

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

Evaluation der Entwicklung heterotoper Ossifikationen durch Bone Sialoprotein
(BSP) im Muskel-Pouch-Modell der Ratte

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

Vorgelegt von

Bianca Schardt-Knauf
aus Günzburg

Mainz, 2025

Wissenschaftlicher Vorstand: Univ.-Prof. Dr. Hansjörg Schild

1. Gutachter:

2. Gutachter:

Tag der Promotion: 16. Juni 2025

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	5
Abbildungsverzeichnis	7
Tabellenverzeichnis	8
1 Einleitung und Zielsetzung der Arbeit	9
2 Literaturrecherche	11
2.1 Allgemeine Osteologie	11
2.1.1 Historischer Rückblick	11
2.1.2 Funktionen des Skeletts	11
2.1.3 Entwicklung, Reifung und Wachstum des Knochengewebes	12
2.1.4 Anatomischer Aufbau des Knochens.....	13
2.1.4.1 Allgemeine Architektur	13
2.1.4.2 Zusammensetzung des Knochengewebes	14
2.1.5 Knochenstoffwechsel	18
2.1.5.1 Mineralien.....	19
2.1.5.2 Hormone.....	21
2.1.5.3 Remodeling.....	23
2.1.6 Critical bone defect	25
2.2 Matrixproteine	26
2.2.1 Bone Morphogenic Protein	26
2.2.1.1 Aufbau und Wirkmechanismus des BMP	27
2.2.1.2 BMP als Allrounder Protein.....	28
2.2.2 Bone Sialoprotein	30
2.2.2.1 BSP-Aufbau und Wirkmechanismus.....	30
2.2.2.2 BSP-Vorkommen und Funktion.....	33
2.2.2.3 BSP und maligne Erkrankungen	35
2.3 Tissue Engineering	37
2.3.1 Techniken des Bone Tissue Engineering am Tiermodell	37
2.3.1.1 Heterotope Ossifikation.....	37
2.3.1.2 Muskel-Pouch-Modell.....	40
2.3.2 Biomaterialien	41
2.3.2.1 Bedeutung von Biomaterialien im Alltag	41
2.3.2.2 Arten von Biomaterialien	41
2.3.2.3 Knochenersatzgerüste	43
2.3.3 Therapiemöglichkeiten im klinischen Alltag.....	45
2.3.3.1 Autologe und allogene Knochen transplantation	45
2.3.3.2 Biologische Knochenersatzmaterialien	47
2.3.3.3 Osteoinduktive Wachstumsfaktoren	48
3 Material und Methoden	50
3.1 Material	50
3.1.1 Implantations- und Fixierungssubstanzen.....	50
3.1.2 Medikamente	51
3.1.3 Verbrauchsmaterial und Instrumentarien.....	52
3.1.4 Versuchstiere.....	52
3.1.5 Geräte.....	53
3.2 Methoden	54
3.2.1 Arbeiten an der Sterilbank	54
3.2.1.1 Vorbereiten der Pilotstudie	55
3.2.1.2 Vorbereiten der ersten Versuchsreihe.....	56

3.2.1.3	Vorbereiten der zweiten Versuchsreihe	57
3.2.2	Operatives Management.....	57
3.2.2.1	Operationstechnisches Vorgehen.....	58
3.2.2.2	Postoperatives Vorgehen.....	60
3.2.3	Diagnostik.....	61
3.2.3.1	Konventionelles Röntgen.....	61
3.2.3.2	Euthanasie und Probengewinnung.....	63
3.2.3.3	Mikrocomputertomographie.....	63
4	Ergebnisse.....	64
4.1	Pilotstudie	64
4.2	Erste Versuchsreihe	65
4.2.1	Beurteilung Negativkontrolle	66
4.2.2	Beurteilung BSP low dose.....	68
4.2.3	Beurteilung BSP high dose.....	70
4.2.4	Beurteilung Positivkontrolle.....	72
4.2.5	Mikro-CT.....	75
4.3	Zweite Versuchsreihe.....	79
4.4	Statistische Auswertung und Signifikanz	80
5	Diskussion	84
5.1	Diskussion der Studiengestaltung	85
5.1.1	Kontrollgruppen	85
5.1.2	Bone Sialoprotein	87
5.1.3	Trägersubstanz	87
5.1.4	Tiermodell und Muskel-Pouch-Technik.....	88
5.2	Diskussion der Ergebnisse	90
5.2.1	Interpretation der statistischen Auswertung	90
5.2.2	Bone Sialoprotein unterschiedlicher Konzentrationen	91
5.2.3	Bone Sialoprotein und Bone Morphogenic Protein	95
5.2.4	Lokalisationsabhängigkeit im Gewebe	98
5.3	Schlussfolgerung.....	100
6	Zusammenfassung	101
7	Literaturverzeichnis	103
8	Danksagung.....	121
9	Tabellarischer Lebenslauf.....	121

Abkürzungsverzeichnis

<i>μCT</i>	<i>Mikrocomputertomographie</i>
<i>μm</i>	<i>Mikrometer</i>
<i>ACTH</i>	<i>Adrenocorticotropes Hormon</i>
<i>AP</i>	<i>Alkalische Phosphatase</i>
<i>BMP</i>	<i>Bone morphogenic protein</i>
<i>BSP</i>	<i>Bone Sialoprotein</i>
<i>BSP_{hd}</i>	<i>BSP hoher Konzentration</i>
<i>BSP_{ld}</i>	<i>BSP niedriger Konzentration</i>
<i>Ca_sr</i>	<i>Calciumsensitiver Rezeptor</i>
<i>CRP</i>	<i>C-reaktives Protein</i>
<i>CSF</i>	<i>Colony stimulating factor</i>
<i>DKK1</i>	<i>Dickkopf related protein 1</i>
<i>ECM</i>	<i>Extrazellulärmatrix</i>
<i>FACIT-Kollagene</i>	<i>Fibrillen-assoziierte Kollagene</i>
<i>FGF</i>	<i>Fibroblast growth factor</i>
<i>FSH</i>	<i>Follikelstimulierendes Hormon</i>
<i>g</i>	<i>Gramm</i>
<i>GFR</i>	<i>Glomeruläre Filtrationsrate</i>
<i>GPCR</i>	<i>G-Protein gekoppelter Rezeptor</i>
<i>HER-2</i>	<i>Human epidermal growth receptor 2</i>
<i>HLA</i>	<i>Humanes Leukozyten Antigen</i>
<i>HO</i>	<i>Heterotope Ossifikation</i>
<i>IGF</i>	<i>Insulin-like Wachstumsfaktor</i>
<i>IL</i>	<i>Interleukin</i>
<i>kDa</i>	<i>Kilodalton</i>
<i>kg</i>	<i>Kilogramm</i>
<i>mg</i>	<i>Milligramm</i>
<i>mm</i>	<i>Millimeter</i>
<i>mmol/l</i>	<i>Millimol pro Liter</i>
<i>mTOR</i>	<i>Mammalian target of rapamycin</i>
<i>NaCl</i>	<i>Natriumchlorid</i>
<i>NFκB</i>	<i>Nuclear factor kappa B</i>

NK	<i>Negativkontrolle</i>
NO	<i>Stickstoff</i>
OPG	<i>Osteoprotegerin</i>
OPN	<i>Osteopontin</i>
p-AKT	<i>Phosphatidylinositol-3-kinase</i>
PCR	<i>Polymerase Kettenreaktion</i>
PDGF	<i>Platelet-derived growth factor</i>
PDL-Zellen	<i>Periodontal-ligament-Zellen</i>
PGE	<i>Prostaglandin</i>
PK	<i>Positivkontrolle</i>
PPi	<i>Pyrophosphat</i>
PTHrP	<i>Parathormon-verwandtes Peptid</i>
RANK	<i>Receptor activator of NF-κB</i>
RANKL	<i>Osteoprotegerin-Ligand</i>
RGD	<i>Arginin-Glycin-Asparaginsäure-Sequenz</i>
RIA	<i>Radioimmunassay</i>
SDF-1	<i>Stromal cell-derived factor 1</i>
SIBLING	<i>Small integrinbinding ligand n-linked glycoproteins</i>
SMAD	<i>Second messenger protein</i>
SMURF1	<i>Ubiquitin-Ligase</i>
TE	<i>Tissue Engineering</i>
TGF	<i>Transforming growth factor</i>
TNF	<i>Tumornekrosefaktor</i>
TSH	<i>Thyreotropin</i>
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schema anatomischer Aufbau von Knochengewebe [20].....	14
Abbildung 2: Zusammensetzung des Knochengewebes schematisch dargestellt [eigene Quelle in Anlehnung 31, 32].....	15
Abbildung 3: Vereinfachtes Schema der Aktivierung von Osteozyten [30].....	18
Abbildung 4: Calciumstoffwechsel beim Erwachsenen [40].....	20
Abbildung 5: Überblick Remodeling von Knochengewebe [60].....	24
Abbildung 6: BMP-Signalweg [76].....	28
Abbildung 7: Schematische Darstellung der BSP-Struktur [99].....	31
Abbildung 8: Interaktion BSP mit Endothelzellen, Osteoklasten und Tumorzellen [125].....	32
Abbildung 9: Morphologie und skelettale Morphometrie von BSP-Knockout-Mäusen [105].....	34
Abbildung 10: Arten von Biomaterialien Übersicht [eigene Quelle in Anlehnung 187-197].....	42
Abbildung 11: Darstellung der Herstellungsmethoden von Knochenersatzgerüsten [158].....	45
Abbildung 12: Arbeiten an der Sterilbank, Vorbereitung der Kollagenscaffolds in der Petrischale (links), Pipettieren der Untersuchungssubstanz auf Schwämmchen (rechts).....	55
Abbildung 13: Operationstechnisches Vorgehen.....	60
Abbildung 14: Konventionelle Röntgendiagnostik (links Positivkontrolle in Bauchlage Tag 21, rechts in Rückenlage Tag 56 ohne Hinweis für HO).....	62
Abbildung 15: Röntgenaufnahmen der Pilotstudie (15a-b: re. Bein Negativkontrolle D21 (a) und D34 (b) ohne HO; 15c-d: re. Bein BSP niedrige Konzentration D21 (c) und D56 (d) ohne HO; 15e-f: re. Bein BSP höhere Konzentration D21 (e) und D56 (f) ohne HO); a,c,e in Rückenlage; b, d, f in Bauchlage.....	64
Abbildung 16: Röntgenaufnahmen der Negativkontrolle der ersten Versuchsreihe (16a-b: li. Bein (a) und re. Bein (b) an D6 ohne HO; 16c: re. Bein D34 mit HO-Nachweis).....	67
Abbildung 17: Röntgenaufnahmen unterschiedlicher BSPId Individuen der ersten Versuchsreihe mit HO-Nachweis im markierten Areal (17a: BSPId-1.5 re. Bein D14; 17b: BSPId-1.9 re. Bein D7 (b) und D36 (c) im Verlauf).....	69
Abbildung 18: Röntgenaufnahme der BSPhd der ersten Versuchsreihe mit HO-Nachweis im markierten Areal (BSPhd-1.10 li. Bein D14).....	71
Abbildung 19: Röntgenaufnahmen der Positivkontrolle der ersten Versuchsreihe (PK1.5 li. Bein D7 (a) zunächst ohne HO; im Verlauf D14 (b) und D40 (c) mit HO-Nachweis im markierten Areal).....	73
Abbildung 20: μ CT-graphische 3D-Rekonstruktion Kontrollgruppen (Negativkontrolle: NK-1.5 re. Bein (a), NK-1.5 li. Bein (b) ohne HO; Positivkontrolle: PK-1.4 li. Bein (c), PK-1.5 re. Bein (d), PK-1.6 re. Bein (e), PK-1.8 li. Bein (f) mit HO-Nachweis).....	76
Abbildung 21: Volumen der einzelnen HO-Formationen aus Abbildung 20 (Negativkontrolle: NK-1.5 re. Bein (a), NK-1.5 li. Bein (b) kein Volumen bei fehlender HO; Positivkontrolle: PK-1.4 li. Bein (c), PK-1.5 re. Bein (d), PK-1.6 re. Bein (e), PK-1.8 li. Bein (f) in mm^3).....	76
Abbildung 22: μ CT-graphische 3D-Rekonstruktion BSPId sowie Negativkontrolle (BSPId: BSPId-1.5 li. Bein (a), BSPId-1.6 re. Bein (b), BSPId-1.8 li. Bein (c), BSPId-1.9 re. Bein (d) mit HO, Negativkontrolle: NK-1.1 re. Bein (e) ohne HO, NK-1.4 re. Bein (f) mit HO-Nachweis).....	78
Abbildung 23: Volumen der einzelnen HO-Formationen aus Abbildung 22 (BSPId: BSPId-1.5 li. Bein (a), BSPId-1.6 re. Bein (b), BSPId-1.8 li. Bein (c), BSPId-1.9 re. Bein (d) in mm^3); Negativkontrolle: NK-1.1 re. Bein (e) kein Volumen bei fehlender HO, NK-1.4 re. Bein (f) in mm^3).....	78
Abbildung 24a-c: Vermutetes Adhäsionsprofil Osteoblasten (OB) und BSP unterschiedlicher Konzentrationen.....	93
Abbildung 25: Anteil der Wachstumszonen unterschiedlicher Knochenanteile (rechts), prozentualer Anteil des Längenwachstums auf die gesamte untere Extremität bezogen (links) [238].....	98

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Knochenzellen Überblick [eigene Quelle in Anlehnung 19,21]	15
Tabelle 2: Hormoneller Regelkreislauf des ossären Stoffwechsels [eigene Quelle in Anlehnung an Quelle 50].....	22
Tabelle 3: Ektope Tissue-Engineering-Modelle in Ratten und Mäusen [141].....	39
Tabelle 4: Keramik-basierte Biomaterialien und ihr chemisches Verhalten [eigene Quelle in Anlehnung 188].....	42
Tabelle 5: Anforderungen an Knochenersatzgerüste [eigene Quelle in Anlehnung 186].....	44
Tabelle 6: Material, Implantations- und Fixierungssubstanzen.....	50
Tabelle 7: Material, Medikamente.....	51
Tabelle 8: Material, Verbrauchsmaterial und Instrumentar.....	52
Tabelle 9: Aufteilung der Versuchstiere.....	54
Tabelle 10: Methoden, Vorbereiten der Pilotstudie.....	55
Tabelle 11: Methoden, Vorbereiten der ersten Versuchsreihe	56
Tabelle 12: Methoden, Vorbereiten der zweiten Versuchsreihe	57
Tabelle 13: Präoperatives Vorgehen und Anästhesie, Anästhesie Wirkstoffe [eigene Quelle].....	58
Tabelle 14: Diagnostik, Konventionelles Röntgen, Schema der Verlaufskontrollen [eigene Quelle]....	62
Tabelle 15: Anzahl der Ossifikationen der ersten Versuchsreihe (blau: BSPhd, gelb: BSPld, rot: Negativkontrolle, grün: Positivkontrolle) im Zeitraum von sechs Wochen	66
Tabelle 16: HO-Formationen in [mm] BSPld Tag 7 bis 42.....	68
Tabelle 17: HO-Formationen in [mm] BSPhd Tag 7 bis 42.....	70
Tabelle 18: HO-Formationen in [mm] Positivkontrolle Tag 7 bis 42.....	72
Diagramm 19: Wöchentliche Durchschnittsgröße der Ossifikationen (blau: BSPhd, gelb: BSPld, grün: PK) in [mm] mit Bestimmung der maximalen Größe nach zwei Wochen	74
Diagramm 20: Anzahl der Ossifikationen der zweiten Versuchsreihe (blau: BSPhd, gelb: BSP ld, rot: NK, grün: PK) im Zeitraum von drei Wochen.....	79
Tabelle 21: Vergleich beider Versuchsreihen (Anzahl der implantierten Scaffolds, Anzahl der HO, Mittelwert der HO-Durchmesser im konventionellen Röntgen +/- Standardabweichung in mm).....	81
Diagramm 22: Durchschnittliche Größenverteilung der ersten Versuchsreihe Tag 7 - 42.....	82
Tabelle 23: Vergleich Eigenschaften BMP und BSP [82-84; 231-236].....	96

1 Einleitung und Zielsetzung der Arbeit

Der stetig wachsende Bevölkerungsanteil Menschen höheren Alters führt aktuell vermehrt zu Diskussionen in der Politik, gleichzeitig nimmt die Anzahl der Personen im erwerbsfähigen Alter weiter ab. Laut den Berechnungen des Statistischen Bundesamtes soll die Zahl der über 60-jährigen Menschen bis 2040 um etwa 28 % steigen. Doch nicht nur hierzulande stellt der demographische Wandel eine gesellschaftliche Herausforderung dar. Ähnliche Gegebenheiten zeigen sich ebenso in anderen Teilen Europas [1]. Eine alternde Bevölkerung führt besonders im Gesundheits- und Rentensystem zu zahlreichen Konflikten. Multimorbidität sowie Altersarmut spielen im Zuge dieser Thematik eine tragende Rolle. Das Ausmaß an Pathologien ändert sich auf lange Sicht, wodurch die Versorgung dem daraus resultierenden Bedarf neu angepasst werden muss. Neben der reinen Krankheitsbehandlung stehen hier zusätzlich die Erhaltung beziehungsweise Wiederherstellung der Autonomie, die soziale Teilhabe sowie die Lebensqualität in einem besonderen Fokus [2]. Degenerative Prozesse, eine erhöhte Sturzneigung sowie pathologische Frakturen nehmen mit zunehmendem Alter Einfluss auf die Beweglichkeit und Flexibilität eines Patienten. Gleichzeitig kommt es zu einer Abnahme der Knochendichte sowie der Regenerationsfähigkeit des Knochens, was die Fraktur- und Endoprothesenversorgung zusätzlich erschwert. Somit gewinnt der Einsatz von Knochenersatzmaterialien sowie osteoinduktiver Substanzen besonders für den Fachbereich der Orthopädie und Unfallchirurgie zunehmend an Bedeutung. Das wissenschaftliche Labor des Zentrums für Orthopädie und Unfallchirurgie der Universitätsmedizin Mainz befasst sich intensiv mit dieser Themengruppe. Anhand der heterotopen Ossifikation (HO) ist es möglich, osteoinduktive Eigenschaften eines Proteins aufzuzeigen. Als HO wird die Bildung von Knochengewebe an atypischer Lokalisation im Gewebe bezeichnet. Sie erfolgt durch Differenzierung von pluripotenten mesenchymalen Stammzellen zu knochenbildenden Osteoblasten, welche sowohl bei der Skelettentwicklung im Wachstumsalter als auch im Erwachsenenalter bei beispielsweise Regenerationsvorgängen zu tragen kommen. Knochengewebe besteht aus einem Netzwerk von ausdifferenzierten Osteozyten sowie den an Umbauvorgängen beteiligten Osteoblasten/-klasten, die in eine Extrazellulärmatrix (ECM) eingebettet sind [3]. Der extrazelluläre Raum, in welchem

sich Ablagerungen anorganischer Mineralsalze wie Hydroxylapatit befinden, wird größtenteils durch Kollagen Typ 1 und nichtkollagene Knochenproteinen wie unter anderem den small integrinbinding ligand N-linked glycoproteins (SIBLING) gebildet. Zur Familie der SIBLING gehören neben Osteopontin, Dentin Matrixprotein, Dentin Sialoprotein und Matrix Extrazellulärem Phosphoglycoprotein das Bone Sialoprotein (BSP), welches über eine Arg-Gly-Asp-Sequenz mithilfe von Integrin die Zelladhäsion sowie Signaltransduktion steuert und eine hochrangige Funktion hinsichtlich der Knochenmineralisierung besitzt [4]. In vitro und in vivo Versuche konnten bereits einen regulierenden Einfluss des BSP auf den Knochenstoffwechsel zeigen. Demnach haben zu Verkalkungen neigende Tumore die Fähigkeit zur Expression von BSP, welches beispielsweise bei Brustkrebs mit der Bildung von Knochenmetastasen assoziiert ist [5;112;120-127;229;243]. Dem Bone morphogenic Protein (BMP), welches in unterschiedlichen Geweben des menschlichen Körpers vorkommt, konnte bereits eine osteoinduktive Funktion zugeordnet werden. Über 40 dieser Proteine wurden anhand jahrelanger Untersuchungen isoliert und identifiziert, wovon das BMP-2 sowie BMP-7 bereits Anwendung im klinischen Alltag bei bestimmten orthopädisch-unfallchirurgischen Problemfällen (bspw. critical bone defect) finden [6, 7]. So gilt das BMP als Vorreiter hinsichtlich der Forschung ektopter Knochenentstehung sowie osteogener Proteine.

