damage, and other neurological diseases. *Ann Rheum Dis* 34, 499-505.
- Rossier, A.B., Bussat, P., Infante, F., Zender, R., Courvoisier, B., Muhelm, G., Donath, A., Vasey, H., Taillard, W., Lagier, R., Gabbiani, G., Baud, C.A., Pouezat, J.A., Very, J.M., Hachen, H.J., 1973. Current facts of para-osteo-arthropathy (POA). *Paraplegia* 11, 38-78.
- Rubayi, S., Ambe, M.K., Garland, D.E., Capen, D., 1992. Heterotopic ossification as a complication of the staged total thigh muscles flap in spinal cord injury patients. *Ann Plast Surg* 29, 41-46.
- Rumi, M.N., Deol, G.S., Singapuri, K.P., Pellegrini, V.D., Jr., 2005. The origin of osteoprogenitor cells responsible for heterotopic ossification following hip surgery: an animal model in the rabbit. *J Orthop Res* 23, 34-40.

- Russell, R.G., Fleisch, H., 1975. Pyrophosphate and diphosphonates in skeletal metabolism. Physiological, clinical and therapeutic aspects. *Clin Orthop Relat Res*, 241-263.
- Sampath, T.K., Reddi, A.H., 1983. Homology of bone-inductive proteins from human, monkey, bovine, and rat extracellular matrix. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80, 6591-6595.
- Santos-Benito, F.F., Munoz-Quiles, C., Ramon-Cueto, A., 2006. Long-term care of paraplegic laboratory mammals. *J Neurotrauma* 23, 521-536.
- Sawyer, J.R., Myers, M.A., Rosier, R.N., Puzas, J.E., 1991. Heterotopic ossification: clinical and cellular aspects. *Calcif Tissue Int* 49, 208-215.
- Schäfer, S.A., 2014. Inflammation und Angiogenese in der frühen Phase der Frakturheilung bei spinalem Trauma. *Vet med Diss*, Giessen.
- Schaeffer, M.A., Sosner, J., 1995. Heterotopic ossification: treatment of established bone with radiation therapy. *Arch Phys Med Rehabil* 76, 284-286.
- Scheff, S.W., Rabchevsky, A.G., Fugaccia, I., Main, J.A., Lump, J.E., Jr., 2003. Experimental modeling of spinal cord injury: characterization of a force-defined injury device. *J Neurotrauma* 20, 179-193.
- Scher, A.T., 1976. The incidence of ectopic bone formation in post-traumatic paraplegic patients of different racial groups. *Paraplegia* 14, 202-206.
- Schmoekel, H.G., Weber, F.E., Schense, J.C., Gratz, K.W., Schawalder, P., Hubbell, J.A., 2005. Bone repair with a form of BMP-2 engineered for incorporation into fibrin cell ingrowth matrices. *Biotechnol Bioeng* 89, 253-262.
- Schneider, D.J., Moulton, M.J., Singapuri, K., Chinchilli, V., Deol, G.S., Krenitsky, G., Pellegrini, V.D., Jr., 1998. The Frank Stinchfield Award. Inhibition of heterotopic ossification with radiation therapy in an animal model. *Clin Orthop Relat Res*, 35-46.
- Schurch, B., Capaul, M., Vallotton, M.B., Rossier, A.B., 1997. Prostaglandin E2 measurements: their value in the early diagnosis of heterotopic ossification in spinal cord injury patients. *Arch Phys Med Rehabil* 78, 687-691.
- Schwartz, G., Fehlings, M.G., 2001. Evaluation of the neuroprotective effects of sodium channel blockers after spinal cord injury: improved behavioral and neuroanatomical recovery with riluzole. *J Neurosurg* 94, 245-256.
- Seeherman, H., Li, R., Wozney, J., 2003. A review of preclinical program development for evaluating injectable carriers for osteogenic factors. *J Bone Joint Surg Am* 85-A Suppl 3, 96-108.
- Seibel, M.J., 2005. Biochemical markers of bone turnover: part I: biochemistry and variability. *Clin Biochem Rev* 26, 97-122.
- Seibel, M.J., 2006a. Biochemical markers of bone turnover part II: clinical applications in the management of osteoporosis. *Clin Biochem Rev* 27, 123-138.