Im Rahmen dieser Dissertation sollte die Fähigkeit zur Induktion einer heterotopen Ossifikation durch BSP unterschiedlicher Konzentrationen in einem in vivo Modell geprüft werden. Insgesamt wurden 51 Ratten innerhalb eines genehmigten Tierversuchsvorhaben nach § 8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes (Tierversuchsnummer: 23177-07/G17-1-064) analog einer bereits experimentell etablierten Muskel-Pouch-Methode operiert. Das BMP diente hierbei zum einen als Positivkontrolle, zum anderen als quantitativer Vergleichswert. Als Negativkontrolle dienten Natriumchlorid (NaCl) sowie Aqua destillata. Bei den implantierten Substanzträgern handelte es sich um Kollagenschwämme. Zur Analyse der Knochenbildung wurden die Ratten in regelmäßigen Abständen radiologisch untersucht. Nach fachgerechter Absetzung der Tiere sowie Entnahme der Proben wurden diese zusätzlich im Mikro-CT ausgewertet.

2 Literaturrecherche

2.1 Allgemeine Osteologie

Das menschliche Skelett wird aus der Gesamtheit von über 200 Knochen gebildet. Die genaue Anzahl variiert je nach Individuum [8, 9]. Mit circa 10 kg trägt es ungefähr 15 % zum eigentlichen Körpergewicht bei. Grob kann das Knochengерüst aufgrund eines unterschiedlichen Knochenaufbaus/-stoffwechsels in einen axialen (Stamm) sowie peripheren (Extremitäten) Bereich unterteilt werden. Diese Einteilung spielt besonders in der klinischen Osteologie bei Erkrankungen wie der Osteoporose eine tragende Rolle [10].

2.1.1 Historischer Rückblick

Die Entstehung des Skeletts kann auf bis zu 550 Millionen Jahre zurückverfolgt werden. Verantwortlich hierfür waren vermutlich zahlreiche externe sowie interne Einflüsse. Ein zunehmendes Nährstoff- und Mineralienangebot innerhalb der Ozeane durch die Erderwärmung sowie als Folge von Gesteinsabtragungen stellten die Grundlage des ersten primitiven Knochengерüsts dar [11, 12, 13]. Unter zunächst Bildung eines sogenannten Exoskeletts, einem System bestehend aus mit Hartteilen verbundenen Muskeln, erfolgte im evolutionären Verlauf die Entstehung eines Endoskeletts als Vorläufer der primitiven Wirbelsäule. [11, 14, 15].

2.1.2 Funktionen des Skeletts

Das Skelett dient als Stütz- und Bewegungsapparat. Knochen sind paarig (Humerus) oder unpaarig (Os frontale) angelegt und bilden in Zusammenarbeit mit anderen Bindegewebsstrukturen (Bänder, Sehnen, Knorpel) den passiven Bewegungsapparat. Unter Einbeziehung der Skelettmuskulatur sind somit die Voraussetzung einer aktiven Motorik und damit der Fähigkeit zur Haltung des Körpers sowie der Mobilität gegeben. Der knöcherne Thorax, die Wirbelsäule sowie der Schädel schützen lebenswichtige Organe gegenüber externen Einflüssen. So führt beispielsweise ein Kontusionstrauma des Kopfes durch die äußere harte Schale sowie Einbettung des Hirns im

Liquorsystem meist nicht direkt zu einer Verletzung des cerebralen Parenchyms. Neben der reinen Biomechanik und Schutzfunktion erfüllt Knochengewebe noch weitere für den Organismus wichtige Aufgaben. Als größter Calciumspeicher und Träger des Knochenmarks spielt es im Rahmen des Mineralstoffwechsels sowie der Blutbildung eine überaus wichtige Rolle [10, 16, 17].

2.1.3 Entwicklung, Reifung und Wachstum des Knochengewebes

Intrauterin gegen Ende der Embryonal- und zu Beginn der Fetalperiode können grundsätzlich zwei Formen hinsichtlich der Entwicklung von Knochengewebe unterschieden werden. Bei der chondralen Ossifikation wird das knöcherne Gewebe über eine knorpelige Zwischenstufe gebildet. Das zunächst mesenchymale Bindegewebe entwickelt sich durch Parenchymverdichtung zu einem Primordialskelett bestehend aus hyalinem Knorpel, welcher folglich durch die Zusammenarbeit von Chondroklasten sowie Osteoblasten zu Knochengewebe umgebaut wird. Die chondrale Ossifikation kann von außen (perichondral) oder innen (endochondral) erfolgen, jedoch bleiben auch einige knorpelige Anteile unter anderem auf den Gelenkflächen letztlich bestehen. Bei der direkten Bildung von Osteoblasten aus pluripotenten Mesenchymzellen handelt es sich um die desmale Ossifikationsform. Hierbei fusionieren die durch die Osteoblasten gebauten kleineren Knochen trabekel und bilden so das Osteoid als Grundsubstanz. Neues Knochengewebe kann nun von außen aufgelagert werden.

Nach der Bildung primären bzw. unreifen ossären Gewebes (Geflechtknochen) erfolgt ein langwieriger Reifeprozess, der sich bis in das Kindesalter erstreckt. Geflechtknochen besteht aus einem knöchernen Grundgerüst, welches eine Vielzahl von Zellen sowie einen eher unregelmäßigen Aufbau aufweist. Der Grad der Mineralisierung ist eher gering, demzufolge der Wassergehalt erhöht. Dies führt zu einer gesteigerten Biegsamkeit sowie Flexibilität des Knochens. Im Verlauf kommt es während des ossären Reifeprozesses zu einem Abbau des primären Geflechtknochens und zur Bildung reifen Lamellenknochens. Dieser besteht aus dem sogenannten Havers-System. Hierunter versteht man die konzentrische Anordnung von Osteonen, die in ihrem Zentrum einen Havers-Kanal mit einem Gefäß tragen. Dieser ist umgeben von etwa vier bis 20 zylinderförmigen Lamellen bestehend aus

Kollagenfasern Typ 1. Sie enthalten die Osteozyten. Die ossären Zylinder liegen parallel zur Längsachse der Diaphyse und sind etwa 5 mm lang. Die einzelnen Havers-Kanäle sind über sogenannte Volkmann-Kanäle zwecks ihrer Blutversorgung verbunden. Nach außen wird das Osteon durch eine faserarme Zementlinie abgegrenzt. Die zahlreichen Osteone bilden die Compacta (siehe 2.1.4). Folglich lässt sich nach dem ossären Reifeprozess mit Ausnahme im Bereich des Craniums kaum noch Geflechtknochen bei einem ausgewachsenen Menschen finden. Bis hin zur Entwicklung der Geschlechtsreife erfolgt die Verknöcherung der Epiphysenfugen mit dem Abschluss des Knochenwachstums [10, 18, 19, 20].

Inwieweit die Lokalisation der Wachstumsfugen (proximal/distal) hinsichtlich der Ossifikationen durch BSP als Gegenstand dieser Arbeit eine Rolle spielen könnte, wird im Rahmen der Literaturdiskussion das Längenwachstum am Beispiel des Femurs und vermutete Zusammenhänge erläutert (siehe 5.2.4).

2.1.4 Anatomischer Aufbau des Knochens

2.1.4.1 Allgemeine Architektur

Reifes Knochengewebe kann morphologisch und funktionell in zwei Gewebetypen unterteilt werden (Compacta, Spongiosa). Von außen wird der Knochen von einer straffen Bindegewebshaut umgeben. Das Periost setzt sich aus dem äußeren Stratum fibrosum sowie dem inneren Stratum osteogenicum zusammen und ist über die Sharpey-Fasern an der äußeren harten Rindenschicht befestigt. Es trägt zur Ernährung des Knochens bei und erhält Innervation aus nozizeptiven Fasern, die im Rahmen einer Verletzung des Periosts zu Knochenschmerzen führen. Die Substantia compacta bildet die harte äußere Rindenschicht des Knochens und geht in Richtung Zentrum in ein schwammartiges Trabekelnetzwerk (Substantia spongiosa) über. Hier kommt es zur Bildung von Hohlräumen. Diese werden durch das Endost nach innen begrenzt und beinhalten das Knochenmark (Medulla ossium rubra), welches im Alter vermehrt durch das Fettmark (Medulla ossium flava) ersetzt wird. Das rote Knochenmark weist anhand seiner sich darin befindlicher Stammzellen blutbildende Funktionen auf. Der histologische Aufbau des Knochengewebes kann sich je nach Alter sowie Belastung und Funktion des jeweiligen Knochens unterscheiden [18, 21].

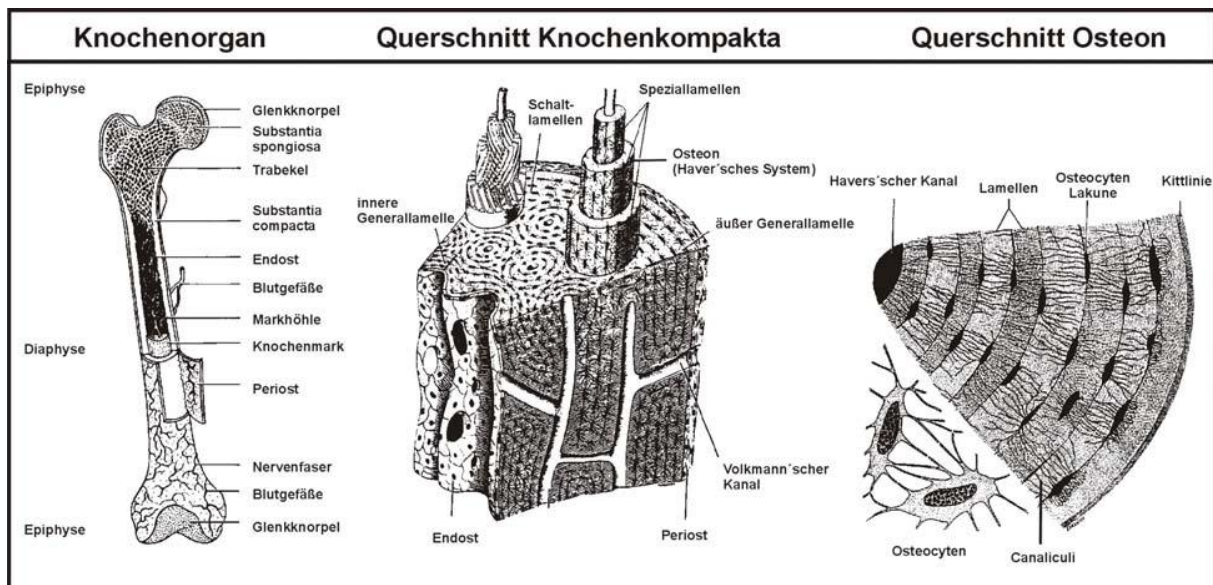


Abbildung 1: Schema anatomischer Aufbau von Knochengewebe [20]

2.1.4.2 Zusammensetzung des Knochengewebes

Knochengewebe besteht zu 20 % aus organischen und 70 % aus anorganischen Teilen. Die restlichen 10 % werden durch Wasser gebildet. Der anorganische Teil besteht hauptsächlich aus Hydroxylapatit, welches zu etwa 50 % aus Phosphat, 35 % aus Calcium, 7 % aus Carbonaten sowie weiteren Mineralien gebildet wird und an Kollagenfibrillen als Knochengrundgerüst bindet. Dieses aus mehreren Komponenten aufgebaute Calciumsalz verkörpert den anorganischen Teil des gesamten Knochengewebes. Neben dem Hydroxylapatit kommen ebenso organische Substanzen vor. Hierzu gehören unter anderem Proteoglykane, Glykoproteine sowie Kollagen Typ I (90 %) und nichtkollagene Proteine, die in einem späteren Kapitel (2.2) noch etwas genauer betrachtet werden. Proteoglykane sorgen für die Biegsamkeit des Knochens, indem sie Wasser binden [31, 32].

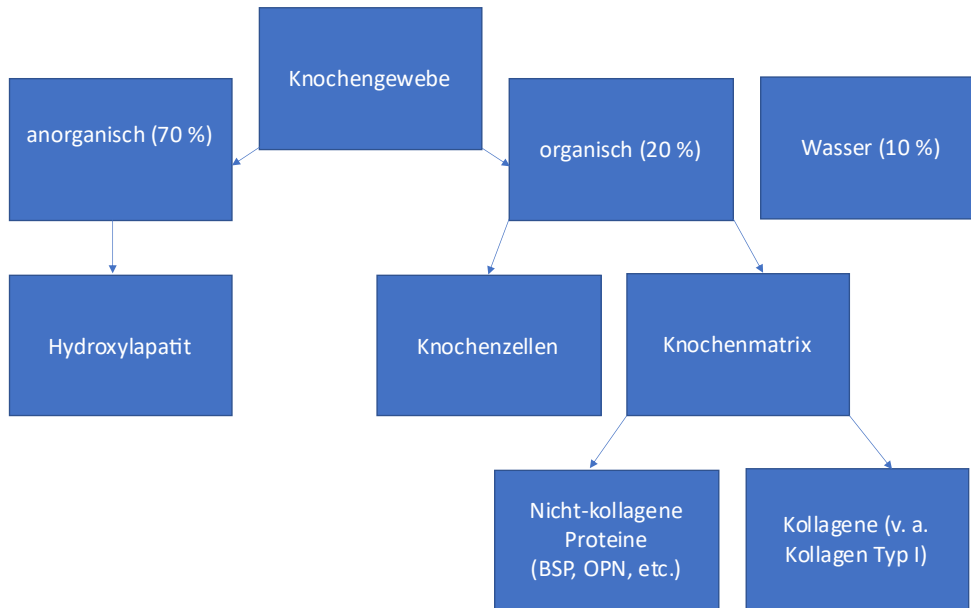


Abbildung 2: Zusammensetzung des Knochengewebes schematisch dargestellt [eigene Quelle in Anlehnung 31, 32]

Zudem finden sich im organischen Teil des Knochengewebes Knochenzellen, die maßgeblich am ossären Umbau beteiligt sind. Folgende Tabelle soll einen kurzen Überblick über die Zellart sowie deren Funktion geben.

Zelle	Funktion
Osteoprogenitorzellen	Differenzierung zu reifen Knochenzellen (Vorstufe Osteoblasten)
Osteoblasten	Bildung Osteoid sowie alkalische Phosphatase → Knochenaufbau
Osteoklasten	Vielkernige Riesenzellen → Knochenabbau
Osteozyten	-reife Knochenzellen aus Osteoblasten -Bildung organische Matrix und Knochenhomöostase

Tabelle 1: Knochenzellen Überblick [eigene Quelle in Anlehnung 19,21]

Osteoblasten besitzen einen Durchmesser von etwa 25 µm und bilden den Hauptteil der organischen Matrix. Dort liegen sie als reife Osteozyten in das Knochengewebe eingebettet vor. Sie weisen eine hohe Aktivität für Stoffwechselprozesse auf und entwickeln sich unter dem Transkriptionsfaktor Runx2 aus pluripotenten mesenchymalen Vorläuferzellen [19, 21]. Demnach sind sie maßgeblich an diversen knochenbildenden Regelkreisläufen (siehe 2.1.5) beteiligt. Daneben wirken sie als Regulatoren auf den Knochenabbau sowie auf ihr Umgebungsmilieu ein. In ihrem Differenzierungsgrad lassen sich vier unterschiedliche Reifestadien unterscheiden (Prä-Osteoblast, Osteoblast, Osteozyt, bone lining cell) und bilden in ausgereifter aktiver Form (Osteoblast) etwa 1 µm Osteoid am Tag [19, 165]. Hierbei bleiben ihre Zell-Zell-Kontakte untereinander in Verbindung, sodass es während des osteoidalen Wachstums zu einer Verlängerung der Zellfortsätze unter Verkleinerung des Zellkorpus kommt (Osteozyt). In Form einer einschichtigen Zellwand (bone lining cells) liegen sie inaktiv zwischen Periost und mineralisierter Knochenmatrix [166]. Osteoblasten synthetisieren unter anderem Kollagene und nicht-kollagene Proteine/Enzyme (Proteoglykane, Osteocalcin, AP). Matrixproteine als wichtige Marker der Osteoblasten spielen hierbei eine besondere Rolle (2.2) [19, 21].

Osteoklasten besitzen eine knochenresorbierende Funktion und entwickeln sich unter Einfluss bestimmter Zytokine (CSF, IL-1/-11) mittels Fusion von Makrophagen- sowie Monozyten-Vorläuferzellen aus dem Knochenmark. Sie können demnach mehrere Zellkerne zugleich aufweisen. Zur endgültigen Differenzierung und Aktivierung ihrer Funktion trägt der Receptor-Activator-of-NF-κB-Ligand (RANKL) bei. Dieser gehört zur Familie der Tumornekrosefaktoren und ist Bestandteil des Osteoprotegerin-Systems. Der RANKL wird durch die Zelllinie der Osteoblasten sowie aktiven T-Lymphozyten gebildet. Demnach besteht eine Verbindung zwischen Knochenumbauvorgängen und körpereigener Immunmechanismen. Das Osteoprotegerin kann als regulativer Gegenspieler des RANKL verstanden werden. Der auf der Oberfläche der Osteoklasten befindliche RANK-Rezeptor aktiviert über Kopplung durch den RANK-Ligand die Ausdifferenzierung und Funktion der osteoklastären Vorläuferzellen und steuert somit die Knochenresorption. Eine Überexpression von RANKL würde folglich zu einem vermehrten Abbau ossären Gewebes und somit zu Erkrankungen wie der Osteoporose führen. Dies konnte bereits im Rahmen von wissenschaftlichen Untersuchungen gezeigt werden [19, 22, 23]. Nach Aktivierung binden Osteoklasten über Integrin-Rezeptoren an Peptide der Knochenmatrix. An der Zell-Knochen-Grenze

(ruffled border) erfolgt nun seitens der Osteoklasten die Sezernierung von Wasserstoff zur Auflösung der Knochensubstanz. Deren Peptidanteile werden über die Endoprotease Cathepsin K der Osteoklasten hydrolysiert [166]. Während des osteolytischen Vorgangs entstehen abbaubedingte Produkte des Kollagen Typ 1. Diese stellen sich als N-/C-terminale Telopeptide dar und lassen sich im Serum bzw. Urin nachweisen. Als therapeutische Konsequenz besteht somit die Möglichkeit RANKL-Antikörper bei bestimmten knochenabbauenden Pathologien zu verordnen [24, 25, 26].

Osteozyten als Teil der osteoblastären Zellreihe weisen eine auf den Knochenaufbau fördernde als auch hemmende Funktion auf. Sie bilden den Hauptteil der zellulären Knochenmatrix (90 %) und liegen vor allem als über dendritische Fortsätze miteinander verknüpfte Knochenzellen in inaktiver Form vor. Aufgrund ihrer ruhenden Aktivität besitzen sie einen insgesamt kleineren Durchmesser als reife aktive Osteoblasten. Ihre Lebenszeit erstreckt sich über mehrere Jahre [19, 30]. Unter bestimmten physiologischen bzw. krankhaften Bedingungen können Osteozyten aktiviert werden (**siehe Abbildung 3**). Sie steuern beispielsweise über den RANK-Ligand die Differenzierung und Aktivierung von Osteoklasten-Progenitorzellen [27, 28]. Sklerostin führt neben anderen spezifischen Proteinen der Osteozyten (DKK1, Frizzled-related Protein 1) zu einer Hemmung des Knochenaufbaus. Über die Bildung der nahezu gesamten Knochenmatrix sowie die Sekretion von Prostaglandin E2 und Adenosintriphosphat unterstützen sie jedoch ebenso osteoklastäre Prozesse [29].

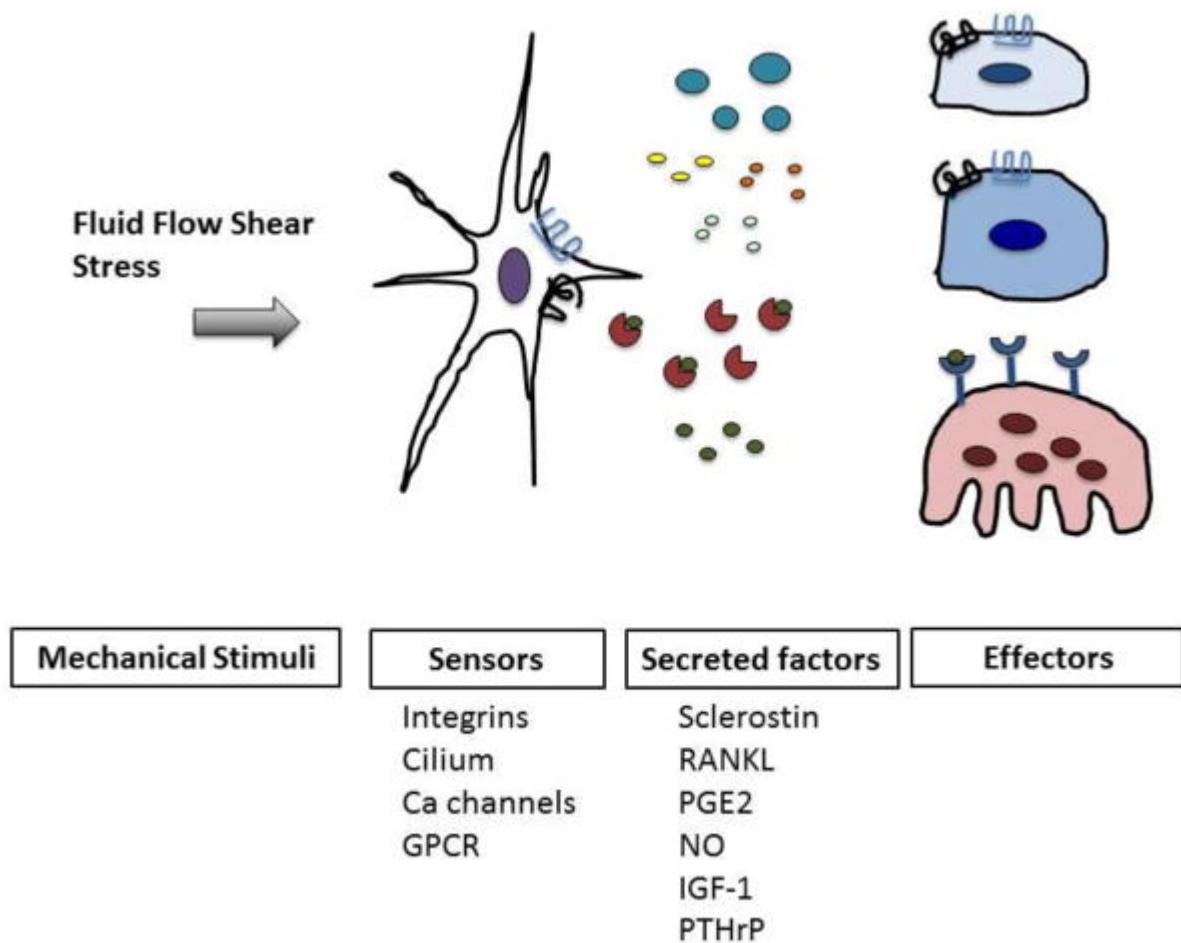


Abbildung 3: Vereinfachtes Schema der Aktivierung von Osteozyten [30]

2.1.5 Knochenstoffwechsel

Als Knochenstoffwechsel werden diejenigen Vorgänge bezeichnet, die an den Umbauprozessen des Knochengewebes sowie dessen Ernährung beteiligt sind. So kann, wie bereits in Kapitel 2.1.4 erwähnt, den Osteoblasten ein osteogenetischer und den Osteoklasten ein osteolytischer Effekt zugesprochen werden. Als Osteogenese versteht man die Sekretion der Knochengrundsubstanz durch Osteoblasten sowie deren Mineralisierung. Sie ist abhängig vom Calcium- sowie Phosphatangebot im Blut. Zudem spielt das Vitamin D 3 eine bedeutende Rolle. Ein Zusammenspiel aus Parathormon, Calcitriol und Calcitonin macht den Knochenstoffwechsel erst möglich. Dieser hormonelle Regelkreislauf passt sich dem Bedarf des Organismus an und kann bei diversen Pathologien auffällig erscheinen [33, 34].

2.1.5.1 Mineralien

Mineralstoffe gehören mitunter zu den essenziellen Bausteinen eines jeden Lebewesens. Sie haben Einfluss auf zahlreiche Funktionen im Körper. Ein Mangel bzw. Überschuss an Mineralien kann allgemein betrachtet akut oder chronisch zu Störungen der neuromuskulären Funktion und demnach zu Muskelschwächen, Parästhesien und Tetanien führen. Zudem kann es zur Beeinträchtigung des Bewusstseins bis hin zum Koma kommen. In schweren Fällen führen Herzrhythmusstörungen sowie Zwerchfelllähmungen unbehandelt zum Tod. Jedes einzelne essenzielle Mineral- und Spurenelement bzw. relevante Hormon bis ins kleinste Detail zu erörtern, würde den Rahmen dieser Dissertation sprengen, daher wird hauptsächlich auf deren Funktion hinsichtlich des Knochenstoffwechsels Bezug genommen.

Calcium spielt nicht nur hinsichtlich der Knochenmineralisation eine entscheidende Rolle. Es ist eines der wichtigsten Mineralien des menschlichen Körpers, das maßgeblich unter anderem zur muskulären elektromechanischen Koppelung, der Mitose von Zellen sowie der Produktion und Absonderung von Hormonen als Second-Messenger beiträgt. Es wird über den intestinalen Trakt Vitamin-D-abhängig resorbiert. Der intrazelluläre Calciumanteil (13 g) ist insgesamt 10-mal höher als der extrazelluläre Anteil (1,3 g). Bis zu 99 % werden im Knochengewebe in Hydroxylapatit eingebaut, sodass es über den Parathormonstoffwechsel (siehe 2.1.5.2) bei Bedarf aus der Speicherform mobilisiert werden kann. Unter regulären Umständen zeigt sich die Aufnahme wie Ausscheidung regelhaft bei etwa 1 g innerhalb von 24 h (siehe Abbildung 4). Eine länger andauernde Hypocalcämie und der damit einhergehenden mangelnden Mineralisation des Knochengewebes kann als Ursache für Osteoporose und pathologische Frakturen betrachtet werden [35-39].

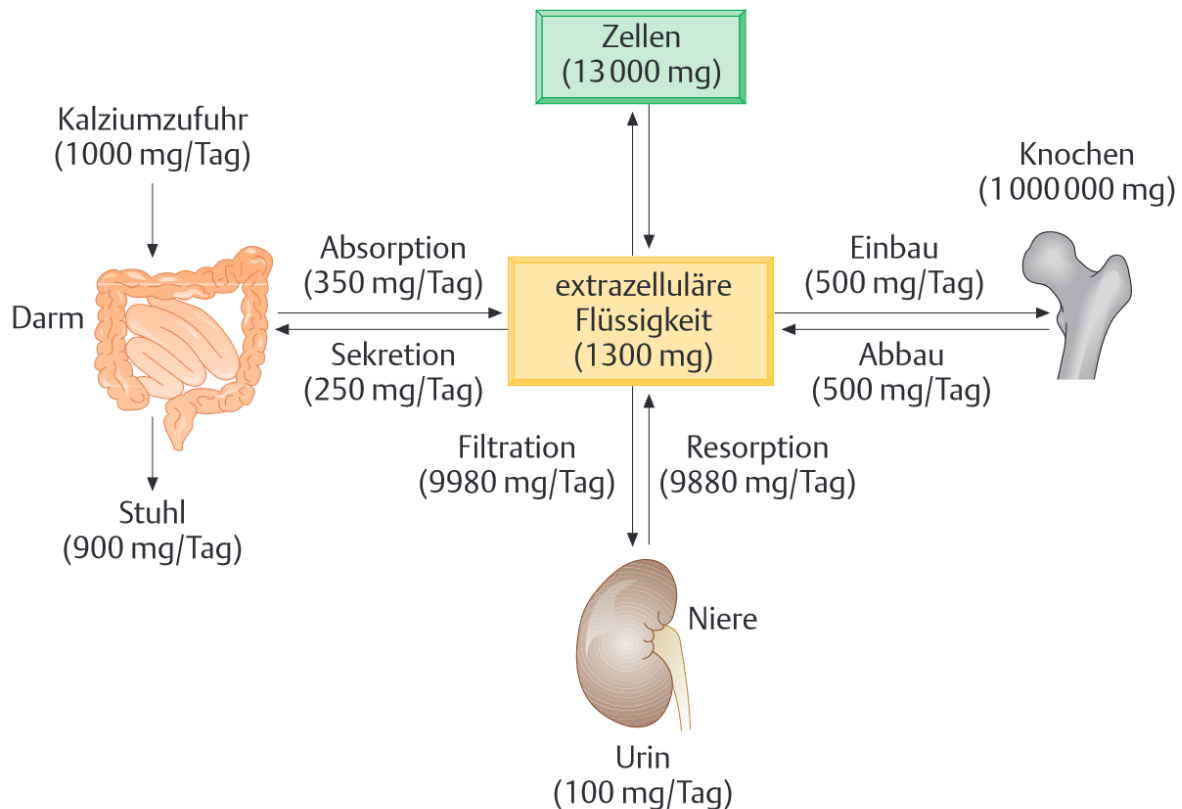


Abbildung 4: Calciumstoffwechsel beim Erwachsenen [40]

Neben Calcium trägt Phosphat zum Aufbau der anorganischen Knochenmatrix bei. Im Schnitt befinden sich etwa 600 g im menschlichen Körper, wovon 85 % in Hydroxylapatit eingelagert sind. Phosphat wird ebenso wie Calcium Vitamin-D-abhängig im Darm resorbiert. In höheren Mengen führt es über negative Rückkoppelung zu einer Hemmung der Vitamin-D-Bildung und somit zu einer ungünstigen Beeinflussung der Calciumresorption. Über einen längeren Zeitraum betrachtet würde eine Phosphaterhöhung folglich zu einer fehlgeleiteten Knochenmineralisierung und demnach zu osteoporotischen Veränderungen führen. Hauptverantwortlich für den Phosphatstoffwechsel ist die Niere. So kann es bei einer bekannten renalen Vorschädigung mit erhöhten Phosphatspiegeln und Hypercalcämie zur Ausfällung von Kalkkristallen und einer damit einhergehenden Ablagerung in diversen Organen kommen [35, 36, 41, 42].

Ein weiterer wichtiger Bestandteil der Knochenmineralien ist das Magnesium. Neben einer muskelregulierenden Funktion kommt es in anorganischem Knochengewebe vor und beeinflusst den ossären Hormonstoffwechsel [36]. Die Menge an Magnesium innerhalb der Hydroxylapatit-Kristalle unterliegt einer hohen Varianz und ist abhängig

von der Resorption im Darm (Vitamin-D-unabhängig) sowie der Sekretion aus der Niere [43].

2.1.5.2 Hormone

Das Parathormon selbst besteht aus insgesamt 84 Aminosäuren und wird durch die Nebenschilddrüse gebildet. Es kann in eine aktive sowie inaktive Form unterteilt werden und übernimmt die wichtige Aufgabe den extrazellulären Calciumwert im Blut stabil zu halten. Über den Regelkreislauf des calciotropen Systems führt es bei einem Absinken des Hormonspiegels zu einer vermehrten Calciumresorption und einer gesteigerten Phosphatausscheidung über die Nieren. Des Weiteren kommt es zu einer Mobilisation des ossären Calciumdepots durch Aktivierung der Osteoklasten über bereits oben beschriebene Mechanismen [44, 45]. Dies erfolgt über den calciumsensitiven Rezeptor (CaSR), der als Oberflächenrezeptor bei zahlreichen unterschiedlichen Zellen (Niere, Brust, Knochen) im Körper zu finden ist und die Messung des extrazellulären Calciumspiegels ermöglicht. Der CaSR spielt eine maßgebliche Rolle beim ossären Längenwachstum. Es kommt zu einer vermehrten Expression des Rezeptors durch Chondrozyten im Bereich der Wachstumsfuge [46]. Das Calcitonin gilt als Gegenspieler des Parathormons und setzt sich aus 32 Aminosäuren zusammen. Über einen Anstieg des extrazellulären Calciums bzw. bestimmter Hormone aus dem Magendarmtrakt (Gastrin, Glukagon) erfolgt die Bildung des neuroendokrinen Hormons aus den C-Zellen der Schilddrüse. Es wirkt inhibierend auf Osteoklasten, weiterhin führt es zu einer verminderten intestinalen Aufnahme sowie renalen Rückresorption von Calcium [47]. Als biologisch wirksames Vitamin D führt Calcitriol über Niere und Darm zu einer Steigerung der Calciumresorption sowie vermehrten Knochenmineralisierung. Calcium sowie Phosphat werden Vitamin-D-abhängig intestinal resorbiert, wodurch es einen essenziellen Bestandteil zur Aufrechterhaltung eines adäquaten Knochenstoffwechsels darstellt. Die Vitamin-D-Konzentration im menschlichen Körper ist hauptsächlich von exogenen Umständen abhängig. Vorstufen, wie Cholecalciferol oder Ergocalciferol, können über Nahrungsmittel aufgenommen werden. Dies stellt jedoch nur einen Bruchteil (<10 %) der Vitamin-D-Gewinnung dar. Der Hauptanteil liegt in der UVB-abhängigen und damit körpereigenen Synthese von Vitamin D über Haut, Leber und Niere [48, 49].

Wirkort	Parathormon	Calcitonin	Calcitriol
Serum-Calcium	↑	↓	↑
Knochen	↑ Aktivität der Osteoklasten	↓ Aktivität der Osteoklasten ↑ Calciumeinbau	↑ Aktivität der Osteoblasten
Niere	↑ Calciumresorption ↑ Phosphatausscheidung ↑ Calcitriolbildung	↑ Calcium- und Phosphatausscheidung	↑ Calcium- und Phosphatresorption
Darm	↑ Calciumresorption	↓ Calciumresorption	↑ Calciumresorption

Tabelle 2: Hormoneller Regelkreislauf des ossären Stoffwechsels [eigene Quelle in Anlehnung an Quelle 50]

Östrogene sowie Steroidhormone stellen unter anderem Hormone dar, die ebenfalls im Bereich der Mineralisation des Knochengewebes und bei der Entstehung ossärer Erkrankungen von Bedeutung sind. Insbesondere die Bildung des Osteoprotegerin wird durch Cortisol inhibiert, während es durch Östradiol zu einer stimulierenden Wirkung kommt. Dies führt zu einer physiologischen Beeinflussung des RANKL und somit zu einer vermehrten bzw. verminderten Osteoklastenfunktion [51, 52]. Neueren Erkenntnissen nach wird dem hypothalamo-hypophysären System sowie dessen Releasing-Hormonen (TSH, ACTH, FSH) osteoregulative Funktionen zugesprochen [53, 54, 55, 56].

2.1.5.3 Remodeling

Jede der am Knochenstoffwechsel beteiligten Komponenten bildet die Grundlage des sogenannten Remodelings. Es handelt sich hierbei vereinfacht um zelluläre ossäre Umbauprozesse. 1862 erläuterte Julius Wolff anhand der Untersuchung von Femurköpfen die Fähigkeit biomechanischer Anpassungsmechanismen des Knochens. Demnach führt eine Minderbeanspruchung des Bewegungsapparates nicht nur wie allgemein bekannt zu einem Muskelschwund, auch das Knochengewebe unterliegt hierbei einem gewissen Abbauprozess [57]. Des Weiteren führt im Gegenzug eine vermehrte Belastung bestimmter Teile des Bewegungsapparates neben des Muskelaufbaus zu einer verstärkten Mineralisation [58]. Während der mechanischen Beanspruchung von Knochengewebe kommt es zu physiologischen Mikroschäden ($< 100 \mu\text{m}$), die im Rahmen kontinuierlich ablaufender Umbaumechanismen vom Organismus repariert werden. Je nach biomechanischer Beschaffenheit und Regeneration des Knochens kann es bei inadäquatem Remodeling zu einer Akkumulation der Mikroschäden und folglich zu Ermüdungsfrakturen kommen [59].

Die folgende Abbildung zeigt eine hypothetische Darstellung der am Remodeling beteiligten Prozesse und Komponenten. Interleukine sowie andere Mediatoren (TNF, TGF, CSF, IGF, FGF, PDGF, BMP) können sowohl von aus dem Knochenmark stammenden Monozyten als auch von Knochenzellen gebildet werden. Bestimmte Proteine wie NF κ B, RANKL und Osteoprotegerin (OPG) werden gezielt von Osteoblasten synthetisiert. Unterschiedliche Faktoren (VEGF, NO, Endothelin) führen zu einer Aktivierung der Knochenzellen über die Bindung an bestimmte Rezeptoren und es erfolgt die Weiterleitung des Signals auf den hormonellen Regelkreislauf. Links unten in der Abbildung wird die vermutete interaktive Zellkommunikation dargestellt. Auf der Gegenseite zeigen sich die Osteoblasten in ihrer Funktion als Auskleidungszellen [60].

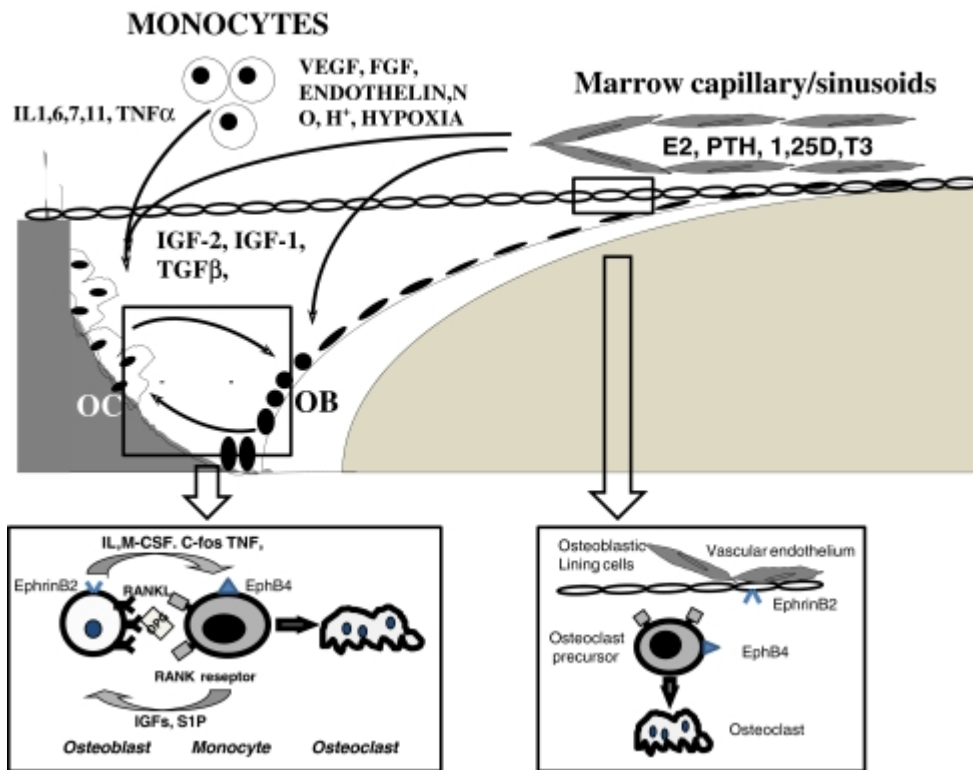


Abbildung 5: Überblick Remodeling von Knochengewebe [60]

Insgesamt stellt sich der gesamte Knochenstoffwechsel als komplexes System, bestehend aus zahlreichen einzelnen voneinander abhängigen Regelkreisläufen, dar. Der heutige Kenntnisstand, auch in Bezug auf die Pathogenese von Knochenerkrankungen, zeigt sich bereits weit fortgeschritten und wird auch weiterhin Gegenstand der Forschung bleiben.

2.1.6 Critical bone defect

Als kritische Knochendefekte werden diejenigen Verletzungen des Knochens bezeichnet, die sich als segmentalen Substanzdefekt einer bestimmten Größe darstellen lassen und unter physiologischen Umständen im Rahmen des Remodelings zu keiner Restitutio ad integrum führen würden. Dies stellt die Unfallchirurgie vor eine enorme Herausforderung, denn selbst osteosynthetische oder autologe Ersatzverfahren führen in solchen Fällen meist zu einer lediglich minderwertigen Knochenheilung [151, 152]. In der europäischen Bevölkerung entstehen Knochendefekte meist während eines Unfallhergangs bzw. im Rahmen des Debridements bei Versorgung einer offenen Fraktur. Sie können jedoch ebenso als Folge einer Penetrationsverletzung auftreten. Eine exakte Einteilung der kritischen Knochendefekte gibt es bisher nicht. Bei einem Segmentdefekt von über 2 cm bzw. einem Umfangsverlust von etwa 50 % kann eine Spontanheilung jedoch als eher unwahrscheinlich angenommen werden [152, 153, 154]. Die häufigste Lokalisation von kritischen Knochendefekten zeigt sich im Bereich der Tibia. Grund hierfür ist das schwindend geringe Subcutangewebe und folglich die direkte Einwirkung externer Einflüsse auf den Knochen selbst [153, 155]. Aufgrund der problematischen Behandlung kritischer Knochendefekte rückt die Forschung hinsichtlich der Herstellung von Biomaterialien weiter in den Vordergrund. Wie bereits in der Einleitung dieser Dissertation beschrieben, kommen BMPs bereits im klinischen Alltag zur Anwendung. Bei einer potenziell osteoinduktiven Wirkung der BSP als Untersuchungsgegenstand dieser wissenschaftlichen Arbeit könnte daraus ein neuer Ansatz zur Therapie von Knochendefekten resultieren.