- Seibel, M.J., 2006b. Clinical application of biochemical markers of bone turnover. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 50, 603-620.
- Seibold, H.R., Davis, C.L., 1967. Generalized myositis ossificans (familial) in pigs. *Pathol Vet* 4, 79-88.
- Selle, R.W., Urist, M.R., 1961. Calcium deposits and new bone formation in muscle in rabbits. *J Surg Res* 1, 132-141.
- Sena, K., Sumner, D.R., Viridi, A.S., 2010. Effect of recombinant human transforming growth factor-beta2 dose on bone formation in rat femur titanium implant model. *J Biomed Mater Res A*, 1210-1217.
- Seyedin, S.M., Thompson, A.Y., Bentz, H., Rosen, D.M., McPherson, J.M., Conti, A., Siegel, N.R., Galluppi, G.R., Piez, K.A., 1986. Cartilage-inducing factor-A. Apparent identity to transforming growth factor-beta. *J Biol Chem* 261, 5693-5695.
- Shehab, D., Elgazzar, A.H., Collier, B.D., 2002. Heterotopic ossification. *J Nucl Med* 43, 346-353.
- Shields, L.B., Raque, G.H., Glassman, S.D., Campbell, M., Vitaz, T., Harpring, J., Shields, C.B., 2006. Adverse effects associated with high-dose recombinant human bone morphogenetic protein-2 use in anterior cervical spine fusion. *Spine* 31, 542-547.
- Shore, E.M., Xu, M., Feldman, G.J., Fenstermacher, D.A., Cho, T.J., Choi, I.H., Connor, J.M., Delai, P., Glaser, D.L., LeMerrer, M., Morhart, R., Rogers, J.G., Smith, R., Triffitt, J.T., Urtizbera, J.A., Zasloff, M., Brown, M.A., Kaplan, F.S., 2006. A recurrent mutation in the BMP type I receptor ACVR1 causes inherited and sporadic fibrodysplasia ossificans progressiva. *Nat Genet* 38, 525-527.
- Silver, J.R., 1969. Heterotopic ossification. A clinical study of its possible relationship to trauma. *Paraplegia* 7, 220-230.
- Singh, R.S., Craig, M.C., Katholi, C.R., Jackson, A.B., Mountz, J.M., 2003. The predictive value of creatine phosphokinase and alkaline phosphatase in identification of heterotopic ossification in patients after spinal cord injury. *Arch Phys Med Rehabil* 84, 1584-1588.
- Smith, R., 1987. Head injury, fracture healing and callus. *J Bone Joint Surg Br* 69, 518-520.
- Smith, R., Triffitt, J.T., 1986. Bones in muscles: the problems of soft tissue ossification. *Q J Med* 61, 985-990.
- Snoecx, M., De Muynck, M., Van Laere, M., 1995. Association between muscle trauma and heterotopic ossification in spinal cord injured patients: reflections on their causal relationship and the diagnostic value of ultrasonography. *Paraplegia* 33, 464-468.
- Spencer, R.F., 1987. The effect of head injury on fracture healing. A quantitative assessment. *J Bone Joint Surg Br* 69, 525-528.

- Spielman, G., Gennarelli, T.A., Rogers, C.R., 1983. Disodium etidronate: its role in preventing heterotopic ossification in severe head injury. *Arch Phys Med Rehabil* 64, 539-542.
- Stokes, B.T., 1992. Experimental spinal cord injury: a dynamic and verifiable injury device. *J Neurotrauma* 9, 129-131; discussion 131-124.
- Stover, S.L., Hataway, C.J., Zeiger, H.E., 1975. Heterotopic ossification in spinal cord-injured patients. *Arch Phys Med Rehabil* 56, 199-204.
- Stover, S.L., Hahn, H.R., Miller, J.M., 3rd, 1976. Disodium etidronate in the prevention of heterotopic ossification following spinal cord injury (preliminary report). *Paraplegia* 14, 146-156.
- Stover, S.L., Niemann, K.M., Tulloss, J.R., 1991. Experience with surgical resection of heterotopic bone in spinal cord injury patients. *Clin Orthop Relat Res*, 71-77.
- Suutre, S., Toom, A., Arend, A., Selstam, G., 2009. Bone tissue content of TGF-beta2 changes with time in human heterotopic ossification after total hip arthroplasty. *Growth Factors* 27, 114-120.
- Suutre, S., Toom, A., Arend, A., Selstam, G., 2010. Involvement of BMP-2, TGF-β2 and TGF-β3 signaling in initial and early stages of heterotopic ossification in a rat experimental model. *Scand J Lab Anim Sci* 37.
- Szabo, Z., Ritzl, F., Chittima, S., Laszlo, G.A., Neumann, C., 1982. Bone scintigraphy of myositis ossificans in apallic syndrome. *Eur J Nucl Med* 7, 426-428.
- Taly, A.B., Nair, K.P., Kumar, M.V., Jayakumar, P.N., Vasudev, M.K., Ravishankar, D., Kalaivant, P.L., Padankatty, B.S., Murali, T., 1999. Heterotopic ossification in non-traumatic myelopathies. *Spinal cord* 37, 47-49.
- Tannous, O., Stall, A.C., Griffith, C., Donaldson, C.T., Castellani, R.J., Jr., Pellegrini, V.D., Jr., 2013. Heterotopic bone formation about the hip undergoes endochondral ossification: a rabbit model. *Clin Orthop Relat Res* 471, 1584-1592.
- ten Dijke, P., Iwata, K.K., Goddard, C., Pieler, C., Canalis, E., McCarthy, T.L., Centrella, M., 1990. Recombinant transforming growth factor type beta 3: biological activities and receptor-binding properties in isolated bone cells. *Moll Cell Biol* 10, 4473-4479.
- Toffoli, A.M., Gautschi, O.P., Frey, S.P., Filgueira, L., Zellweger, R., 2008. From brain to bone: evidence for the release of osteogenic humoral factors after traumatic brain injury. *Brain Inj* 22, 511-518
- Toom, A., Suutre, S., Arend, A., Märtson, A., 2006. Cellular dynamics in bone formation. A biomaterial based model. *J Biomech* 39, 217.
- Toom, A., Arend, A., Gunnarsson, D., Ulfspärre, R., Suutre, S., Haviko, T., Selstam, G., 2007. Bone formation zones in heterotopic ossifications: histologic findings and increased expression of bone morphogenetic protein 2 and transforming growth factors beta2 and beta3. *Calcif Tissue Int* 80, 259-267.

- Toom, A., Suutre, S., Martson, A., Haviko, T., Selstam, G., Arend, A., 2010. 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. *J Bone Joint Surg Br* 92, 298-303.
- Trentz, O.A., Handschin, A.E., Bestmann, L., Hoerstrup, S.P., Trentz, O.L., Platz, A., 2005. Influence of brain injury on early posttraumatic bone metabolism. *Crit Care Med* 33, 399-406.
- Trueta, J., 1963. The role of the vessels in osteogenesis. *J Bone Joint Surg Br* 45, 402-418.
- Tsailas, P.G., Babis, G.C., Nikolopoulos, K., Soucacos, P.N., Korres, D.S., 2009. The effectiveness of two COX-2 inhibitors in the prophylaxis against heterotopic new bone formation: an experimental study in rabbits. *J Surg Res* 151, 108-114.
- Uludag, H., D'Augusta, D., Palmer, R., Timony, G., Wozney, J., 1999. Characterization of rhBMP-2 pharmacokinetics implanted with biomaterial carriers in the rat ectopic model. *J Biomed Mater Res* 46, 193-202.
- Uludag, H., D'Augusta, D., Golden, J., Li, J., Timony, G., Riedel, R., Wozney, J.M., 2000. Implantation of recombinant human bone morphogenetic proteins with biomaterial carriers: A correlation between protein pharmacokinetics and osteoinduction in the rat ectopic model. *J Biomed Mater Res* 50, 227-238.
- Urist, M.R., 1965. Bone: formation by autoinduction. *Science* 150, 893-899.
- Valentine, B.A., George, C., Randolph, J.F., Center, S.A., Fuhrer, L., Beck, K.A., 1992. Fibrodysplasia ossificans progressiva in the cat. A case report. *J Vet Intern Med* 6, 335-340.
- van Kuijk, A.A., Geurts, A.C., van Kuppevelt, H.J., 2002. Neurogenic heterotopic ossification in spinal cord injury. *Spinal cord* 40, 313-326.
- Vanden Bossche, L., Vanderstraeten, G., 2005. Heterotopic ossification: a review. *J Rehabil Med* 37, 129-136.
- Vanden Bossche, L.C., Van Maele, G., Wojtowicz, I., Bru, I., Decorte, T., De Muynck, M., Rimbaut, S., Vanderstraeten, G., 2009. Free radical scavengers versus methylprednisolone in the prevention of experimentally induced heterotopic ossification. *J Orthop Res* 27, 748-751.
- Vanicky, I., Urdzikova, L., Saganova, K., Cizkova, D., Galik, J., 2001. A simple and reproducible model of spinal cord injury induced by epidural balloon inflation in the rat. *J Neurotrauma* 18, 1399-1407.
- Vögelin, E., Brekke, J.H., Jones, N.F., 2000. Heterotope und orthotope Knochenbildung mit einem vaskularisierten Periostlappen, einer Matrix und rh-BMP-2 (bone morphogenetic protein) im Rattenmodell. *Mund Kiefer Gesichtschir* 4, 454-458.
- Volek-Smith, H., Urist, M.R., 1996. Recombinant human bone morphogenetic protein (rhBMP) induced heterotopic bone development in vivo and in vitro. *Proc Soc Exp Biol Med* 211, 265-272.

- Waldron, D., Pettigrew, V., Turk, M., Turk, J., Gibson, R., 1985. Progressive ossifying myositis in a cat. *J Am Vet Med Assoc* 187, 64-65.
- Walton, M., Rothwell, A.G., 1983. Reactions of thigh tissues of sheep to blunt trauma. *Clin Orthop Relat Res*, 273-281.
- Wang, E.A., Rosen, V., D'Alessandro, J.S., Bauduy, M., Cordes, P., Harada, T., Israel, D.I., Hewick, R.M., Kerns, K.M., LaPan, P., Luxenberg, D.P., McQuaid, D., Moutsatsos, I.K., Nove, J., Wozney, J.M., 1990. Recombinant human bone morphogenetic protein induces bone formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 2220-2224.
- Wang, D., Hu, Y., Zhao, G., Lu, R., Yang, G., Zheng, C., Xie, K., 1999. Preparation and assessment of heterotopic osteoinduction of beta-TCP/rhBMP-2 composite. *Chin J Traumatol* 2, 13-16.
- Warren, H.B., Carpenter, J.L., 1984. Fibrodysplasia ossificans in three cats. *Vet Pathol* 21, 495-499.
- Weiss, S., Grosswasser, Z., Ohri, A., Mizrahi, Y., Orgad, S., Efer, T., Gazit, E., 1979. Histocompatibility (HLA) antigens in heterotopic ossification associated with neurological injury. *J Rheumatol* 6, 88-91.
- Wharton, G.W., Morgan, T.H., 1970. Ankylosis in the paralyzed patient. *J Bone Joint Surg Am* 52, 105-112.
- Wildburger, R., Zarkovic, N., Egger, G., Petek, W., Meinitzer, A., Borovic, S., Zarkovic, K., Li, L., Stipancic, I., Trbojevic-Cepe, M., et al., 1995. Comparison of the values of basic fibroblast growth factor determined by an immunoassay in the sera of patients with traumatic brain injury and enhanced osteogenesis and the effects of the same sera on the fibroblast growth in vitro. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 33, 693-698.
- Wittenberg, R.H., Peschke, U., Botel, U., 1992. Heterotopic ossification after spinal cord injury. Epidemiology and risk factors. *J Bone Joint Surg Br* 74, 215-218.
- Wong, J.K., Sharp, K., Steward, O., 2009. A straight alley version of the BBB locomotor scale. *Exp Neurol* 217, 417-420.
- Wosczyzna, M.N., Biswas, A.A., Cogswell, C.A., Goldhamer, D.J., 2012. Multipotent progenitors resident in the skeletal muscle interstitium exhibit robust BMP-dependent osteogenic activity and mediate heterotopic ossification. *J Bone Miner Res* 27, 1004-1017.
- Wozney, J.M., Rosen, V., Celeste, A.J., Mitsock, L.M., Whitters, M.J., Kriz, R.W., Hewick, R.M., Wang, E.A., 1988. Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science* 242, 1528-1534.
- Yabuzoe, A., Yokoi, S., Sekiguchi, M., Momoi, Y., Ide, K., Nishifuji, K., Iwasaki, T., 2009. Fibrodysplasia ossificans progressiva in a Maine Coon cat with prominent ossification in dorsal muscle. *J Vet Med Sci* 71, 1649-1652.