2.2 Matrixproteine

Wie bereits in 2.1.4.2 beschrieben, kann neben den zellulären Anteilen der Knochenmatrix eine nicht-zelluläre Komponente unterschieden werden. Diese setzt sich aus organischen (Matrixproteine) sowie anorganischen (Hydroxylapatit) Bestandteilen zusammen. Im Rahmen dieser Dissertation werden im folgenden Kapitel das BMP sowie BSP näher erläutert. Das BMP kam in dieser experimentellen Arbeit als Positivkontrolle zur Anwendung.

2.2.1 Bone Morphogenic Protein

Die Bone morphogenetic Proteine zählen zu der Transforming Growth Factor- β (TGF- β)-Superfamilie. Hierzu gehören unter anderem auch das Activin und Inhibin. Hierbei handelt es sich um körpereigene Proteine, die vor allem im Zuge morphogener sowie regenerativer Prozesse Bedeutung erlangen. Bereits seit mehreren Jahrzehnten sind sie zentraler Forschungsgegenstand zahlreicher Arbeitsgruppen [69, 70]. Startschuss hierfür gaben Marshall R. Urist und Kollegen in den 60er Jahren. Sie entdeckten im Rahmen von Tierversuchen eine heterotope Entstehung von Knochen- sowie Knorpelgewebe nach muskulärer sowie subkutaner Implantation eines Proteinauszugs entmineralisierter Knochensubstanz [71]. Durch fetale Studien konnte eine wichtige Funktion der BMPs hinsichtlich der embryonalen Genese aufgezeigt werden. Das Ausschalten einiger dieser Proteine führte zu Malformationen sowie Fehlgeburten. Postnatal induzieren BMP-2 bis -7 sowie BMP-14 die Entwicklung von Mesenchym- zu Vorläuferzellen des Knochen- und Knorpelgewebes. So haben sie einen großen Anteil an vielen zellulären Abläufen (Zellwachstum, -differenzierung, Apoptose, Chemotaxis). Zudem konnte mit ihnen ein wirksamer Einfluss auf Regenerationsprozesse in Verbindung gebracht werden [72, 73, 74].

2.2.1.1 Aufbau und Wirkmechanismus des BMP

BMP enthalten ein N-terminales sowie C-terminales-Signalpeptid. Sie werden im Zytoplasma aus Vorläuferproteinen enzymatisch gespalten. Die Aktivierung erfolgt nach Abspaltung der jeweiligen Propeptidsequenz. Im aktivierten Zustand wirken BMPs über spezifische transmembranöse Rezeptoren (Typ I/II), welche sich auf der Oberfläche von mesenchymalen Zellen in Weichteilgewebe sowie Knochenmark befinden. Es kommt zur Bildung eines heterodimeren Komplexes und folglich zu weiteren Phosphorylierungsprozessen, von einerseits dem Rezeptor selbst, sowie intrazellulären Second-Messenger-Proteinen (SMAD). Nach Translokation in den Zellkern beginnt die Transkription von Early-response-Genen. Jeder Monozyt des Menschen besitzt zwischen 750 und 1000 BMP-Rezeptorkomplexen auf seiner Oberfläche. Die Bindung aktivierten BMPs an zwei bis drei Rezeptoren reicht aus, um den Stimulus zur Chemotaxis auszulösen [70, 76, 81]. Ein Abbruch des Signalwegs des BMP würde zu schweren skelettalen Dysfunktionen führen. Eine aktuelle Studie von 2020 zeigte, dass das BMP hinsichtlich der Ossifikation des Schädels einer Maus bei in vitro sowie in vivo Untersuchungen eine bedeutsame Rolle spielt. Zudem trägt es hinsichtlich der Bildung von Schädelstammzellen bei und könnte auf diesem Weg Einfluss auf Regenerationsmechanismen nehmen [75].

Lowery und Kollegen veröffentlichen 2018 ein vereinfachtes Schema des BMP-Signalwegs (Abbildung 6). Nach liganden-abhängiger Aktivierung der BMP-Rezeptoren (Typ I/II) erfolgt die Signalübertragung auf SMADs, die über den Cofaktor SMAD4 die Migration in den Zellkern induzieren. SMAD6 und SMAD7 weisen hierbei eine regulative Funktion auf. Die Ubiquitin-Ligase (SMURF1) fördert den Abbau der BMP-Rezeptoren sowie der SMADs und hemmt folglich die BMP-Signalkaskade [76]. Des Weiteren konnte für Gremlin-1 und Noggin ebenso eine inhibierende Wirkung auf BMPs nachgewiesen werden [77, 78]. Beide Proteine spielen eine wichtige Rolle hinsichtlich der Knochenentwicklung [77, 79, 80]. BMP-2 sowie BMP-7 sind zur Behandlung therapierefraktärer Knochenbrüche, bei operativen Eingriffen an der Wirbelsäule sowie Erkrankungen mit daraus resultierenden Knochendefekten oder Abbauprozessen wie u.a. Pseudarthrosen in der Klinik zugelassen. An bestimmter Stelle implantiert induzieren sie dort die Zelldifferenzierung, welche zur Synthese neuen Knochengewebes führt [74].

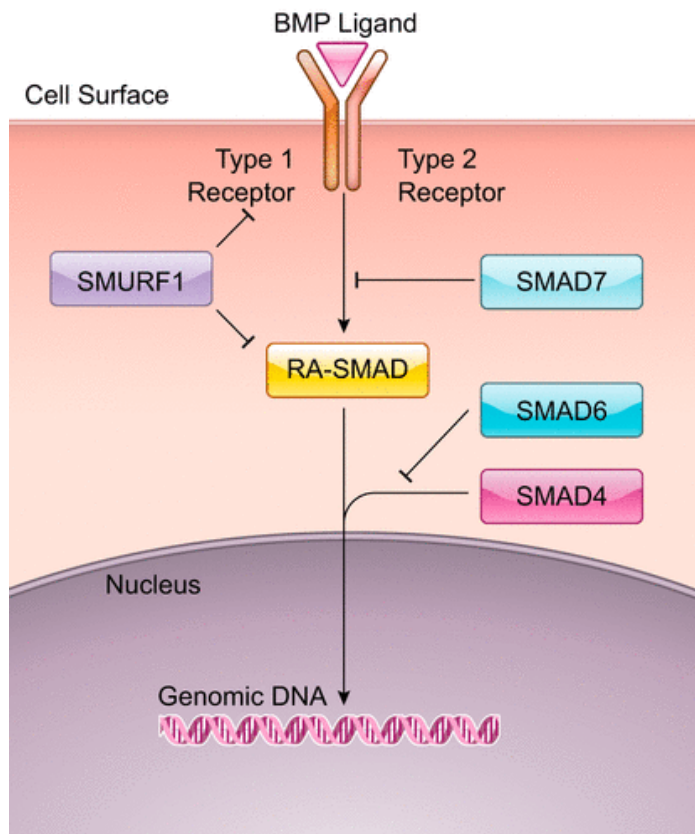


Abbildung 6: BMP-Signalweg [76]

2.2.1.2 BMP als Allrounder Protein

Neben der osteoinduktiven Funktion des BMP-7 konnte in einer tierexperimentellen Forschungsarbeit von Wang und Kollegen ebenso ein regulierender Einfluss auf renale Reparaturmechanismen bei diabetischer Nephropathie nachgewiesen werden. Hierbei wurden zehn Wochen alte Ratten des weiblichen Geschlechts mittels einmaliger intravenöser Gabe von Streptozocin in einen Diabeteszustand versetzt. Ab dem dritten Tag erhielten sie täglich Insulininjektionen subcutan. Nach 16 Wochen entwickelten die Versuchstiere eine beginnende Niereninsuffizienz und eine Behandlung mit BMP-7 intravenös oder Enalapril oral für insgesamt 32 Wochen wurde induziert. Das Enalapril, welches eine blutdruckregulierende sowie renal protektive Wirkung besitzt, diente als Vergleichswert. Die Studie zeigte hinsichtlich der renalen Hyperplasie, der Albuminausscheidung sowie der Glomerulären Filtrationsrate (GFR) einen signifikant positiv regulierenden Effekt des BMP-7 ähnlich des Enalaprils. Als Messwert wurde zusätzlich der Blutdruck hinzugezogen. Hierfür konnte wie erwartet kein Einfluss

seitens des BMP-7 nachgewiesen werden [82]. Weitere experimentelle Studien von Zeisberg und Kollegen zeigten, dass das BMP-7 ebenso einen positiven Effekt hinsichtlich möglicher Reparaturprozesse in renalen Fibroblasten und somit einen weiteren therapeutischen Vorteil in der Behandlung von Nierenerkrankungen erzielt. So wurde angenommen, dass das BMP seine Wirkung über Reaktivierung von Residuen embryonaler Eigenschaften der fibrösen Zellen selbst entfalten und demnach die Progression einer chronischen Nierenfibrose hinauszögern bis gar verhindern könnte [83, 84]. Im Rahmen der Untersuchungen in puncto Tissue Engineering werden aktuell zahlreiche Erkenntnisse zum Thema BMP und seiner osteoinduktiven Eigenschaft veröffentlicht und weiter untersucht. Zur Gewebezüchtung von Knochen kann eine aktuelle in vitro Studie von 2020 nähere Informationen aufzeigen. Mittels elektrostatischer Anziehungskräfte bindet mimetisches BMP-2 an einen Kollagen-Hydroxylapatit-Verbund. Über den modifizierten Polyglutaminsäurerest (negative Ladung) des BMP-2 und der Hydroxylapatit-Partikel (positive Ladung) kommt es zu einer insgesamt etwa 85 % höheren Bindung beider Komponenten verglichen mit nicht verändertem BMP-2. Die Bindung an sich stellte sich als stabil heraus. Die Auswirkungen dieser Verbindung hinsichtlich der Mineralisierung von Kieferperiostzellen konnte eine signifikant verbesserte und verlängerte Zellproliferation aufweisen [85].

Neben zahlreichen vorteilhaften Funktionen des BMP wird im Folgenden nun auf sein Mitwirken bei pathologischen Prozessen Bezug genommen. Hier ist als Beispiel der Formenkreis der Spondylarthritiden zu nennen. In einem Drosophila-Experiment konnte eine inhibierende Wirkung des HLA-B27 hinsichtlich des Signalwegs von TGFβ/BMP nachgewiesen und die Entstehung von Spondylarthritiden näher beschrieben werden [86-89]. Als Mitglied des TGF-Verbunds können weitere Faktoren Einfluss auf das BMP nehmen und daraus resultierend zu pathologischen Prozessen führen. Untersuchungen ergaben eine Wirkung des FGF-1 auf BMP sowie den membrangebundenen Aktivin-Inhibitor, welcher als möglicher Regulator der Fettzellentwicklung gilt. Dies konnte im Zuge der Adipositasforschung im Verlauf näher untersucht werden [90, 91, 92]. Aktuelle Studien hinsichtlich des BMP beschäftigen sich zahlreich mit dem Zusammenhang des Proteins und malignen Erkrankungen [93-96].

Das BMP kann als Allrounder-Proteine bezeichnet werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde es aufgrund seiner osteoinduktiven Wirkung als Positivkontrolle verwendet. Seine Funktionen und Aufgaben sind jedoch breit gefächert, weswegen es auch weiterhin Gegenstand der Forschung bleiben wird. Eine weitere Ausführung wissenschaftlicher Erkenntnisse hinsichtlich des BMP an dieser Stelle würde den Rahmen dieser Dissertation sprengen.

2.2.2 Bone Sialoprotein

Ähnlich dem BMP reichen wissenschaftliche Studien über das BSP bis in die sechziger Jahre zurück, als es erstmals aus der Corticalis von bovinen Knochen isoliert werden konnte [97]. Das BSP gehört neben Osteopontin, Dentin Matrixprotein, Dentin Sialoprotein und Matrix Extrazellulärem Phosphoglycoprotein zur Familie der SIBLING (small integrinbinding ligand N-linked glycoproteins). Es steuert über eine Arg-Gly-Asp-Sequenz (RGD-Tripeptid), mithilfe von Integrin, Zelladhäsions- sowie Signaltransduktionsvorgänge und trägt maßgeblich zu Knochenmineralisierungsprozessen bei [4]. Das BSP macht etwa 12 % der nichtkollagenen Proteine der mineralisierten Knochenmatrix aus [98]. Es handelt sich hierbei um ein saures sowie phosphoryliertes Glykoprotein. In glykosyliertem Zustand enthält es ein Molekulargewicht von etwa 75 kDa [99]. Das Verhalten des Gewichts kann jedoch variieren (siehe unten). Es wird vermutet, dass das BSP die Angiogenese des Knochengewebes beeinflusst und demnach einen osteoinduktiven Effekt besitzt [101, 102, 103].

2.2.2.1 BSP-Aufbau und Wirkmechanismus

Die Proteinsequenz eines menschlichen BSP (schematische Darstellung siehe Abbildung 7) besteht aus einer Polypeptidkette von 317 Aminosäuren ohne Cysteinreste mit einem Gewicht von etwa 35 kDa, welches sich nach gelelektrophoretischer Trennung als Bande von 80 kDa darstellen lässt. Die schwankende molekulare Masse beruht auf posttranslationalen Modifizierungen. Fisher und Kollegen konnten bereits 1983 die prozentuale Gewichtsverteilung des BSP darstellen: 50 % Protein, 12 % Sialinsäure (Namensgebung), 7 % Glukosamine,

6 % Galaktosamine. Zudem liegen N- als auch O-glykosidisch gebundene Kohlenhydrate vor. Nach Signalpeptidabschaltung reduziert sich die Anzahl der Peptide auf 301. Verglichen mit dem BSP einer Ratte zeigte sich eine über 70%ige Identität der Aminosäuren. Hier zeigte sich vor allem das für die Zellbindung maßgebliche RGD-Tripeptid in ähnlichen Verhältnissen [118, 119, 123, 124]. Das Adhäsionsmotiv befindet sich nahe der C-Terminale zur Bindung des Integrin $\alpha\beta_3$. In der Umgebung der N-Terminale finden sich zwei an Glutamat reichen Regionen, mit jeweils acht repetitiven Einheiten. Im Verlauf der Polypeptidkette zeigen sich weitere Abschnitte von sich wiederholenden Glutaminsäuren [120]. Des Weiteren konnten drei Tyrosin-reiche Areale detektiert werden, welche etwa zur Hälfte in einem sulfatierten Zustand vorliegen [121, 122].

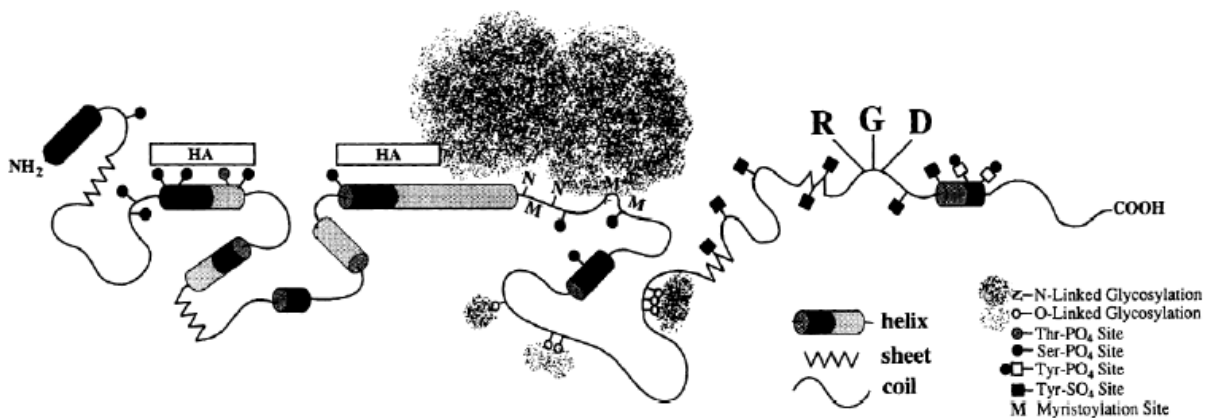


Abbildung 7: Schematische Darstellung der BSP-Struktur [99]

Das BSP entfaltet seine Wirkung über Zelladhäsion mittels RGD-Einheit und der Bindung an Integrin $\alpha\beta_3$ (siehe Abbildung 8). Bisher konnten neben den Osteoblasten zahlreiche weitere Bindungspartner detektiert werden: Osteoklasten [130], Osteoprogenitorzellen [131], Chondrozyten [132], Fibroblasten [133], Endothelzellen der Nabelschnurvene [134]. Im Rahmen der Studien konnte eine Bindung an die jeweiligen Zellen über die Zugabe von Integrin- $\alpha\beta_3$ -Antikörpern inhibiert werden.

Mintz und Kollegen konnten 1993 eine mögliche RGD-unabhängige Bindung des BSP aufzeigen. Hierbei wurde das BSP in seiner Aminosäuresequenz an drei Stellen in

Fragmente geteilt und die RGD-Sequenzen teils inaktiviert. Es zeigte sich trotz inaktiver bekannter Bindungskomponente ein adhäsives Verhalten von BSP an menschlichen Knochenzellen sowie zum Teil an Hautfibroblasten, weshalb von mindestens einer weiteren bisher unbekannten Bindungsregion ausgegangen wurde [135]. Diese Annahme konnte im Rahmen von Versuchsreihen hinsichtlich des Bindungsverhaltens von BSP an *Staphylococcus aureus* untersucht und bestätigt werden [136, 139]. Es zeigte sich nach Isolierung des Keims aus infektiösen Knochen- und Gelenkerkrankungen eine selektive Bindung durch BSP über eine kurzkettenartige basische und hydrophobe Aminosäuresequenz nahe des N-Terminus sowie ein Oberflächenprotein des *Staphylococcus aureus* selbst. Die RGD-Sequenz spielte hierbei keine bedeutsame Rolle [137, 138]. Aufgrund oben genannter Erkenntnisse kann eine interaktive Funktion des BSP zwischen Keim und ossärem Gewebe und der damit einhergehenden Pathogenese infektiöser Erkrankungen des Knochen- und Gelenkapparates vermutet werden.

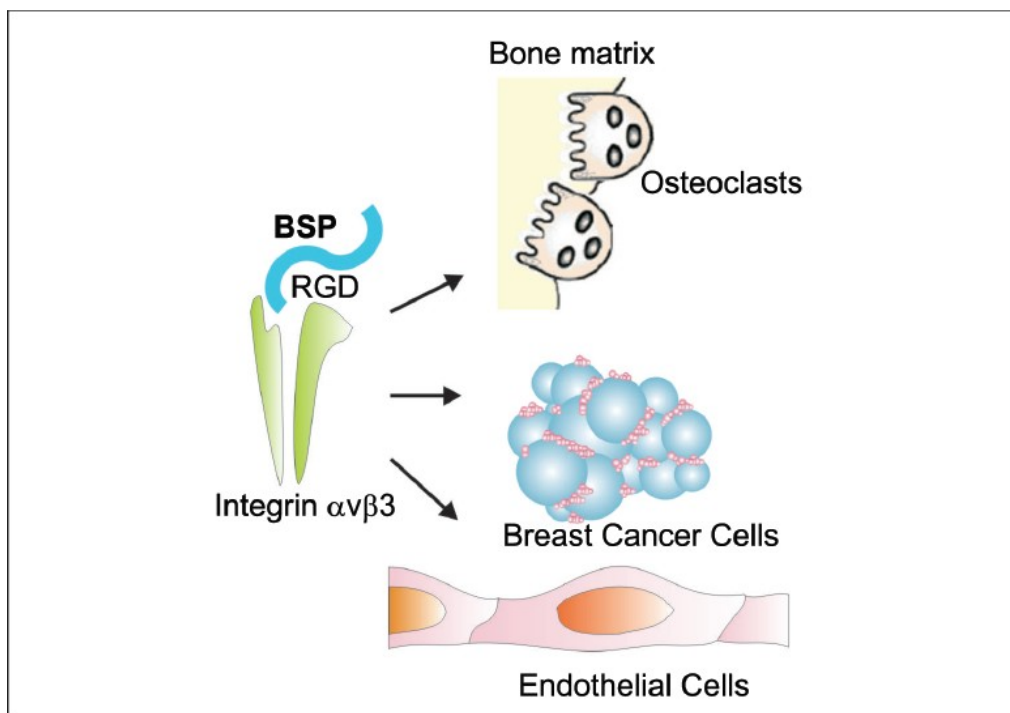


Abbildung 8: Interaktion BSP mit Endothelzellen, Osteoklasten und Tumorzellen [125]

2.2.2.2 BSP-Vorkommen und Funktion

BSP, dessen Gen sich auf dem Genlocus 4q21-q25 befindet, zeigt sich in bedeutsamen Konzentrationen vor allem in Bereichen der Knochenneusynthese im Osteoid der Wachstumsfuge. Dort wird es vor allem durch voll ausgereifte Osteoblasten gebildet. Untersuchungen hinsichtlich deren Syntheseverhalten ergaben das Unvermögen der BSP-Expression durch unvollständig ausgereifte Zellen [127, 129]. Neueren Erkenntnissen nach wird das BSP-Gen ebenso in Chondrozyten sowie Osteoklasten exprimiert [98, 108]. Zudem konnten maßgeblich hohe Mengen an BSP im Rahmen des ossären Remodelings entlang der Zementlinien nachgewiesen werden. An dieser Lokalisation zeigt sich eine hohe Aktivität der Osteoklasten bei gleichzeitiger Bildung neuen Knochengewebes [128].

Weitere Untersuchungen ergaben einen Zusammenhang des BSP mit dem RANKL-System. Hierbei wurden Knochenmarkszellen von Mäusen (Monozyten/Makrophagen) mit BSP und/ohne RANKL in Verbindung gebracht. Das Vorkommen in Odonto- sowie Cementoblasten lässt ebenso vermuten, dass es im Rahmen der Zahnentwicklung eine Rolle spielt [98, 109]. Im Jahre 2017 konnte diese Annahme mittels einer in vivo Studie im Rahmen eines Tierversuchs an Mäusen anhand der Auswirkungen von Pyrophosphat (PPi) und BSP gefestigt werden. PPi stellt einen hemmenden Faktor bzgl. Mineralisationsprozessen der Odontogenese dar. Demnach zeigte sich bei erhöhten PPi-Werten eine weniger stark ausgeprägte Zementbildung und umgekehrt. Bei BSP-Knockout-Mäusen stellte sich phänotypisch eine gewisse Ähnlichkeit dar. Dies führte zur Vermutung, dass beide Komponenten in Abhängigkeit zueinanderstehen. Weiterführende gentechnische Untersuchungen konnten diesen Verdacht bestätigen und lassen letztlich auf ein Zusammenwirken von PPi und BSP im Zuge der Odontogenese schließen [110]. In weiteren Studien mit BSP-Knockout-Mäusen konnte ein verzögertes Wachstum sowie eine geringere Mineralisation der langen Röhrenknochen nachgewiesen werden (siehe Abbildung 9). Es konnte eine Reduktion der Osteoklasten-Aktivität durch BSP nachgewiesen werden [104, 105]. Weiterhin scheint es im Zusammenhang mit hormonellen Kreisläufen und in Wechselwirkung mit dem Parathormon zu stehen [106, 107].

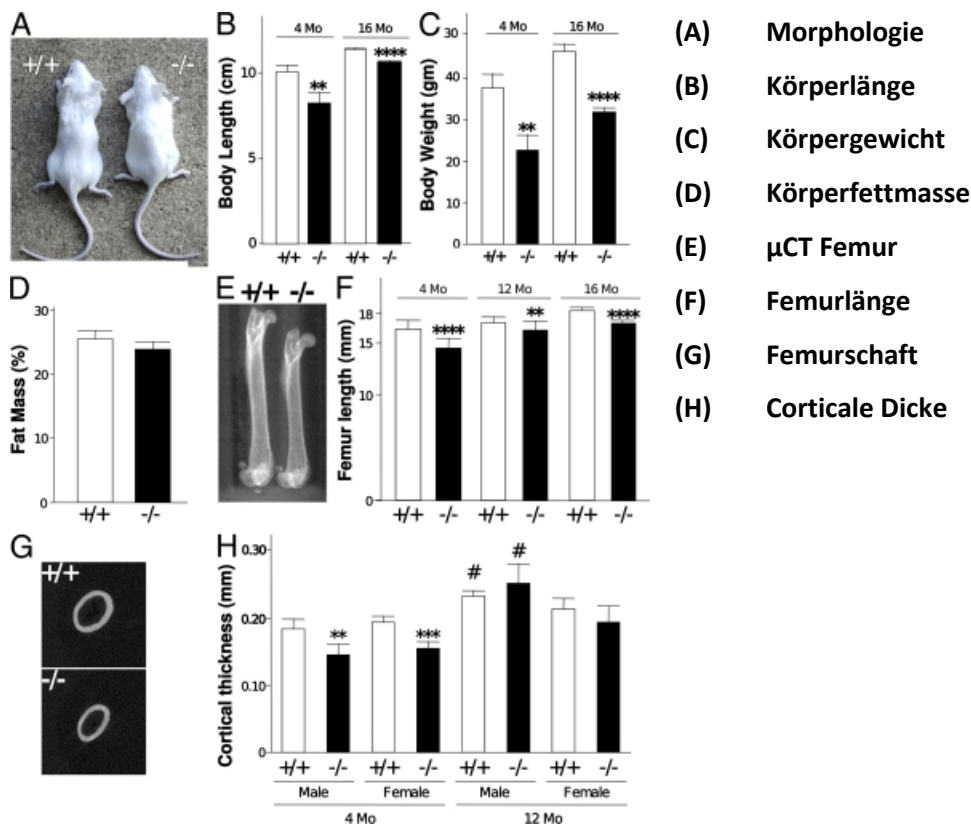


Abbildung 9: Morphologie und skelettale Morphometrie von BSP-Knockout-Mäusen [105]

Neben dem Vorkommen als nichtkollagenes Protein der Knochenmatrix wird das BSP im Trophoblasten der Plazenta, sowie im Rahmen maligner Erkrankungen, die zu ossären Metastasen neigen (siehe unten), vermehrt exprimiert [5, 100]. Des Weiteren konnte es in Thrombozyten nachgewiesen werden. Hierbei wird von einem über die Blutplättchen abhängigen Aufnahmeprozess mittels Endozytose ausgegangen [126].

Aus orthopädisch-unfallchirurgischer Sicht kann das BSP, als synovialer Marker, zur Differenzierung periprotetischer Gelenkinfektionen sowie aseptischer Lockerung nach Implantation einer Totalendoprothese herangezogen werden. Dies kann anhand einer aktuellen Studie, die 2020 im Journal of Orthopaedic Surgery and Research veröffentlicht wurde, erläutert werden. Hierbei wurden BSP und C-reaktives Protein (CRP), bei oben genannten Komplikationen, nach Totalendoprothesen Versorgung vor geplanter operativer Revision in einer synovialen Probe untersucht. Es zeigten sich signifikant höhere BSP-Werte bei Patienten mit aseptischem Versagen. Das CRP wies eine eher mittelmäßige Aussagekraft auf [111]. Saxne und Kollegen konnten zudem eine erhöhte BSP-Konzentration in der Gelenkflüssigkeit von Patienten mit

rheumatoider Arthritis nachweisen [140]. Auf das gelenknahe Vorkommen von BSP wird im Rahmen der Ergebnisdiskussion nochmals genauer eingegangen.

Das BSP dient im Zuge des Gelenkersatzes nicht nur als diagnostischer Marker. Insuffiziente Implantate stellen bis heute eine große Herausforderung für Operateure und Patienten dar. Demnach wird nach einem Weg gesucht, die Integrität der Prothesen zum Knochen an deren Grenzflächen zu verbessern. 2016 konnte durch das Unfallchirurgische Labor der Universitätsmedizin Mainz eine Steigerung der Osseointegration von Prothesenmaterial durch BSP-beschichtete Titanimplantate nachgewiesen werden [112].

2.2.2.3 BSP und maligne Erkrankungen

Dieses Thema erhält im Rahmen dieser Dissertation einen gesonderten Unterpunkt, da das BSP für die Krebsforschung vor allem hinsichtlich der Knochenmetastasen zunehmend interessanter wird. Mittels Beeinflussung der Bildung bzw. des Voranschreitens von Knochenmetastasen könnten sich im Rahmen der Krebstherapie neue Ansätze ergeben. Bereits 1994 konnte das BSP im Rahmen einer Studie von Bellahcène mit malignen Mammaläsionen in Verbindung gebracht werden. Die Untersuchung gestaltete sich wie folgt. Bei insgesamt 79 Brustläsionen, hiervon 28 benignen und 51 malignen Entität, wurde mittels Immunperoxidase die Expression von BSP analysiert. Bei vor allem den bösartigen mikrokalkbildenden Läsionen konnte eine beachtlich gesteigerte BSP-Expression in Brustkrebszellen nachgewiesen werden. Demnach findet sich bei der Entstehung neuer Hydroxylapatitkristalle ein Anstieg des BSP [113]. Diei und Kollegen konnten den Einfluss mittels Radioimmunassay (RIA) bestätigen [114]. In einer Studie, welche im Jahre 1998 veröffentlicht wurde, konnte das erste Mal eine Korrelation zwischen dem BSP und dem Prostatakarzinom verdeutlicht werden. Der Anatomie nach ist bekannt, dass die Vorsteherdrüse mit dem venösen System der Wirbelsäule in Verbindung steht. Dies ermöglicht das Anheften karzinomatöser Zellen an das Knochenmark und dem umliegenden ossären Gewebe. Hierbei stellte sich das BSP bei insgesamt 180 an Stadium A bzw. B erkrankten Patienten mit Zustand nach radikaler Prostatektomie als signifikant prognostischer Marker bei Adenokarzinomen der Prostata dar [115]. Die Forschung bezüglich des Zusammenhangs des BSP mit malignen Erkrankungen setzte sich fort in einer

aktuelleren Studie von Fedarko und Kollegen. Diese ergab ein hohes Maß an Spezifität sowie Sensitivität für BSP und OPN im Rahmen einiger Krebserkrankungen. Hierbei wurde das Serum von Patienten untersucht, die zum Zeitpunkt der Analyse bekanntlich an Brust-, Prostata-, Colon- bzw. Lungenkrebs erkrankt waren. Eine besonders hohe Korrelation konnte vor allem beim Mamma- sowie Colon-, gefolgt vom Prostatakarzinom nachgewiesen werden [116]. Um in die Mechanismen der BSP-Expression einen tieferen Einblick zu erlangen, wurde vermehrt zum Thema Brustkrebs geforscht. Barnes und Kollegen konnten zum ersten Mal osteoblastenabhängige Transkriptionsfaktoren und den Osteoblastenphänotyp darstellen. Runx2 und MSX2 spielen bei der BSP-Expression eine wichtige Rolle. Runx2 wird insbesondere bei Brustkrebs heterotop exprimiert [117]. Diese Erkenntnisse unterstützen die Hypothese, dass das BSP in engem Zusammenhang mit malignen Erkrankungen steht. Daher könnte es künftig nicht nur für den orthopädisch-unfallchirurgischen Bereich, sondern auch für die Behandlung von Krebserkrankungen potenzielle Therapieansätze bieten.

2.3 Tissue Engineering

Der Begriff Tissue Engineering (TE) wurde vor fast 30 Jahren als neues relevantes Therapiekonzept zur Gewinnung und Regeneration von Biomaterialien eingeführt und beschreibt die Anzucht von unterschiedlichen Geweben. Im Rahmen dieser Dissertation wird hauptsächlich auf das Bone TE Bezug genommen. Hierbei kommt es zur Herstellung eines der Knochenmatrix chemisch und strukturell entsprechenden Ersatzgerüsts, das die Knochenheilung bzw. die Integrität von Osteosynthesematerial nach Frakturversorgung sowie die mechanische Stabilität fördern soll [142, 143]. Vorteil des mittels TE gewonnenen Knochenmaterials ist die physikalischen Eigenschaften unter Einbeziehung unterschiedlicher aktivierender/hemmender Faktoren bzw. zelluläre Verhaltensweisen für jeweils ein bestimmtes osteoinduktives Protein zu bestimmen. Neben all den Vorteilen des TE gibt es jedoch auch Grenzen und Hindernisse, die es anhand weiterführender Forschung zu überwinden gilt. Gerade bei umfangreicheren Defekten stellte sich die Gewebsregeneration als unzureichend heraus. Ein erfolgreiches TE hängt von zahlreichen unterschiedlichen Faktoren ab, hierfür ist die Sicherstellung einer für das Biomaterial physiologischen Umgebung ausschlaggebend. Alle Komponenten, die im Rahmen der Knochenentwicklung (siehe 2.1, 2.2) eine Rolle spielen, müssen hierbei in Betracht gezogen werden [144].

2.3.1 Techniken des Bone Tissue Engineering am Tiermodell

2.3.1.1 Heterotope Ossifikation

Verletzungen bzw. Erkrankungen des Knochen- und Gelenkapparates gehen nicht immer mit einem frischen ossären Defekt einher, weswegen Techniken des TE zur Bildung von Knochengewebe de novo entwickelt und eingesetzt wurden. Des Weiteren gestaltet sich die gezielte Differenzierung der osteoinduktiven Wirkung einzelner Proteine bzw. am Knochenstoffwechsel beteiligter Komponenten im Defektmodell schwierig, da im Rahmen des Remodelings zahlreiche voneinander abhängige Regelkreisläufe beeinflusst werden. Fraglich knochenbildende Komponenten können spezifisch unter normalen physiologischen Bedingungen untersucht und bewertet werden. Der Begriff „ektop“ (*griech. „weg von einem Ort“*) bezieht sich hinsichtlich der

Ossifikation auf die Bildung von Knochengewebe de novo außerhalb der üblichen Lokalisation. Im Rahmen von wissenschaftlichen Untersuchungen wird dieses Ereignis meist experimentell herbeigeführt, es kann jedoch auch im klinischen Bereich hinsichtlich bestimmter Pathologien wie Gewebsmalformationen eine Rolle spielen. Als Beispiel hierfür kann die Fibrodysplasia ossificans progressiva genannt werden. Die HO bildende Erkrankung beruht auf einer Mutation im ACVR1-Gen mit resultierender Aktivitätssteigerung des BMP1 [169, 170, 172]. Des Weiteren soll es insbesondere nach invasiven Eingriffen bei etwa 10 % der Patienten zum Nachweis ektooper Ossifikationen kommen. Ursächlich hierfür wird ein Zusammenhang zwischen lokal entzündlichen Prozessen und der Einwanderung von Knochenvorläuferzellen ähnlich den Vorgängen im Rahmen des Remodelings vermutet [171]. Die folgende Tabelle zeigt einen Überblick über einige der bereits durchgeführten Untersuchungen in ektooper TE-Technik. Hierbei konnte vor allem das BMP (Tabelle 3) in vivo ektooper osteoinduktive Wirkung zeigen, weswegen es seinen Platz als Positivkontrolle im Rahmen dieser Arbeit fand. Das BSP ist in puncto de novo HO in vivo noch weitestgehend unerforscht und ist Hauptgegenstand dieser Dissertation.

Biomaterial	Osteogenic factors	Cell source	Model organism	Bone marrow	New calcified tissue	Time <i>in vivo</i>	Author/Reference
Decellularised, demineralised bone+2% low-viscosity alginate hydrogel	±VEGF, ±BMP-2, ±PTHrP, ±VitD3, ±TGF-β ₃	±STRO-1-enriched human bone MSCs	MF1 nu/nu mice	No/unknown	Yes	28 days	Gothard et al., 2015
Polyacrylamide gel with conjugated Col-I surface	none	±Human bone marrow MSCs	Athymic nu/nu mice, and NSG mice	Yes	No	4 weeks	Lee et al., 2012
Pro Osteon 500 (coral trabecular exoskeleton – 90% hydroxyapatite and calcium carbonate/calcium triphosphate)	±BMP-2	Unseeded (host-recruited MSCs)	Sprague Dawley rats	Yes	Yes (bone remodelling)	6 weeks	Holt et al., 2005
β-TCP, ±Matrigel, ±type I/III collagen	none	Human or mouse bone marrow MSCs	C57BL/6 mice	Yes	No	Up to 8 weeks	Ventura Ferreira et al., 2016
Melt-electrospun mPCL coated with calcium phosphate+fibrin glue	BMP-7	Human osteoblasts	NOD/SCID mice	Yes	Yes	Up to 24 weeks	Holzapel et al., 2014; Martine et al., 2017; Thibaudeau et al., 2014, 2015
Solution-electrospun mPCL coated with CaP+fibrin glue	BMP-7	Human osteoblasts	NOD/SCID mice	Yes	Yes	Up to 19 weeks	Hesami et al., 2014; Quent et al., 2018
mPCL:β-TCP (80:20) cylinder formed by fused deposition modelling	BMP-7	Human osteoblasts	NOD/SCID mice	Yes	Yes	12 weeks	Quent et al., 2018
Collagraft™ (porous composite of 65% hydroxyapatite and 35% β-TCP) embedded in a bovine type I collagen hydrogel	BMP-2	Human periosteum-derived cells	NMRI nu/nu mice	Yes	Yes	Up to 8 weeks	Eyckmans et al., 2010
Tanium fibre scaffolds and hydroxyapatite:β-TCP (60:40) scaffolds	none	Rat BMSCs	Fisher 344 rats	Yes	Yes	Up to 6 weeks	Hartman et al., 2005

BMP, bone morphogenetic protein; BMSCs, bone marrow-derived mesenchymal stem cells; CaP, calcium phosphate; Col-I, type I collagen; mPCL, medical grade poly-ε-caprolactone; MSCs, mesenchymal stem/stromal cells; PTHrP, parathyroid hormone-related protein; β-TCP, β-tricalcium phosphate; TGF-β, transforming growth factor-β; VEGF, vascular endothelial growth factor; VitD3, vitamin D3.

Tabelle 3: Ektopie Tissue-Engineering-Modelle in Ratten und Mäusen [141]

Um eine ektopie Ossifikation im Tierversuch erzielen zu können, bieten sich unterschiedliche Methoden zur Implantierung der Knochenersatzgerüste an. Diese kann subcutan, intramuskulär und innerhalb der Nierenkapsel erfolgen. Am einfachsten gestaltet sich die Einbringung der Knochenersatzgerüste anhand der subcutanen ektopen TE-Methode. Tiefere Gewebsschichten der Versuchstiere werden hierbei nicht verletzt, sodass sich postoperativ eine geringe Komplikationsrate zeigt. Die Implantation sollte hierbei am Rücken des Tieres erfolgen, um einer Manipulation des Eingriffsareals seitens der Versuchstiere entgegenzuwirken. Zahlreiche bisherige Untersuchungen konnten erfolgreich HO-Formationen unter Zugabe von BMP2 als Wachstumsstimuli innerhalb von acht Wochen nachweisen [169, 173, 174, 175]. Ma und Kollegen konnten weiterhin 2011 positive Mineralisationsergebnisse im Rahmen des subcutanen TE für mesenchymale Stammzellen von Hasen mittels Tricalciumphosphat-Scaffold veröffentlichen [176]. Die Osteogenese ist jedoch maßgeblich abhängig von der Anzahl mesenchymaler Stammzellen sowie der osteoinduktiven Stoffe im umliegenden Gewebe. Im Bereich

der Skelettmuskulatur finden sich im Vergleich zur Subcutis insgesamt mehr osteogenetisch relevante Vorläuferzellen, die sich im Rahmen ihrer Differenzierungskaskade zu Osteoblasten weiterentwickeln und demnach Knochengewebe bilden können. Die reine Implantierung eines BSP-Scaffolds ohne Zellzusatz setzt demnach eine ausreichende Anzahl knochenbildender Vorläuferzellen im Einsatzgebiet voraus. Dies war der ausschlaggebende Punkt, warum im Rahmen dieser experimentellen Arbeit die Entscheidung zur intramuskulären (Muscle Pouch) TE-Methode erfolgte. Eine weitere zumal jüngere Methode des ektopen TE stellt die Implantierung des zu untersuchenden Gegenstands innerhalb der Nierenkapsel dar. Sie wird im Vergleich zu den vorherig genannten Techniken insgesamt seltener verwendet, da sich die chirurgische Technik bzw. Einbringen des Untersuchungsmaterials insgesamt schwieriger sowie komplikationsreicher gestaltet [169].

2.3.1.2 Muskel-Pouch-Modell

Bereits 1988 konnten Takaoka und Kollegen im Rahmen eines Muskeltaschenexperiments die osteoinduktive Wirkung von BMP nachweisen. Weitere in vivo Studien hinsichtlich des BMP-induzierten ektopen Bone TE folgten im Laufe der Zeit [169, 177, 178]. Das Muskel-Pouch-Verfahren wurde im Rahmen wissenschaftlicher Untersuchungen bereits an zahlreichen Spezies angewandt. Die Studien beziehen sich meist auf Nagetierversuche, jedoch existieren daneben zahlreiche Ergebnisse zu Versuchen an Großtieren. So konnten Barbieri und Kollegen allein für Calciumphosphat-Scaffolds ohne Zell-/Proteinzusatz bereits Mineralisationen in Schafen und Hunden nachweisen [179, 180]. Es erfolgten in diesem Bereich zudem in vivo Studien am Menschen. 2004 implantierten Warnke und Kollegen einem männlichen Erwachsenen ein computergestützt angepasstes Knochentransplantat eines ausgedehnten knöchernen Defekts des Unterkiefers in den Musculus latissimus dorsi. Das Knochenersatzgerüst bestand aus einem Titannetz, welches mit Knochenmineralanteilen unter Zugabe von BMP sowie autologem Knochenmarksgewebe infiltriert wurde. Nach sieben Wochen konnte das dadurch gebildete Gewebskonstrukt tatsächlich im Rahmen einer Ersatzplastik im Bereich des Unterkieferdefekts erfolgreich transplantiert werden. Die Skelettszintigraphie

detektierte Prozesse des Knochenumbaus sowie der Mineralisation vor als auch nach der Transplantation des Knochenersatzes. CT-graphisch konnte die Bildung von Knochen de novo bewiesen werden [181].