- Yoshida, K., Bessho, K., Fujimura, K., Kusumoto, K., Ogawa, Y., Tani, Y., Iizuka, T., 1998. Osteoinduction capability of recombinant human bone morphogenetic protein-2 in intramuscular and subcutaneous sites: an experimental study. *J Craniomaxillofac Surg* 26, 112-115.
- Zaccalini, P.S., Urist, M.R., 1964. Traumatic Periosteal Proliferations in Rabbits. The Enigma of Experimental Myositis Ossificans Traumatica. *J Trauma* 4, 344-357.
- Zara, J.N., Siu, R.K., Zhang, X., Shen, J., Ngo, R., Lee, M., Li, W., Chiang, M., Chung, J., Kwak, J., Wu, B.M., Ting, K., Soo, C., 2011. High doses of bone morphogenetic protein 2 induce structurally abnormal bone and inflammation in vivo. *Tissue Eng Part A* 17, 1389-1399.

## 8 Tabellarischer Anhang

### Histologische Färbungen

#### A 1: Protokoll der Toluidinblau-Färbung

Arbeitsschritt	Reagenz/Lösung	Dauer, Anmerkung
Entparaffinieren	Roti®-Histol	4x5 min
Rehydrieren (Absteigende Alkoholreihe)	100 %, 96 %, 70 %, 50 % Isopropanol	4x5 min
Färben	Aqua dest Toluidinblau 0,03 %	2x3 min 4-8 min
Bläuen	Leitungswasser	3x auswaschen
Spülen	Aqua dest	5 min
Entwässerung (Aufsteigende Alkoholreihe)	96 %, 100 %, 100 % Isopropanol	3x20 s
Klären	Roti®-Histol	4x3 min
Eindecken	Roti®-Histokitt	

#### A 2: Protokoll der Nissl-Färbung

Arbeitsschritt	Lösung	Dauer, Anmerkung
	Chloroform: Ethanol 1:1	30 min
Rehydrieren (absteigende Alkoholreihe)	100 %, 95 %, 70 %, 50 % Ethanol	4x2 min
Spülen	Aqua bidest	2 min
Färben	Thionin 1 %	30 s -5 min
Spülen	Aqua bidest	2x2 min
Entwässern (aufsteigende Alkoholreihe)	50 %, 70 %, 95 %, 100 % Ethanol	4x2 min
	100 % Isopropanol	3x 50mal Eintauchen über 2 min
	Neoclear	3x 50mal Eintauchen über 2 min
Eindecken	NeoMount®	