2.3.2 Biomaterialien

2.3.2.1 Bedeutung von Biomaterialien im Alltag

Biomaterialien stellen die Grundlage der modernen regenerativen Therapiemethoden dar. Sie werden als biologische Ersatzstoffe für den Einsatz im klinischen Alltag hergestellt und spielen vor allem im Bereich des Bone TE bei kritischen Knochendefekten bzw. Erkrankungen, die mit einem knöchernen Substanzverlust einhergehen eine besondere Rolle. Vor allem die Problematik der alternden Bevölkerung verdeutlicht die Notwendigkeit innovativer Verfahren hinsichtlich biokompatibler Materialien. Menschen höheren Alters weisen eine verminderte Knochenmineralisierung sowie erhöhte Sturzneigung auf. Daraus resultierend ergeben sich gesteigerte Inzidenzen für Frakturen sowie Komplikationen im postinterventionellen Verlauf [183, 185]. Um dieser Herausforderung entgegenzuwirken, befassen sich zahlreiche Studien mit der Suche nach Biomaterialien, die im Rahmen der Therapie von Knochenerkrankungen zum Einsatz kommen könnten. Ziel hierbei ist es, die Regeneration des Knochengewebes zu fördern und bereits bestehende Therapiemöglichkeiten (siehe 2.4) zu optimieren [184, 185].

2.3.2.2 Arten von Biomaterialien

Aufgrund der Vielfalt bereits bekannter Biomaterialien erfolgt zunächst die Darstellung der einzelnen Komponenten zur besseren Übersicht anhand eines vereinfachten Schemas (siehe Abbildung 10). Hierbei werden keramik- und ECM-basierte sowie polymere Biomaterialien unterschieden.

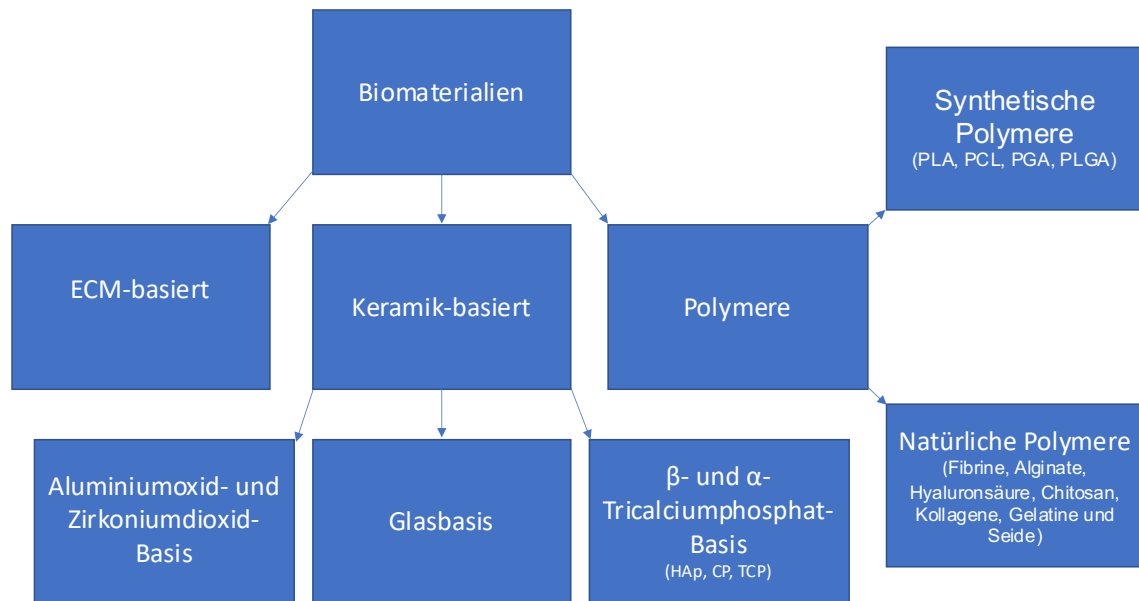


Abbildung 10: Arten von Biomaterialien Übersicht [eigene Quelle in Anlehnung 187-197]

Keramik-basierte Biomaterialien werden hinsichtlich ihres chemischen Verhaltens (Resorption, Aktivität) in unterschiedliche Gruppen eingeteilt (siehe Tabelle 4). Sie weisen insbesondere eine hohe mit dem menschlichen Körper vergleichbare Biokompatibilität sowie Bioaktivität auf und wirken zelladhäsiv sowie osteoinduktiv-/konduktiv. Diese Eigenschaften gewährleisten ohne den Zusatz induktiver Substanzen eine In-situ-Knochenregeneration [187-190].

Biokeramik	Chemisches Verhalten
Aluminiumoxid- und Zirkoniumdioxid-Basis	Nahezu inert
Glasbasis	Bioaktiv
β- und α-Tricalciumphosphat-Basis	Resorbierbar

Tabelle 4: Keramik-basierte Biomaterialien und ihr chemisches Verhalten [eigene Quelle in Anlehnung 188]

ECM-basierte Biomaterialien bestehen aus dezellularisierter extrazellulärer Matrix. Ihre Eigenschaften kommen den physiologischen Bedingungen innerhalb eines bestimmten Areals auf zellulärer Ebene strukturell am nächsten. Sie stimulieren die

Aktivierung der Differenzierung endogener Vorläuferzellen und der jeweiligen Signalkaskaden [191]. Die Gewinnung der biologischen Ersatzmaterialien erfolgt über einen Prozess der Dezellularisierung von Geweben der Harnblasenmatrix und Dünndarmsubmukosa [192].

Polymere sind allgemein betrachtet makromolekulare Strukturen, die in puncto biologischer Ersatzmaterialien zunehmend an wissenschaftlichem Interesse gewinnen. Sie lassen sich in eine synthetisch hergestellte sowie natürliche Gruppe einteilen. Synthetische Polymere weisen gute physikalische und mechanische Eigenschaften hinsichtlich ihrer Steifigkeit, Resorption sowie Porosität auf. Die Herstellung synthetischer Biomaterialien ermöglicht es ein dem Patienten individuell angepasstes Gerüst zu entwerfen, welches sich in seiner Anatomie und Physiologie dem Zielbereich ähnelt. Im Bereich des Tissue Engineering kommen vor allem Polylaktatsäure (**PLA**), Polycaprolacton (**PCL**), Polyglykolid (**PGA**) und deren Copolymere wie Poly-Lactid-Co-Glydolid (**PLGA**) zum Einsatz [193, 194]. Natürliche Polymere sind Biomaterialien, die adäquate biologisch resorptive und biokompatible Eigenschaften aufweisen. Sie werden aus Polysacchariden und Proteinen gewonnen [195]. Hierzu gehören einerseits Fibrine, Alginate, Hyaluronsäure und Chitosan, welches aus Chitin gewonnen wird [196]. Des Weiteren finden Kollagene, Gelatine und Seide Anwendung im Rahmen der Rubrik der biologischen Ersatzmaterialien [197].

2.3.2.3 Knochenersatzgerüste

Im Rahmen des Bone TE sind Knochenersatzgerüste (*engl. Scaffolds*) von enormer Bedeutung, da sie als physiologische Grundlage den Prozess einer Ossifikation erst möglich machen. Es handelt sich hierbei um Biomaterialien (siehe 2.3.2), die die Zelladhäsion und damit die Bildung von Knochengewebe ermöglichen. Sie sind durchlässig für Flüssigkeiten und gewährleisten demnach zellmigrations- sowie diffusionsabhängige Vorgänge [156]. Voraussetzung für eine erfolgreiche TE mittels Scaffolds (siehe Tabelle 5) sind biokompatible Komponenten, die im Rahmen des Knochenstoffwechsels eine osteoinduktive/-integrative Wirkung zeigen [157]. Sie sollten zudem eine hohe Porosität bei trotz allem mechanischer Stabilität sowie eine ausreichende Größe der Poren aufweisen, damit die Zellintegrität innerhalb des

Gerüsts sowie deren Nutrition über Diffusion gewährleistet sind [161]. Abbildung 11 stellt die aktuell gängigsten Methoden zur Herstellung von Scaffolds im Rahmen des Bone TE dar. Hierbei kommen Nanofaser-, Hydrogel- sowie 3D-Drucker-Technologien zum Einsatz. Es zeigen sich zunehmend wissenschaftliche Fortschritte im Bereich der mittels 3D-/4D-Drucker hergestellten Knochenersatzgerüste, die die Anwendung von knöchernen sowie knorpeligen Ersatzmaterialien im klinischen Alltag verbessern könnten [158]. Die Technik des 3D-Druckers liegt in einer flexiblen steuerbaren Plattform, die unter Verwendung einer strukturellen Vorlage mittels Bioprinting ein individualisiertes hochspezialisiertes Gerüst bilden kann. Dies erfolgt über den additiven Aufbau mehrerer Schichten von Biotinten und -materialien. Anhand computertomographischer Bildgebung können computergesteuert flexible 3D-Scaffolds (Rapid Prototyping), die dem physiologischen Knochengewebe stark ähneln, gefertigt und gegebenenfalls dem individuellen Substanzdefekt angepasst und eingebracht werden [159, 160].

Biokompatibilität/-aktivität	-physiologische Zellaktivität -keine immunogenen/toxischen Nebenwirkungen -osteokonduktive/-induktive/-genetische Wirkung -Förderung Angiogenese
Biodegradierbarkeit	-biologisch kontrollierter Abbau zur Ermöglichung des Knocheneinwuchs
Stabilität	-mechanische Widerstandsfähigkeit
Porosität	-Gewährleistung von Zellmigration und Nähr- und Sauerstofftransports (Porengröße 200 bis 350 µm)

Tabelle 5: Anforderungen an Knochenersatzgerüste [eigene Quelle in Anlehnung 186]

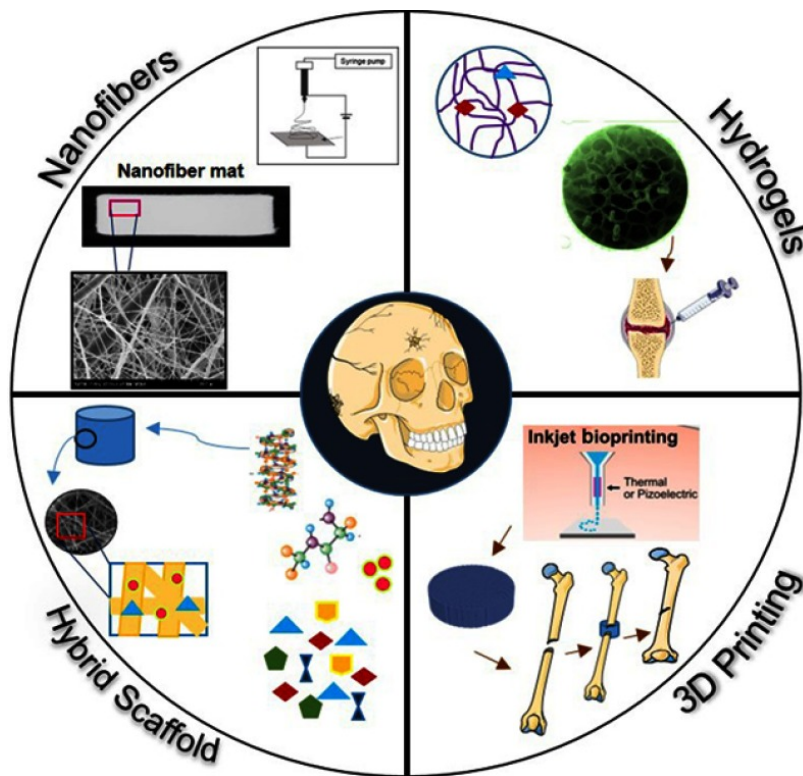


Abbildung 11: Darstellung der Herstellungsmethoden von Knochenersatzgerüsten [158]

2.3.3 Therapiemöglichkeiten im klinischen Alltag

2.3.3.1 Autologe und allogene Knochen transplantation

Im Zuge der Therapiemethoden steht der Medizin bei komplizierten ossären Verhältnissen die Möglichkeit einer Knochen transplantation (*engl. bonegraft*) zur Verfügung. Sie findet vor allem Anwendung bei Knochengewebsdefekten, die nicht über rein physiologische Prozesse zu einer ausreichenden Regeneration führen können. Chronische Erkrankungen (Diabetes mellitus), Suchterkrankungen (Nikotin-/Alkohol-Abusus) sowie ein hohes Alter stellen Risikofaktoren für mangelnde körpereigener Reparaturmöglichkeiten hinsichtlich des Remodelings dar. Bonegrafts werden im klinischen Alltag häufig im Bereich der chirurgischen Orthopädie sowie der Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie verwendet. Sie sollten ähnlich den Biomaterialien hinsichtlich ihrer Eigenschaften ein osteoinduktives (Matrixproteine und Wachstumsfaktoren), -konduktives (Gerüst) sowie osteogenetisches (ossäre Vorläuferzellen) Potenzial aufweisen. Hierfür eignet sich besonders der autologe Ersatz mittels trabekulären bzw. corticalen Knochens [198]. Die Entnahme des

Materials kann an zahlreichen Loci des Körpers (Rippen, Tibia, Calcaneus) erfolgen, jedoch stellt die Gewinnung aus dem vorderen Beckenkamm die gängigste Methode dar, um eine ausreichende Menge an Material zu erhalten. Aufgrund der Zugehörigkeit des Implantats zum eigenen Körper zeigen sich nach Einbringung autologen Knochens kaum immunogene Nebenwirkungen [199]. Trotz der zahlreichen Vorteile muss jedoch die Tatsache in Betracht gezogen werden, dass der zusätzliche interventionelle Eingriff zur Materialgewinnung weitere Komplikationen (Blutungen, Entzündungen, Infektionen, Sensibilitätsstörungen) in bis zu 10 % der Fälle mit sich bringen kann [200].

Alternativ zum autologen Knochenersatz gibt es die Möglichkeit das Transplantatmaterial aus Spendern (Tod-/Lebendspender) zu gewinnen. Dies stellt das allogene Bonegraft-Verfahren dar. Es eignet sich besonders zur Behandlung größerer Defekte, da sich die Materialmenge autologen Ersatzes als begrenzt darstellt. Ein weiterer Vorteil ergibt sich daraus, dass sich der Patient keinem zusätzlichen Eingriff zwecks Materialentnahme unterziehen muss. Dennoch stellt das körperfremde Implantat einen potenziellen Risikofaktor für Immun- und Abstoßungsreaktionen sowie die Übertragung von Krankheiten dar. Derartige Komplikationen können den postinterventionellen Verlauf maßgeblich ungünstig beeinflussen. Verglichen mit dem autologen Knochenersatz zeigen sich für die allogene Variante insgesamt schwächere Eigenschaften hinsichtlich der osteoinduktiven sowie osteogenetischen Wirkung, da Spendertransplantate nach der Entnahme im Rahmen ihrer Aufbereitung zur Prävention von schweren Immunreaktionen devitalisiert werden (Bestrahlung, Tiefkühlung). Matrixproteine sowie Osteoprogenitorzellen sind nicht in der Lage derartige Verfahren zu überleben. Allogenes Knochenmaterial ist als Puder, Granulat oder Späne/Blöcke erhältlich und kann je nach Anforderungen in angepasster Form implantiert werden. Im Falle einer dennoch unzureichenden Defektdeckung besteht weiterhin die Möglichkeit der Einbringung von demineralisierter Knochenmatrix [198, 201].

Welches Verfahren am Ende gewählt wird hängt von zahlreichen unterschiedlichen Faktoren ab und ist wie so oft in der Medizin eine dem Patienten angepasste Einzelfallentscheidung. Hierbei spielen die Art des Knochendefekts (Form, Größe, chirurgische Intervention) sowie der Patient selbst (grundlegende Erkrankungen, Alter, Mobilität) die entscheidende Rolle hinsichtlich der Entscheidungsfindung. Die autologe

Spongiosaplastik stellt aktuell den Goldstandard dar [198]. Trabekuläres Knochenmaterial weist aufgrund einer vergrößerten Oberfläche eine gesteigerte osteogenetische sowie osteoinduktive Wirkung auf. Knochenzellen unterschiedlicher Differenzierungsgrade können demnach vermehrt an der spongiösen Kontaktfläche anheften und im Rahmen des Remodelings neues Knochengewebe generieren [202]. Über das Trabekelnetzwerk kann eine rasche Revaskularisierung des Gewebes erfolgen, die bereits zwei Tage postinterventionell beginnt [203].

2.3.3.2 Biologische Knochenersatzmaterialien

Alternativ zum autologen bzw. allogenen Knochenersatz wurden weiterhin biologische Materialien entwickelt, die aktuell einen bedeutsamen Gegenstand der Forschung darstellen (siehe 2.3.2). Sie wirken hinsichtlich der Regeneration von Knochengewebe fördernd, indem sie die Migration, Proliferation sowie Differenzierung der am Remodeling beteiligten Knochenzellen beeinflussen. Neben dem alleinigen Einsatz hinsichtlich kritischer Knochendefekte können Knochenersatzmaterialien als Gerüst mit den allogenen Methoden kombiniert werden [204, 205]. Calciumphosphate als Vertreter der Biokeramiken kommen als biologisches Ersatzmaterial im therapeutischen Bereich der Orthopädie sowie Zahnmedizin häufig zum Einsatz. Sie können als Filler entsprechend der Form eines Knochendefekts oder als Beschichtung eingesetzt und mittels Zugabe von einzelnen bzw. mehreren Spurenelementen wie Magnesium oder Zink an die physiologischen Knochenbedingungen des Menschen angepasst werden [206, 207]. Polymere Biomaterialien nehmen weiterhin eine bedeutsame Rolle in der Medizin ein. Kollagene und Hyaluronsäuren kommen im menschlichen Organismus in zahlreichen Geweben vor und bilden die Grundlage vor allem bindegewebsartiger Strukturen. Sie können beispielsweise als Hydrogel-Präparat zur Förderung der Wund- sowie Knochenheilung bzw. über Gelenkinjektionen zur Regeneration von Knorpelgewebe beitragen [208, 209]. Ein weiteres wichtiges Proteinpolymer stellt das Fibrin dar. Es spielt vor allem in der Hämostase im Zuge der Wundheilung eine besondere Rolle und weist sowohl elastische als auch viskose Eigenschaften auf. Vor allem bioaktive Moleküle können in Verbindung mit Fibrin die Gewebsentwicklung fördern und finden im Rahmen unterschiedlicher Bereiche des Tissue Engineering Anwendung [112].

2.3.3.3 Osteoinduktive Wachstumsfaktoren

Allgemein betrachtet handelt es sich bei Wachstumsfaktoren um proteinogene Signale, die eine Interaktion zweier Zellen induzieren können. Weiterhin übernehmen sie entscheidende Funktionen hinsichtlich eines jeden Zellzyklus durch Aktivierung bestimmter Signalkaskaden. Die Signalübermittlung erfolgt über einen spezifischen Zellmembranrezeptor (Tyrosinkinase-Rezeptor). Bei Kontakt beider Kommunikationspartner kommt es zu Phosphorylierungsprozessen und zur Entstehung neuer potenzieller Bindungsstellen am C-Terminus der phosphorylierten Tyrosin-Reste. Hieraus resultieren zahlreiche Signalwege, die miteinander interagieren und ihre Wirkung auf den Zellzyklus letztlich auf Ebene der Transkription entfalten [244].

Wachstumsfaktoren stellen weiterhin einen maßgeblichen Teil hinsichtlich des Knochenstoffwechsels dar. Sie agieren als Kommunikationspartner zwischen den unterschiedlichen Subsystemen des Remodelings und besitzen bedarfsangepasst osteoinduktive, -aktivierende als auch -inhibierende Eigenschaften zur Regulierung unterschiedlicher Zellfunktionen. Als Polypeptide bzw. Proteine binden sie an spezielle Oberflächenrezeptoren der Knochenzellen und nehmen Einfluss auf deren Proliferation und Differenzierung. Des Weiteren steuern sie als Signalmoleküle Prozesse der Migration sowie des programmierten Zelltods. Zur Reihe, der bereits im klinischen Alltag verwendeten osteoinduktiven Wachstumsfaktoren gehören unter anderem der PDGF (Platelet-Derived Growth Factor), VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), IGF (Insulin-like Growth Factor) und die BMPs. PDGF und IGF werden im Rahmen von zahnmedizinischen Operationen zur Regeneration des Parodontiums eingesetzt [215]. In Kapitel 2.2.1 wurde im Rahmen dieser Dissertation bereits ausführlich über die Reihe der BMP berichtet. Insbesondere das BMP-2 sowie -7 sind bereits im klinischen Alltag zur unterstützenden Therapie bei Knochendefekten, Pseudarthrosen und in der Wirbelsäulen Chirurgie zugelassen [213, 214]. Im Zuge der steigenden Anzahl klinischer Anwendungen, vor allem des BMP-2, konnte hierfür weiterhin ein gut strukturiertes Nebenwirkungsprofil erstellt werden. Hierzu zählen neben postoperativen Entzündungen sowie ektopen Ossifikationen die unangemessene adipozytäre Genese und osteoklasten-induzierte Knochenresorption [214].