**Kategorien BBB-Score**

**A 3: The 21-point Basso, Beattie, Bresnahan locomotor rating scale**

Score	Definitions of categories
0	No observable hindlimb (HL) movement
1	Slight movement of one or two joints, usually the hip and /or knee
2	Extensive movement of one joint or extensive movement of one joint and slight movement of one other joint
3	Extensive movement of two joints
4	Slight movement of all three joints of the HL
5	Slight movement of two joints and extensive movement of the third
6	Extensive movement of two joints and slight movement of the third
7	Extensive movement of all three joints of the HL
8	Sweeping with no weight support or plantar placement of the paw with no weight support
9	Plantar placement of the paw with weight support in stance only (i.e., when stationary) or occasional, frequent, or consistent weight supported dorsal stepping and no plantar stepping
10	Occasional weight supported plantar steps, no forelimb (FL)-HL coordination
11	Frequent to consistent weight supported plantar steps and no FL-HL coordination
12	Frequent to consistent weight supported plantar steps and occasional FL-HL coordination
13	Frequent to consistent weight supported plantar steps and frequent FL-HL coordination
14	Consistent weight supported plantar steps, consistent FL-HL coordination; and predominant paw position during locomotion is rotated (internally or externally) when it makes initial contact with the surface as well as just before it is lifted off at the end of stance or Frequent plantar stepping, consistent FL-HL coordination, and occasional dorsal stepping
15	Consistent plantar stepping and consistent FL-HL coordination; and no toe clearance or occasional toe clearance during forward limb advancement; predominant paw position is parallel to the body at initial contact
16	Consistent plantar stepping and consistent FL-HL coordination during gait; and toe clearance occurs frequently during forward limb advancement; predominant paw position is parallel at initial contact and rotated at lift off
17	Consistent plantar stepping and consistent FL-HL coordination during gait; and toe clearance occurs frequently during forward limb advancement; predominant paw position is parallel at initial contact and lift off
18	Consistent plantar stepping and consistent FL-HL coordination during gait; and toe clearance occurs consistently during forward limb advancement; predominant paw position is parallel at initial contact and rotated at lift off
19	Consistent plantar stepping and consistent FL-HL coordination during gait; and toe clearance occurs consistently during forward limb advancement; predominant paw position is parallel at initial contact and lift off; and tail is down part or all of the time
20	Consistent plantar stepping and consistent coordinated gait; consistent toe clearance; predominant paw position is parallel at initial contact and lift off; tail consistently up; and trunk instability
21	Consistent plantar stepping and coordinated gait, consistent toe clearance, predominant paw position is parallel throughout stance, consistent trunk stability, tail consistently up

FL: forelimb; HL: hindlimb.

Tabelle entnommen aus Basso et al., 1995.

**A 4: Gruppe ASCI: Einzelwerte für Gewicht, *actual force*, *Displacement* und BBB-Score**

Tier	Gewicht in g	actual force in kdyn	Displacement in $\mu\text{m}$	BBB-Score Tag 1	BBB-Score Tag 28
1	257	204	1287	7	17
2	268	213	1658	0	10
3	270	204	1181	2	18
4	290	203	1534	0,5	12
5	264	201	1075	3,5	15

**A 5: Originaldaten ELISA**

BALP OD 450+ 540 nm	Mittelwert OD	Crosslaps OD 450+ 540 nm	Mittelwert OD	TGF $\beta$ 2 OD 450+ 540 nm	Mittelwert OD	VEGF OD 450+ 540 nm	Mittelwert OD
Haupt- studie Kontrolle	2,169	Haupt- studie Kontrolle	0,1525	Haupt- studie Kontrolle	1,999	Haupt- studie Kontrolle	0,17
	2,223		0,1675		1,805		0,2005
	1,643		0,1355		1,7675		0,1725
	1,6645		0,1365		1,8225		0,1545
	1,6475		0,182		1,951		0,165
Haupt- studie ASCI	1,7365	Haupt- studie ASCI	0,281	Haupt- studie ASCI	2,142	Haupt- studie ASCI	0,1245
	1,65		0,285		2,2305		0,1075
	1,5925		0,3185		2,744		0,1525
	1,9645		0,139		1,9635		0,1435
	1,8445		0,246		2,0225		0,116
Norm	1,2155	Norm	0,1065	Norm	1,721	Norm	0,1045
			0,1115		1,7375		0,131
			0,112		1,66		0,1115

OD: optische Dichte.

## Materialien

<b>Chemikalien und Reagenzien</b>	
<b>Bezeichnung</b>	<b>Bezugsquelle</b>
Aceton	Merck KGaA, Darmstadt
Aquatex®	
HCl	
NaOH	
NeoMount® Eindeckmedium	
PFA	
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethane	
BSA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
EDTA	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Essigsäure	
Isopropanol	
Paraffin: Paraplast® X-TRA	
Roti®-Histokitt	
Roti®-Histol	
Xylol	
Tissue-Tek®	Weckert, Kitzingen
<b>Puffer und Lösungen</b>	
<b>Bezeichnung</b>	<b>Zusammensetzung</b>
Phosphat-Puffer nach Sørensen	9,078 g/l Kaliumdihydrogenphosphat, 11,876 g/l Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat, pH 7
PBS	8 g/l NaCl, 0,2 g/l KCl, 1,44 g/l Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 0,24 g/l KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 7,4
PFA (4 %)	40 g/l PFA in PBS
TBS (10x)	8,77 g/l NaCl, 6,07 g/l Tris
<b>Enzyme, Wachstumsfaktoren, Immunhistologie</b>	
<b>Bezeichnung</b>	<b>Bezugsquelle</b>
Proteinase K	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Fast Red Tablets	
Vectastain ABC-AP Kit Standard, AK- 5000	Vector Laboratories, Burlingame, California, USA
rhBMP-2, InductOs 12mg Kit	Wyeth Pharmaceuticals, New Lane, United Kingdom

## Materialien

### Antikörper

Bezeichnung	Bezugsquelle
Mouse anti-rat CD68	Abcam plc, Cambridge, United Kingdom
Goat anti-Mouse IgG	Jackson ImmunoResearch Inc., West Grove, Pennsylvania, USA

### Farblösungen

Bezeichnung	Bezugsquelle
Eosin	Chroma GmbH & Co. KG, Münster
Hämalaun nach Meyer	
Giemsa Stain, Fluka <sup>®</sup> Analytical	Sigma-Aldrich, Steinheim
Toluidinblau	

### ELISA Kits

Bezeichnung	Bezugsquelle
Rat BALP-ELISA (Cusabio)	Hölzel Diagnostika, Köln
Rat Crosslaps-ELISA (Cusabio)	
Rat TGF- $\beta$ 2-ELISA (Cusabio)	
Rat VEGF-ELISA (Cusabio)	

### Arzneimittel

Bezeichnung	Bezugsquelle
Atipamezolhydrochlorid (Antisedan <sup>®</sup> )	Janssen-Cilag GmbH, Neuss
Fentanyl (Fentanyl-Janssen <sup>®</sup> )	
Medetomidinhydrochlorid (Domitor <sup>®</sup> )	
Gentamicinsulfat (Refobacin <sup>®</sup> )	Merck KGaA, Darmstadt
Ketaminhydrochlorid (Ketamin <sup>®</sup> )	MEDISTAR GmbH Arzneimittelvertrieb, Ascheberg
Midazolam (Dormicum <sup>®</sup> )	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Doxapramhydrochlorid (Doxapram-V <sup>®</sup> )	Albrecht GmbH, Aulendorf
Buprenorphin (Temgesic <sup>®</sup> )	RB Pharmaceuticals Limited, Berkshire, United Kingdom
Naloxonhydrochlorid (Naloxon Inresa <sup>®</sup> )	Inresa GmbH & Co. KG, Freiburg
Heparin-Natrium 25000	ratiopharm GmbH, Ulm
Flumazenil	Fresenius Kabi GmbH, Bad Homburg
Aqua ad injectabilia	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Glucose Monohydrat 5 %	
Isotone Natrium-Chlorid-Lsg. 0,9 %	
Povidon-Jod (Braunovidon <sup>®</sup> Salbe)	
Xylazinhydrochlorid (Rompun <sup>®</sup> )	Bayer AG, Leverkusen
5 % Dexpanthenol (Bepanthen <sup>®</sup> Augen- und Nasensalbe)	

## Materialien

<b>Tierhaltungs- und OP-Bedarf</b>	
<b>Bezeichnung</b>	<b>Bezugsquelle</b>
Einweg-Spritzen	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Einweg-Kanülen	
Händedesinfektion (PromanumN <sup>®</sup> )	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Polyvinylpyrrolidon (Braunosan Vet <sup>®</sup> )	
Povidon-Iod (Braunol <sup>®</sup> 7,5 %)	
Thermometer	Henry Schein VET GmbH, Hamburg
Wundklammern nach Michel	
Zinkoxid-Spray	
Flächendesinfektion (Bacillol <sup>®</sup> AF)	BODE Chemie GmbH, Hamburg
Seife (Baktolin sensitive <sup>®</sup> )	
Wärmematte	Labotect Labor-Technik-Göttingen GmbH, Göttingen
Wärmematte für Kleintiere	Gaymar Industries, Inc. /Eickemeyer
Pumpe mit Wasserzirkulation	Medizintechnik für Tierärzte KG, Tuttlingen
Kompressen	PAUL HARTMANN AG, Heidenheim
Arbeitsunterlage (Molinea)	
Handtücher Tork Advanced	SCA Hygiene Products AFH Sales GmbH, Mannheim
Leukoplast <sup>®</sup> Tape	Bsn medical GmbH, Hamburg
Schermaschine (Elektra)	Aesculap AG, Tuttlingen
Schermaschine (Exacta)	
OP-Instrumente (Nadelhalter, Schere, Pinzetten, Klemmen)	
OP-Instrumente (Wundspreizer, Raspatorium, Schere, Pinzette, Rongeur)	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg
Einwegskalpelle steril	Feather Safety Razor Co., Ltd., Osaka, Japan
Sterile Handschuhe	Semperit GmbH., Wien, Österreich
Handschuhe:	
Nitra-Tex micro-touch (Nitril)	Ansell LTD, Red Bank, New Jersey, USA
Peha-soft (Latex)	Paul Hartmann AG, Heidenheim
Chirurgisches Nahtmaterial	Ethicon GmbH, Norderstedt
Abdecktuch steril Raucodrape <sup>®</sup>	Lohmann & Rauscher GmbH & Co. KG, Neuwied
Schlitztuch transparent Steri-Drape	3M Health Care, Neuss
Nagerfutter	Ssniff Spezialitäten GmbH, Soest
Einstreu	
Grießbrei Vanille	Bebivita GmbH, München
Makrolonkäfige	Tecniplast DE GmbH, Hohenpreißenberg
Gitterdeckel	
Tränkflaschen	