Zusammenfassend lässt sich bereits zum aktuellen Zeitpunkt eine große Bandbreite an Behandlungsmethoden hinsichtlich des Knochenersatzes bzw. der Faktoren zur Förderung der Knochenregeneration darstellen. Die Forschung zum Thema Tissue Engineering wird für die Medizin auch in Zukunft eine enorme Rolle spielen, da der Bedarf an vor allem biologischen Ersatzmaterialien mit dem steigenden Alter der Bevölkerung kontinuierlich zunimmt. Das im Rahmen dieser Dissertation untersuchte BSP als Matrixprotein des Extrazellularraums könnte sich zukünftig zu einem maßgeblichen Teil der Behandlung von Knochenpathologien bis hin zu malignen Erkrankungen entwickeln.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Implantations- und Fixierungssubstanzen

Substanz	Bezugsquelle
Rat BSP-2 (BSP-2 der Ratte aus CHO-Zelllinie) #Batch2 08.11.17 MT	<i>The Antibody Lab, Protein BESTCell, Wien, Österreich</i>
Human BMP-7 research grade (rekombinantes humanes BMP-7 aus CHO-Zelllinie)130-103-436	<i>MACS, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland</i>
Human BMP-2 research grade (rekombinantes humanes BMP-2 aus CHO-Zelllinie) 130-110-926	<i>MACS, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland</i>
Atelocollagen, Honeycomb disc 96 (kollagene Trägersubstanz aus Knochenhaut) 758118	<i>COSMO BIO CO., LTD., Tokio, Japan</i>
NaCl 0,9 % (Natriumchloridlösung 0,9 %)	<i>B. Braun, Melsungen AG, Melsungen Deutschland</i>
Aqua destillata (destilliertes Wasser)	<i>B. Braun, Melsungen AG, Melsungen Deutschland</i>
Formaldehydlösung 37 % (Fixierungssubstanz)	<i>Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland</i>
RNAlater™ (RNA-Stabilisierungslösung)	<i>Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts</i>

Tabelle 6: Material, Implantations- und Fixierungssubstanzen

3.1.2 Medikamente

Substanz/Wirkstoff	Bezugsquelle
Fentanyl	<i>Janssen-Cilag GmbH, Neuss, Deutschland</i>
Midazolam	<i>Ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland</i>
Medetomidin	<i>Fort Dodge Veterinär GmbH, Würselen, Deutschland</i>
Flumazenil	<i>Roche Pharma AG, Basel, Schweiz</i>
Atipamezol	<i>Zoetis Deutschland GmbH, Berlin, Deutschland</i>
Tramadol-Lösung	<i>Ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland</i>
Isofluran	<i>AbbVie Deutschland GmbH & Co. KG, Wiesbaden, Deutschland</i>
<i>Corneregel[®] (Gel zur Behandlung nichtentzündlicher Hornhauterkrankungen)</i>	<i>Bausch & Lomb, Berlin, Deutschland</i>

Tabelle 7: Material, Medikamente

3.1.3 Verbrauchsmaterial und Instrumentarien

Material	Bezugsquelle
Povidon-Jod-Lösung	<i>B. Braun, Melsungen AG, Melsungen, Deutschland</i>
Einmalskalpell, 11er Figuration	<i>Safety Razor Co., Osaka, Japan</i>
Wundspreizer	<i>Aesculap AG Co. KG, Tuttlingen, Deutschland</i>
Nadelhalter	<i>Aesculap AG Co. KG, Tuttlingen, Deutschland</i>
Vicryl (subcutannahtmaterial aus Polyglactid, resorbierbar)	<i>Johnson + Johnson International, New Brunswick, USA</i>
Ethilon (Hautnahtmaterial, nicht-resorbierbar)	<i>Johnson + Johnson International, New Brunswick, USA</i>
Sterile Kompressen	<i>Paul Hartmann AG, Heidenheim a.d. Brenz, Deutschland</i>
Sterile OP-Tücher	<i>Paul Hartmann AG, Heidenheim a.d. Brenz, Deutschland</i>

Tabelle 8: Material, Verbrauchsmaterial und Instrumentar

3.1.4 Versuchstiere

Im Rahmen der kompletten Versuchsreihe wurden insgesamt 51 männliche Wistar-Ratten des TARC-Translational Animal Research Centers in Mainz nach Genehmigung durch das Landesuntersuchungsamt Rheinland-Pfalz (§ 8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes, Tierversuchsnummer: 23177-07/G17-1-064) analog der experimentell etablierten Muskel-Pouch-Methode operiert und untersucht. Die Tiere wurden über die Zuchtstelle Janvier Europe extra für Tierversuche gesetzeskonform freigegeben und erreichten ihre neuen Räumlichkeiten in einem Alter von etwa 8 Wochen. Sie erhielten durchschnittlich eine Eingewöhnungszeit von einer Woche,

bevor der Versuchsstart erfolgte. Während des gesamten Versuchszeitraums befanden sie sich meist zu zweit innerhalb eines Käfigs mit dauerhaft bereitgestellter Nahrung (Trockenfutter) sowie Wasser. So konnte der stetige Kontakt zu Artgenossen bei genügend Freiraum für die einzelnen Tiere selbst geschaffen werden. Die Unterkunft der Versuchstiere unterlag einem halbtägigen Tag-Nacht-Rhythmus, welcher künstlich im Sinne einer artgerechten Haltung erzeugt wurde. Die weltweit geltenden Normen sowie Regeln hinsichtlich der Haltung und Handhabung von Versuchstieren wurden stets beachtet und mit höchstem Respekt behandelt.

3.1.5 Geräte

Die Röntgendiagnostik erfolgte mittels eines konventionellen Röntgenapparates (Faxitron®MX-20, Faxitron x-ray Company, Lincolnshire, USA) sowie μ CT-graphisch (Scanco μ CT 40, Scanco Medical, Brüttisellen, Schweiz).

3.2 Methoden

Im Rahmen dieser Promotionsarbeit sollte die Induktionsfähigkeit einer HO durch BSP unterschiedlicher Konzentrationen in einem Tierversuchsmodell geprüft werden. Das BMP diente hierbei als Positivkontrolle (PK) und Vergleichswert der HO. Als Negativkontrolle (NK) dienten Natriumchlorid (NaCl) sowie Aqua destillata. Die substanztragenden Kollagenschwämme wurden 51 Ratten via Muskel-Pouch-Modell implantiert. Zur Analyse der Knochenbildung wurden die Versuchstiere in regelmäßigen Abständen radiologisch untersucht. Zudem erfolgten wöchentliche Gewichtskontrollen. Nach fachgerechter Absetzung der Tiere sowie Entnahme der Proben wurden diese zusätzlich im Mikro-CT ausgewertet und teilquantifiziert. Die Verteilung der Versuchstiere wird in der folgenden Tabelle dargestellt. Zunächst erfolgte zur Evaluation des Studienerfolgs die Untersuchung an vier Ratten im Rahmen einer Pilotstudie. Nach Eliminierung der Fehlerquellen sowie Neuberechnung der BSP-Konzentrationen wurde die erste Versuchsreihe mit insgesamt 35 Tieren eingeleitet. Zur weiteren Eruiierung einer lokalisationsabhängigen ektopen Knochenbildung wurden die Scaffolds im Zuge der zweiten Versuchsreihe an unterschiedlichen Stellen an 12 Versuchstieren in Muskel-Pouch-Technik implantiert. Nähere Angaben zu den einzelnen Versuchsreihen werden in den folgenden Kapiteln beschrieben.

Untersuchung	Anzahl Versuchstiere insgesamt	Anzahl Scaffolds insgesamt
Pilotstudie	4	8
1. Versuchsreihe	35	70
2. Versuchsreihe	12	48

Tabelle 9: Aufteilung der Versuchstiere

3.2.1 Arbeiten an der Sterilbank

Die Kollagenschwämme wurden im Rahmen einer Pilotstudie sowie zweier Versuchsreihen am selben Tag der Operation an der Sterilbank in einer Petrischale vorbereitet. Hierbei wurden unten beschriebene Substanzen auf jeweils ein Scaffold pipettiert, welches anschließend in einem Mikroreaktionsgefäß innerhalb einer

gekühlten Isolierbox zu den Operationsräumlichkeiten transportiert und bis kurz vor Operationsbeginn aufbewahrt wurde.



Abbildung 12: Arbeiten an der Sterilbank, Vorbereitung der Kollagenscaffolds in der Petrischale (links), Pipettieren der Untersuchungssubstanz auf Schwämmchen (rechts)

3.2.1.1 Vorbereiten der Pilotstudie

Behandlungsarm	Substanz	Anzahl Scaffolds	Anzahl Versuchstiere
Positivkontrolle	BMP-7	2	1
Negativkontrolle	NaCl	2	1
BSP niedriger Konzentration	BSP	2	1
BSP hoher Konzentration	BSP	2	1

Tabelle 10: Methoden, Vorbereiten der Pilotstudie

Zur Herstellung der Positivkontrolle erfolgte nach Angaben des Herstellers die kurze Zentrifugation des BMP-7 Probenbehälters mit Hinzufügen und Mischen von 100 µl

Essigsäure (20 mmol) mit anschließend Extraktion von 40 µl BMP-7-Essigsäure-Lösung in ein gesondertes steriles Gefäß. Das Substrat wurde mit 360 µl NaCl verdünnt, sodass für insgesamt zwei Kollagenschwämme ein Volumen von 400 µl BMP-7-Essigsäure-NaCl-Lösung gewonnen werden konnte. Die Negativkontrolle bestand im Rahmen der Pilotstudie aus einem Scaffold, das mit 200 µl NaCl benetzt wurde. Die BSP-Probenreihe bestand für den Behandlungsarm der niedrigen Konzentration aus 10,7 µl und für den der höheren Konzentration aus 107 µl der BSP-Standardlösung je Schwamm.

Während des Pipettierens der Substanzen wurde ersichtlich, dass die Menge an Lösung die Aufnahmefähigkeit der Kollagenschwämme überstieg, sodass eine unbekannte Menge an Lösung in der Petrischale verblieb.

3.2.1.2 Vorbereiten der ersten Versuchsreihe

Da die Pilotstudie insbesondere in der Positivkontrolle zu keiner Ossifikation führte, wurde das BMP-7 durch BMP-2 und zusätzlich NaCl durch Aqua destillata ersetzt. Zudem kam es zu einer Änderung des Volumen- sowie Konzentrationsverhältnisses hinsichtlich aller Behandlungsarme, damit der Verbleib der Flüssigkeit innerhalb der Petrischale weitestgehend reduziert werden konnte. Es wurden fortan Atelocollagen, Honeycomb disc 96 (COSMO BIO CO., LTD., Tokio, Japan) als Trägersubstanzen verwendet.

Behandlungsarm	Substanz	Anzahl Scaffolds	Anzahl Versuchstiere
Positivkontrolle	BMP-2	20	10
Negativkontrolle	Aqua destillata	10	5
BSP 0,5 µg	BSP	20	10
BSP 5 µg	BSP	20	10

Tabelle 11: Methoden, Vorbereiten der ersten Versuchsreihe

Zur Herstellung der Positivkontrolle erfolgte die kurze Zentrifugation des BMP-2 Probenbehälters (100 µg) mit anschließendem Hinzufügen und Mischen von 100 µl Aqua destillata. 5 µl der Lösung wurden auf je einen Kollagenschwamm appliziert.

Für die Negativkontrolle wurde jeweils ein Kollagenscaffold mit 5 µl Aqua destillata benetzt. Um eine Konzentration des BSP von 1 µg pro Scaffold erzielen zu können, wurden 10 µl der BSP-Standard-Lösung mit 130 µl Aqua destillata gemischt und 5 µl pro Scaffold aufgetragen. Die Konzentration des höherdosierten BSP mit 10 µg pro Kollagenschwämmchen ergab sich aus der Mischung von 40 µl der BSP-Standard-Lösung mit 16 µl Aqua destillata. Es wurden insgesamt 5 µl pro Scaffold aufgetragen.

3.2.1.3 Vorbereiten der zweiten Versuchsreihe

Aufgrund einer zwischenzeitlichen Änderung der BMP-2-Pulverzusammensetzung (Zugabe von Mannitol sowie Trehalose als Stabilisatoren) und einer wahrscheinlich daraus resultierenden reduzierten Löslichkeit des Pulvers, wurden für die Positivkontrolle je 5 µg BMP-2 in 10 µl Aqua destillata gelöst. Die übrigen Behandlungsarme gestalteten sich in der Herstellung äquivalent zur vorangegangenen Versuchsreihe.

Behandlungsarm	Substanz	Anzahl Scaffolds	Anzahl Versuchstiere
Positivkontrolle	BMP-2	8	2
Negativkontrolle	Aqua destillata	8	2
BSP 0,5 µg	BSP	16	4
BSP 5 µg	BSP	16	4

Tabelle 12: Methoden, Vorbereiten der zweiten Versuchsreihe

3.2.2 Operatives Management

Das präoperative Vorgehen gestaltete sich in allen Versuchen insgesamt gleich. Es erfolgte das Bestellen der Versuchstiere und Abwarten der Eingewöhnungszeit von mindestens einer Woche. Es erfolgte die regelmäßige Begutachtung und Pflege der Tiere durch die Versuchsverantwortlichen und Tierpfleger/-innen. Drei Tage präoperativ erhielten die Ratten Tramalösung oral zur Gewöhnung der Tiere an den Geschmack der Flüssigkeit sowie gewünschten postoperativen Schmerzreduktion. Unmittelbar vor dem geplanten operativen Eingriff wurden die Scaffolds an der Sterilbank vorbereitet (siehe 3.2.1) und gekühlt in sicheren Behältern zu den

Operationsräumlichkeiten transportiert. Zur Narkoseapplikation wurden die Versuchstiere mittels Isofluran per inhalationem zunächst beruhigt, sodass die Darreichung der Narkose (siehe Tabelle 13) subcutan gewichtsadaptiert appliziert werden konnte. Der Narkoseeintritt wurde innerhalb des Käfigs abgewartet und die Narkosetiefe durch Prüfung des Cornealreflexes bestimmt. Zur Befeuchtung der Augen erfolgte die Applikation von Corneregel® (Bausch & Lomb, Berlin, Deutschland). Vor Beginn der Operation erfolgte die erste Gewichtskontrolle sowie Rasur beider Oberschenkel der Versuchstiere.

Anästhesie	Volumen Wirkstoff [c]
Narkose	0,38 ml Fentanyl [0,05 mg/dl] 3 ml Midazolam [5 mg/dl] 1,41 ml Medetomidin [1 mg/ml]
Antagonist	5 ml Flumazenil [0,1 mg/ml] 0,5 ml Atipamezol [5 mg/ml]

Tabelle 13: Präoperatives Vorgehen und Anästhesie, Anästhesie Wirkstoffe [eigene Quelle]

Narkose sowie Antagonist setzen sich aus oben genannten Wirkstoffen zusammen. In der Regel wurden gewichtsadaptiert präoperativ 0,5 ml der Narkoselösung sowie unmittelbar postoperativ 0,9 ml Antagonisierung subcutan verabreicht. Zur Applikation der ersten Injektion wurden, um einer Schmerz- und Stressreaktion entgegenzuwirken, die Versuchstiere unter Inhalation von Isofluran betäubt.

3.2.2.1 Operationstechnisches Vorgehen

Pilotstudie

Ratte in Seitenlage auf Wärmeplatte. Reflextestung zur Prüfung der Narkosetiefe. Desinfektion mit Braunoderm. Längs gestellter Hautschnitt lateral am Oberschenkel. Scharfe Faziendurchtrennung. Stumpfes Spreizen der Fasern des Musculus vastus lateralis mit der Präparierschere. Einlage des mit Wirkstoff getränkten Kollagenscaffolds in den so geschafften Pouch kniegelenksnah. Faziennaht.

Hautnaht in Einzelknopftechnik. Gleiches Vorgehen auf Gegenseite. Die Operation aller vier Versuchstiere gestaltete sich insgesamt komplikationslos.

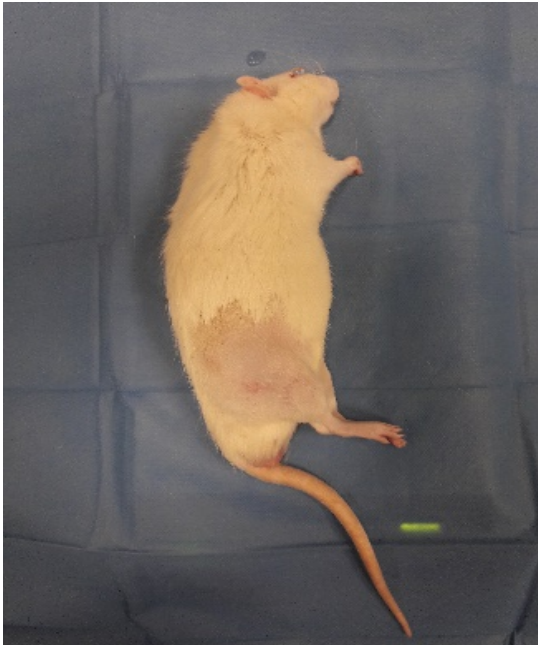
Erste Versuchsreihe

Die Operation der ersten Versuchsreihe gestaltete sich äquivalent zu der in der Pilotstudie gewählten Operationstechnik. Auch hier gestaltete sich der operative Ablauf aller 35 Ratten insgesamt komplikationslos.

Zweite Versuchsreihe

Um zu prüfen, ob die Lokalisation der Kollagenschwämme einen Einfluss auf die Ossifikation besitzt, wurden im Rahmen der zweiten Versuchsreihe unten genannte Loki gewählt.

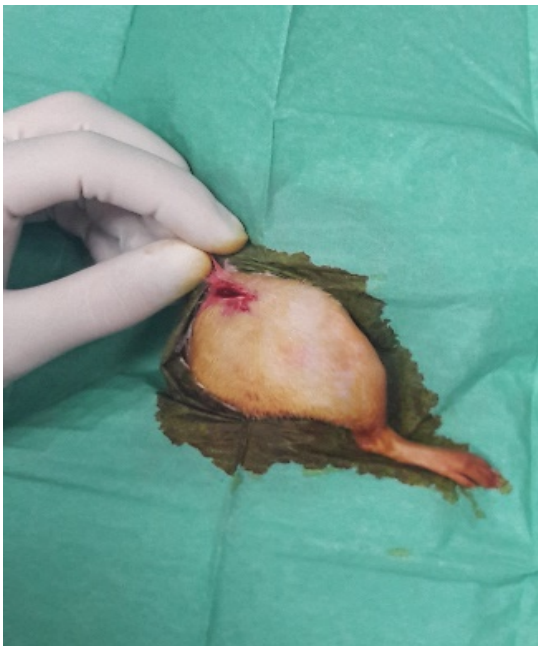
Ratte in Seitenlage auf Wärmeplatte (*Abbildung 13a*). Reflextestung zur Prüfung der Narkosetiefe. Desinfektion mit Braunoderm (*Abbildung 13b*). Längs gestellter Hautschnitt lateral am Oberschenkel (*Abbildung 13c*). Scharfe Faziendurchtrennung. Stumpfes Spreizen der Fasern des Musculus vastus lateralis mit der Präparierschere. Einlage des mit Wirkstoff getränkten Kollagenscaffolds in den so geschaffenen Pouch hüftgelenksnah (*Abbildung 13d*). Zudem Einlage eines Scaffolds in Pouchtechnik in die Unterschenkelmuskulatur beidseits. Faziennaht. Hautnaht in Einzelknopftechnik. Gleiches Vorgehen auf Gegenseite. Die Operation der Versuchstiere gestaltete sich insgesamt komplikationslos.



13a: Ratte in Seitenlage auf Wärmeplatte



13b: Desinfektion



13c: Hautschnitt lateral am Oberschenkel



13d: Einlage Kollagenscaffolds in den Muskelpouch

Abbildung 13: Operationstechnisches Vorgehen

3.2.2.2 Postoperatives Vorgehen

Es erfolgte direkt nach dem operativen Eingriff die gewichtsadaptierte Darreichung des Antagonisten subcutan. Das Versuchstier wurde innerhalb des Tierkäfigs unter Aufsicht adäquat gelagert (Luftwege und Extremitäten frei, weiche Umgebung). Nach Abwarten des Bewusstseins wurde die Begutachtung des Gesundheitszustands durchgeführt. Zur postoperativen Analgesie erfolgte die Fortführung der Tramal Lösung oral für weiterhin eine Woche. Es wurden in regelmäßigen Abständen (zwei

bis drei Tage) Wundkontrollen durchgeführt. Bei einem Versuchstier zeigte sich eine einseitige Nahtinsuffizienz, die in Narkose wie üblich unter sterilen Bedingungen erfolgreich versorgt wurde. Die Ratten wurden weiterhin regelmäßig durch die Versuchsverantwortlichen und die Tierpflege begutachtet und versorgt. Es erfolgten zu Versuchszwecken einmal wöchentlich Gewichtskontrollen aller Tiere sowie versuchsabhängig gewählte Röntgenkontrollen bis zur fachgerechten Absetzung. Die Versuchstiere zeigten im Verlauf eine stetige Zunahme des Körpergewichts bei gutem Allgemeinzustand.