## Materialien

<b>Laborbedarf</b>	
<b>Bezeichnung</b>	<b>Bezugsquelle</b>
Eppendorfgefäße	Steinbrenner Laborsysteme GmbH, Wiesenbach
Pipetten	Eppendorf Vertrieb Deutschland, Wesseling-Berzdorf
Pipettenspitzen Falcon, steril, 50ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Objektträger Deckgläser	Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig
Objektträger-Kasten	neoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH, Heidelberg
Biopsiestanze	Stiefel Laboratorium GmbH; Offenbach am Main
Pipetus®	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Reinstwasseranlage, purelab Option-Q	ELGA LabWater VWS Deutschland GmbH, Celle
Parafilm®	Sigma-Aldrich, Steinheim
Einbettförmchen	R. Jung, Heidelberg
<b>Trägermaterialien</b>	
<b>Bezeichnung</b>	<b>Bezugsquelle</b>
β-Trikalziumphosphat	Robert Mathys Foundation (RMS), Bettlach, Schweiz
Kollagenvlies Jason®	aaa Implantate AG, Berlin
<b>Geräte</b>	
<b>Bezeichnung</b>	<b>Bezugsquelle</b>
Kryotom Hyrax M 60 Schlittenmikrotom Microm HM 430	MICROM GmbH, Walldorf
Heizplatte 13800 Wärmebad	MEDAX Nagel GmbH Kiel
Wärmeschrank T 6060 Wärmeschrank B 12	Heraeus Instruments, Hanau
Vortex Mixer, 7-2020	Neo Lab, Heidelberg
Paraffinautomat Leica EG 1120 Schlittenmikrotom Jung Histoslide	Leica Microsystems Wetzlar GmbH
Abzug IH Spinal Cord Impactor (IH-0400)	Grittmann Laborbau Heidelberg Precision Systems & Instrumentation, Lexington, Kentucky, USA
SkyScan-1076 in-vivo Mikro-CT-System	SkyScan, Antwerpen, Belgien
Zentrifuge Megafuge 3.0 R	MS-L GmbH, Dielheim
ELISA MRX Lesegerät	Dynatech Technologies, Chantilly, Virginia, USA
Gefriertrockner AdVantage	VirTis, SP Industries, Warminster, Pennsylvania, USA

## Materialien

---

<b>Bezeichnung</b>	<b>Bezugsquelle</b>
Mikroskopsystem Axioplan 2 Imaging Axio Cam HRC	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Mikroskop Olympus BH-2	Olympus Deutschland GmbH, Hamburg
Vakuumschrank Vacutherm Zentrifuge Biofuge Pico	Kendro Laboratory Products GmbH, Hanau
pH-Meter	Mettler-Toledo GmbH, Giessen
Laborschüttler UNI MAX 1010	Heidolph Instruments GmbH & Co KG, Kehlheim

### Software

Axio Vision Rel. 4.6.3.0, © 2006-2008, Adobe Systems Incorporated, Carl Zeiss AG, Oberkochen
CT Analyzer 1.9.2.5., © 2003-2008, SkyScan, Antwerpen, Belgien
Microsoft Office Word, Excel, Power Point 2013, © Microsoft Corporation, Redmond, US
NRecon Rekonstruktionssoftware 1.5.1.5, © 1983-2008, SkyScan, Antwerpen, Belgien
SkyScan-1076 in-vivo MicroCT 2.6.5, © 1983-2008, SkyScan, Antwerpen, Belgien
Impactor software; PSI (Precision Systems and Instrumentation); Lexington, Kentucky, USA
SPSS 16.0 for Windows®, © 1989-2007, IBM Corporation, Armonk, New York, USA

## Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
ABC-AP	Avidin-Biotin-Komplex-Alkalische Phosphatase
AK	Antikörper
ALP	alkalische Phosphatase (alkaline phosphatase)
Aqua bidest	Zweifach destilliertes (bidestilliertes) Wasser
Aqua dest	Destilliertes Wasser
ASBMR	American Society for Bone and Mineral Research
ASCI	Akutes spinales Trauma (acute spinal cord injury)
BALP	knochenspezifische alkalische Phosphatase (bone-specific alkaline phosphatase)
BBB-Score	Basso Beattie Bresnahan-Score
b-FGF	basic fibroblast growth factor
BGW	Bindegewebe
BMP	Knochenmorphogeneseprotein (bone morphogenetic protein)
BS	Knochenoberfläche (bone surface)
BSA	Bovines Serumalbumin
BV	Knochenvolumen (bone volume)
ca.	circa
CCD	Charge-coupled Device
CD	cluster of differentiation
cm	Zentimeter
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
COX	Cyclooxygenase
DF	Dosisfindung
DNA	Desoxyribonukleinsäure (deoxyribonucleic acid)
ED1	monoklonaler Antikörper-Klon (clone number)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	epidermal growth factor
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
FGF	fibroblast growth factor
FOP	Fibrodysplasia ossificans progressiva
g	Gramm
Gr.	Gruppe
Gy	Gray
h	Stunde
HE	Hämatoxylin-Eosin
HGM	Hintergliedmaße
HKM	Hämatopoetisches Knochenmark
HO	Heterotope Ossifikation
HRP	Meerrettichperoxidase (horse radish peroxidase)
HS	Hauptstudie
i. m.	intramuskulär
IGF-1	Insulin-like growth factor 1
IgG	Immunglobulin G
IH	Infinite Horizon
K	Konstrukt
kdyn	Kilodyn
KG	Körpergewicht
kg	Kilogramm



## Abkürzungsverzeichnis

---

KM	Knochenmark
kV	Kilovolt
l	Liter
M	Molar (mol/l)
M.	Musculus
mbar	Millibar
mg	Milligramm
Mikro-CT	Mikro-Computertomographie
min	Minute
mm	Millimeter
mm <sup>3</sup>	Kubikmillimeter
MW	Mittelwert
NaCl	Natriumchlorid
NHO	Neurogene heterotope Ossifikation
NSAID	Nichtsteroidale Antiphlogistika (non-steroidal anti-inflammatory drugs)
NSAR	Nichtsteroidale Antirheumatika
Nse	Neuronenspezifische Enolase (neuron specific enolase)
Obj.	Objektiv
OD	Optische Dichte
OP	Operation
OPLA/HY	Polylaktatsäure (polylactic acid)/Hyaluronsäure
PA	Pilotstudie ASCI
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (phosphate buffered saline)
PFA	Paraformaldehyd
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H <sup>+</sup> /H <sub>3</sub> O <sup>+</sup> -Ionenkonzentration
PK	Pilotstudie Kontrolle
post OP	post operationem
rhBMP	Rekombinantes humanes Knochenmorphogeneseprotein (recombinant human bone morphogenetic protein)
ROI	region of interest
rpm	Umdrehungen pro Min minute (rotations per min minute)
s	Sekunde
SCI	Rückenmarkverletzung (spinal cord injury)
SD	Sprague-Dawley
SHT	Schädel-Hirn-Trauma
β-TCP	beta-Tricalciumphosphat
STABW	Standardabweichung
Tb. N	Trabekelanzahl (trabecular number)
Tb. S	Trabekelabstand (trabecular separation)
Tb. Th	Trabekeldicke (trabecular thickness)
TBS	Trisgepufferte Kochsalzlösung (tris-buffered saline)
TGF-β	transforming growth factor-beta
Th	Brustwirbel
Ti	Titan
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TV	tissue volume/total volume
u.a.	unter anderem
VEGF	vascular endothelial growth factor
VGM	Vordergliedmaße
VOI	volume of interest
WS	Wirbelsäule
z.B.	zum Beispiel

## Vorsätze im Dezimalsystem

<b>Symbol</b>	<b>Potenz</b>	<b>Name</b>
f	$10^{-15}$	Femto
p	$10^{-12}$	Piko
n	$10^{-9}$	Nano
$\mu$	$10^{-6}$	Mikro
m	$10^{-3}$	Milli
k	$10^3$	Kilo

## Danksagungen

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Menschen bedanken, die mich bei dieser Dissertation unterstützt haben.

Ganz besonders danke ich meinem Doktorvater Herr Prof. Dr. Reinacher, der durch sein Fachwissen, seine konstruktive Kritik und die wertvollen Ratschläge trotz der räumlichen Entfernung entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Mein ebenso großer Dank gilt meinem Betreuer PD Dr. Egermann für die Überlassung des interessanten und herausfordernden Themas und die Gelegenheit des wissenschaftlichen Arbeitens in der Sektion Experimentelle Orthopädie des Universitätsklinikums Heidelberg. Mit seinem uneingeschränkten Engagement, seiner fachlichen Beratung und seiner positiven Art hat er mich bei dieser Arbeit kontinuierlich unterstützt.

Tausend Dank an meine Kolleginnen Svenja Schäfer und Lisa Seebach, die mir immer mit Rat und Tat zur Seite standen. Svenja Schäfer war mir eine unentbehrliche Stütze bei der Operationsassistenz und der Betreuung der Ratten und ich danke ihr sehr für die tolle Zusammenarbeit.

Lisa Seebach danke ich ganz herzlich für die Einweisung in die Technik der Immunhistologie, den kontinuierlichen wissenschaftlichen Input, das Korrekturlesen der Arbeit sowie für ihre vielen guten Ratschläge.

Des Weiteren geht mein herzlicher Dank an Jeannine Holschbach, die die Vorarbeiten zu dieser Studie leistete und mich wunderbar in den Umgang mit den Versuchstieren und in die Operationstechniken einarbeitete.

Bei der Leiterin der Sektion Experimentelle Orthopädie, Frau Prof. Dr. Richter, und bei allen Mitarbeitern der Forschungsabteilung möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit, die Hilfsbereitschaft sowie den kollegialen Umgang miteinander bedanken.

Besonders danke ich auch der gesamten Arbeitsgruppe der Sektion Experimentelle Paraplegiologie unter der Leitung von Herr Prof. Dr. Weidner und Herr Prof. Dr. Blesch für die Einweisung in die Operationstechnik des spinalen Traumas, die Möglichkeit der Benutzung aller notwendigen Materialien und die Unterstützung im Labor.

Im Speziellen danke ich Dipl.rer.soc. Simone Gantz für die Hilfe bei der statistischen Auswertung, Birgit Frey für die Einführung in histologische Techniken, Elena Tripel und Patrick Göthlich für die Unterstützung bei der ELISA-Technik und Joachim Schweidler für die Hilfe in allen EDV-Angelegenheiten.

Meiner Mutter und Florian bin ich besonders dankbar für ihre unermüdliche moralische Unterstützung und das Korrekturlesen des Manuskripts.

Schlussendlich danke ich den Versuchstieren, die diese Studie überhaupt erst ermöglicht haben. Durch ihr wunderbares Wesen haben sie meinen höchsten Respekt erlangt und der Umgang mit ihnen hat mich Vieles gelehrt.

## **Erklärung**

Ich erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt habe, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Viviana Grajales Robles