3.2.3 Diagnostik

3.2.3.1 Konventionelles Röntgen

Um eine adäquate Diagnostik der Versuchstiere sicherzustellen, wurden diese mittels Isofluraninhalation sowie 0,5 ml Narkosemittel s. c. unter Ausschluss von Fentanyl ruhiggestellt. Es erfolgte die Applikation von *Cornerege*[®]. Die Röntgenuntersuchung erfolgte auf einer Styroporplatte zunächst in Rückenlage (RL). Aufgrund der Überlagerung von Weichteilverhältnissen sowie der Darminhalte erfolgte die Umstellung zur besseren Darstellung potenziell ossärer Strukturen in Bauchlage (BL). Die Fixierung der unteren Extremität wurde anhand zweier am distalen Unterschenkel in der Styroporplatte verankerten Kanülen ermöglicht. Um das Versuchstier zu schonen, wurde auf eine Durchbohrung der Weichteile in diesem Procedere verzichtet. Die Aufnahmen wurden in einer Ebene durchgeführt und bei inadäquater Darstellung bei Bedarf sofort wiederholt. Nach der Röntgenuntersuchung erfolgte anschließend die fachgerechte Lagerung der Tiere im Käfig sowie das Abwarten des Erwachens aus der Narkose mit Begutachtung des Gesundheitszustands.



Abbildung 14: Konventionelle Röntgendiagnostik (links Positivkontrolle in Bauchlage Tag 21, rechts in Rückenlage Tag 56 ohne Hinweis für HO)

Behandlungsarm	Anzahl Versuchstiere	Röntgenkontrollen (D = Anzahl der Tage)
Pilotstudie	4	D0, D21, D28, D35, D42/43, D49 sowie D56
Erste Versuchsreihe	35	D7, D14, D21, D28, D35 sowie D42
Zweite Versuchsreihe	12	D14 sowie D19

Tabelle 14: Diagnostik, Konventionelles Röntgen, Schema der Verlaufskontrollen [eigene Quelle]

Im Anschluss der konventionellen Röntgenaufnahmen erfolgte zur quantitativen Auswertung die Bestimmung der Ossifikationsgrößen. Nach Kalibrierung der Röntgenbilder wurde die Größe der einzelnen HO mittels Image J 1.50i; Java 1.6.0_24 (*National Institutes of Health, Bethesda, USA*) bestimmt.

3.2.3.2 Euthanasie und Probengewinnung

Die Absetzung erfolgte mittels Isofluraninhalation. Die Proben wurden nach Abwarten und Feststellung des sicheren Todes sowie einer letzten Röntgenkontrolle entnommen. Es handelte sich hierbei überwiegend um Muskelgewebe. Eine Verletzung des Femurs wurde weitestgehend vermieden, um knöcherne Verunreinigungen zu verhindern. Anschließend Fixierung und fachgerechte Lagerung der einzelnen Proben in Formaldehydlösung (*Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland*) beziehungsweise RNAlater (*Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts*) zur weiteren histologischen sowie histochemischen Untersuchung.

3.2.3.3 Mikrocomputertomographie

Zur weiteren Evaluation der konventionell radiologisch zu vermutenden HO der einzelnen Gruppen erfolgte die weitere Diagnostik einzelner Proben mittels μ CT 40 der Firma SCANCO (SCANCO Medical, Brüttisellen, Schweiz) mit den Einstellungen 70 kV, 114 μ Amp und 16 μ m Resolution. Im Rahmen der Euthanasie der Versuchstiere erfolgte zur Einschätzung der räumlichen Gegebenheiten die Markierung der Probe mittels Einzelknopfnaht am proximalen Anteil des Musculus vastus lateralis nach vorheriger Durchtrennung des genannten Muskels. Anhand der μ CT-Bildgebung war es möglich die Proben in einer 3D-Rekonstruktion darzustellen und Aussagen über Volumina der HO-Formationen zu treffen. Die Volumenberechnung wurde mit dem Programm OsiriX DICOM Viewer (*Pixmeo SARL, Bernex, Schweiz*) durchgeführt. Für den Bereich, der zu vermutenden ektopen Verknöcherungen, wurde ein Schwellenwert >700 HE (Hounsfield-Einheiten) definiert und über sämtlichen Schnitten der μ CT-graphischen Bildgebung angewendet. Hierdurch konnte die Volumenanalyse des dargestellten Hartgewebes erfolgen.

4 Ergebnisse

4.1 Pilotstudie

Die konventionelle Röntgenuntersuchung der Pilotstudie erfolgte an D0, D21, D28, D35, D42/43, D49 sowie D56 an insgesamt vier Ratten. An D43 erfolgte die Abschlussdiagnostik der Negativkontrolle, da das Versuchstier vorzeitig verstarb. Initial erfolgten die Kontrollen in Rückenlage, aufgrund einer besseren Darstellung der Weichteilverhältnisse wurde im Verlauf auf Bauchlage gewechselt. In allen vier Behandlungsarmen konnten keine ektopen Ossifikationen (Abbildung 15) nachgewiesen werden, weshalb auf eine μ CT-graphische Diagnostik verzichtet wurde.

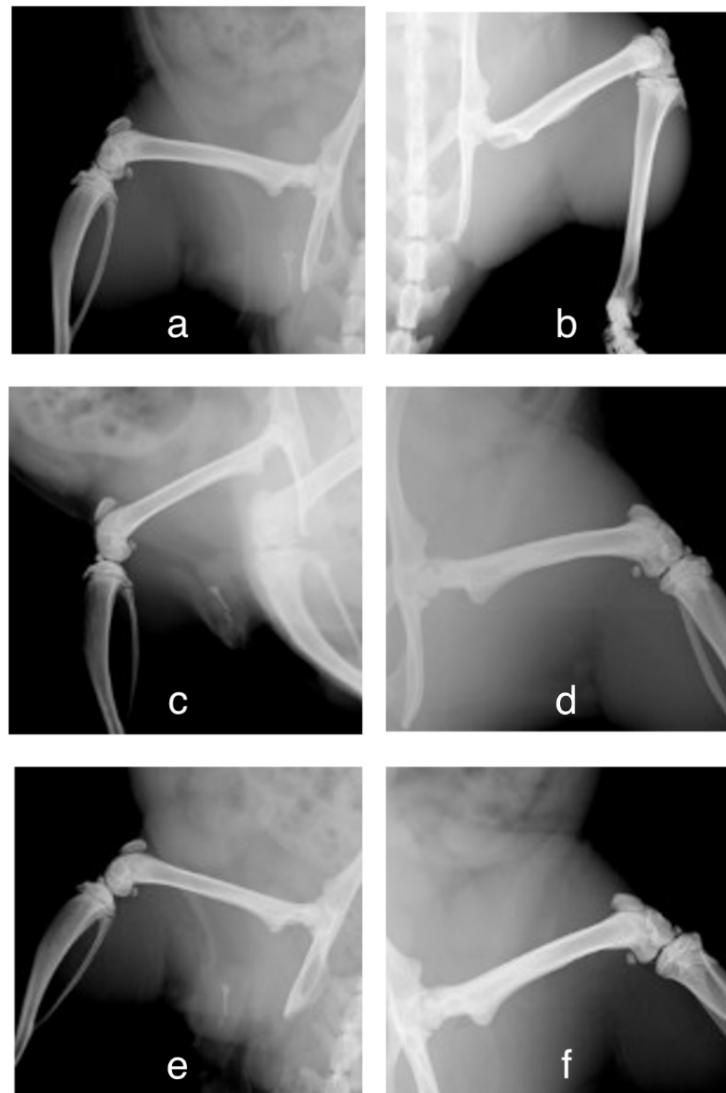


Abbildung 15: Röntgenaufnahmen der Pilotstudie (15a-b: re. Bein Negativkontrolle D21 (a) und D34 (b) ohne HO; 15c-d: re. Bein BSP niedrige Konzentration D21 (c) und D56 (d) ohne HO; 15e-f: re. Bein BSP höhere Konzentration D21 (e) und D56 (f) ohne HO); a,c,e in Rückenlage; b, d, f in Bauchlage

4.2 Erste Versuchsreihe

Die konventionelle Röntgenuntersuchung der ersten Versuchsreihe erfolgte an D7, D14, D21, D28, D35 sowie D42 an insgesamt 35 Ratten mit 70 Scaffolds in Bauchlage. Hinsichtlich der Positivkontrolle sowie der BSP-Reihe niedriger Konzentration konnten bereits nach der ersten Woche Zeichen einer HO-Bildung nachgewiesen werden (siehe Tabelle 15), welche im weiteren Verlauf der Kontrollen in ihrer Anzahl und Größe stetig zunahm und nach etwa zwei Wochen rückläufig bis nicht mehr nachzuweisen waren. Das BMP zeigte verglichen mit der BSPId (BSP low dose) einen langsameren Abbau der Ossifikationen sowie größere einzelne Formationsherde (siehe 4.2.2 und 4.2.4). Im Rahmen der Positivkontrolle konnten bei allen 20 Proben Ossifikationen im Zeitraum D14 bis D35 erreicht werden. Die BSPId stellte sich in der dritten Woche mit einer maximalen Anzahl von 11 Ossifikationen dar, insgesamt konnten bei 12 Scaffolds über den angegebenen Zeitraum ektopische Verknöcherungen gezeigt werden. Verglichen mit der BSPhd (BSP high dose) fand sich lediglich eine Ossifikation in einem Versuchstier an der gleichen Lokalisation in D14 sowie D21. In der Negativkontrolle konnten über den gesamten Zeitraum der Untersuchung genau zwei Ossifikationen innerhalb eines Individuums dargestellt werden. Die prozentualen Anteile der HO-Bildungen waren wie folgt verteilt: Negativkontrolle 20%, BSPId 60 %, BSPhd 5 %, Positivkontrolle 100 %.

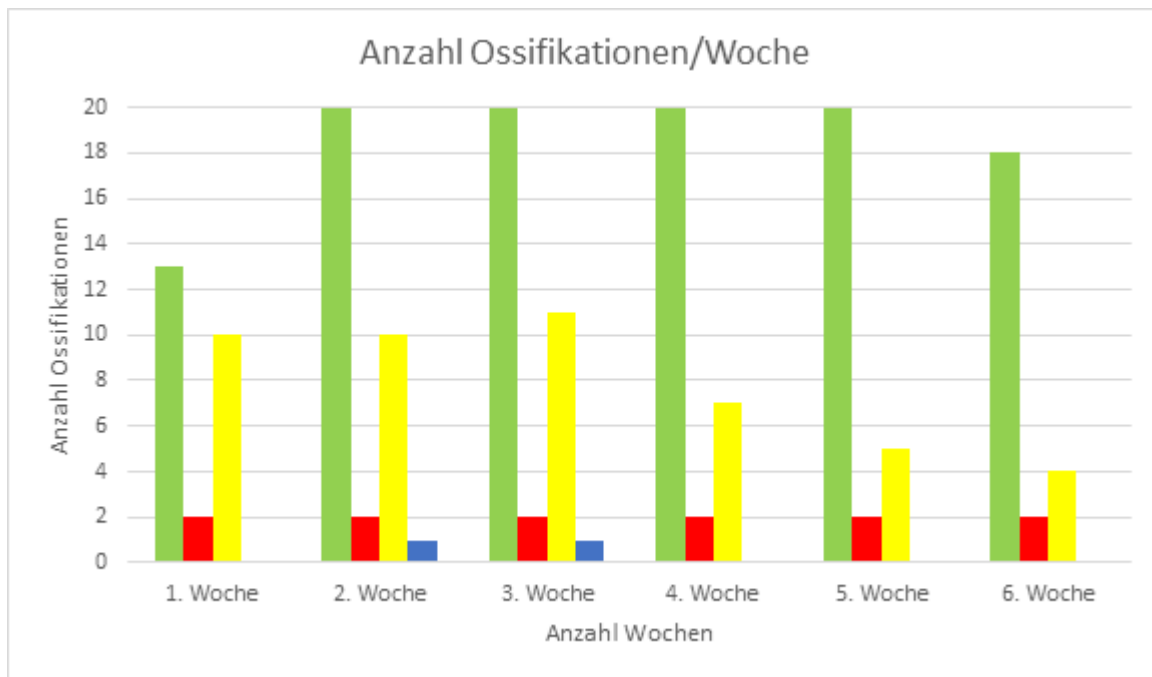


Tabelle 15: Anzahl der Ossifikationen der ersten Versuchsreihe (blau: BSPhd, gelb: BSPId, rot: Negativkontrolle, grün: Positivkontrolle) im Zeitraum von sechs Wochen

4.2.1 Beurteilung Negativkontrolle

Von insgesamt fünf operierten Versuchstieren und demnach 10 in 5 µl Aqua destillata getränkten implantierten Kollagenscaffolds ergab sich wie erwartet in acht untersuchten Proben entsprechend Abbildung 18 kein Hinweis für eine ektope Ossifikation. Lediglich in einer Ratte stellte sich eine fragliche ossäre Genese in der distalen Oberschenkelmuskulatur ventralseitig über den gesamten Untersuchungszeitraum konstant mit etwa 1,78 mm an beiden unteren Extremitäten dar. Die HO-Formation war zum Zeitpunkt der Euthanasie noch konventionell radiologisch nachweisbar und konnte µCT-graphisch verifiziert werden.

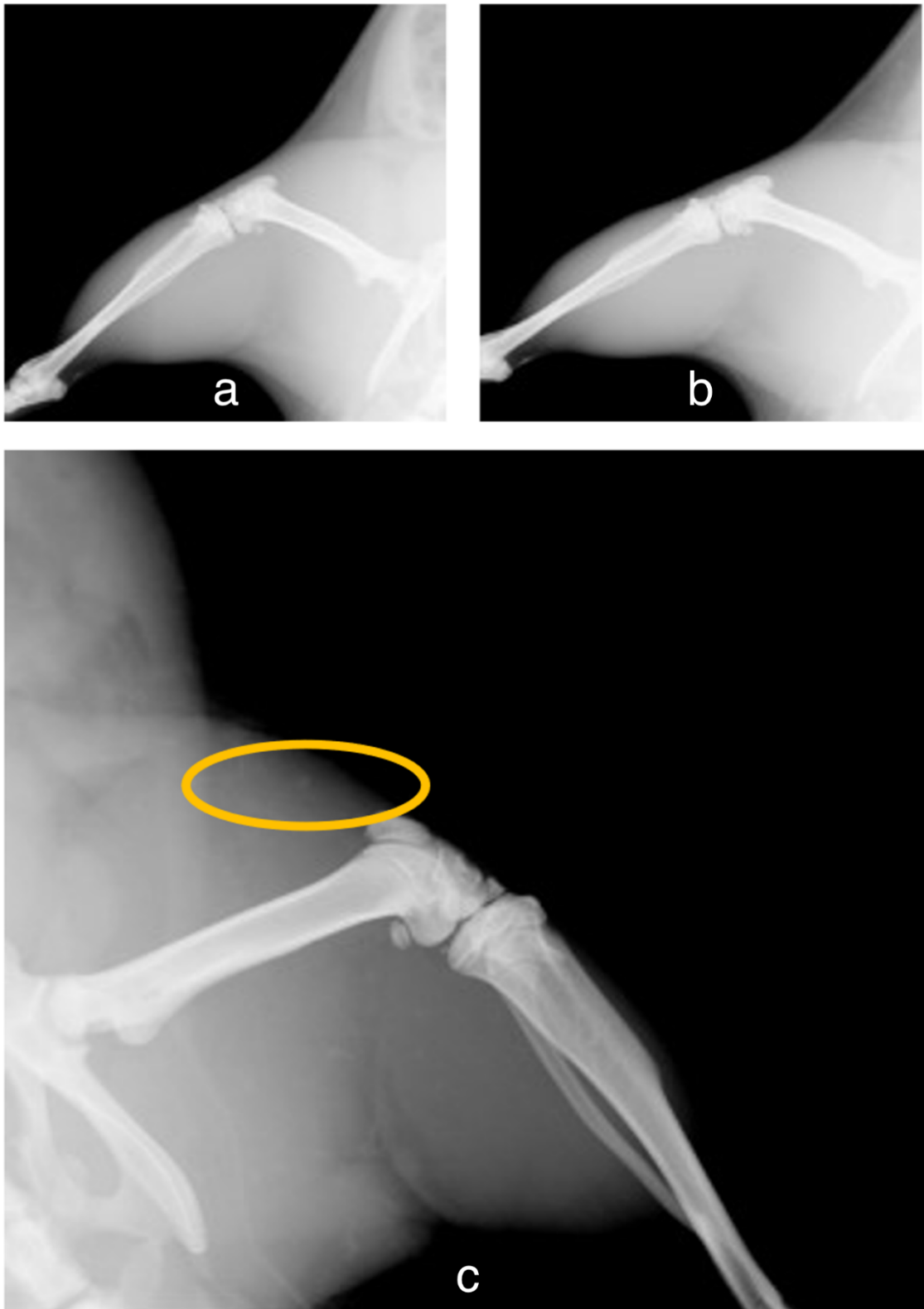


Abbildung 16: Röntgenaufnahmen der Negativkontrolle der ersten Versuchsreihe (16a-b: li. Bein (a) und re. Bein (b) an D6 ohne HO; 16c: re. Bein D34 mit HO-Nachweis)

4.2.2 Beurteilung BSP low dose

Es wurden insgesamt 20 BSPId-Proben beurteilt (n = 20). Bei sieben von zehn Versuchstieren (zum Vergleich Tabelle 16) zeigte sich im Zeitraum der ersten drei Wochen eine unscharf begrenzte heterotope Knochengenese, wie in Abbildung 17 zu erkennen ist. Diese trat teils einseitig, teils beidseitig auf. Die Ossifikationsrate belief sich auf insgesamt 60 %. Die mittlere Größe der einzelnen HO-Formationen (n = 10) war bereits im Zeitraum der zweiten Woche mit 1,11 mm +/- 0,97 mm erreicht. Bei Betrachtung des Zeitraums D21-D42 fällt auf, dass sich die einzelnen noch vorhandenen Ossifikationen in ihrer Größe konstant hielten und teils an D42 zum Zeitpunkt der Absetzung noch in den Röntgenkontrollen nachzuweisen waren. Für die untersuchten Proben konnte mittels Mikrocomputertomographie das Vorhandensein der ektopen Verknöcherung im Verlauf bestätigt werden. Für untersuchte Proben ohne eindeutigen HO-Nachweis (-) wurde zur Ermittlung der Mittelwerte sowie Standardabweichungen in den folgenden Tabellen der Zahlenwert 0 verwendet.

Nummer	Extremität	D7	D14	D21	D28	D35	D42
BSPId-1.1	links	-	-	-	-	-	-
BSPId-1.1	rechts	-	-	-	-	-	-
BSPId-1.2	links	-	-	-	-	-	-
BSPId-1.2	rechts	-	-	-	-	-	-
BSPId-1.3	links	1,07	1,07	1,07	-	-	-
BSPId-1.3	rechts	1,42	1,42	-	-	-	-
BSPId-1.4	links	-	-	-	-	-	-
BSPId-1.4	rechts	1,42	2,13	1,42	-	-	-
BSPId-1.5	links	1,067	2,49	1,42	1,42	1,42	1,42
BSPId-1.5	rechts	-	-	1,78	-	-	-
BSPId-1.6	links	1,42	1,42	0,71	0,71	0,71	-
BSPId-1.6	rechts	1,78	1,42	1,42	1,07	1,07	1,07
BSPId-1.7	links	-	-	-	-	-	-
BSPId-1.7	rechts	1,78	1,78	0,71	0,36	-	-
BSPId-1.8	links	2,84	2,49	1,78	1,78	1,78	1,42
BSPId-1.8	rechts	-	-	2,13	-	-	-
BSPId-1.9	links	-	-	-	-	-	-
BSPId-1.9	rechts	2,49	2,49	2,13	2,13	2,13	2,13
BSPId-1.10	links	-	-	-	-	-	-
BSPId-1.10	rechts	2,13	1,07	1,07	1,07	-	-
Mittelwert		1,09	1,11	0,98	0,71	0,59	0,5
Standardabweichung		0,96	0,97	0,79	0,67	0,66	0,63

Tabelle 16: HO-Formationen in [mm] BSPId Tag 7 bis 42



Abbildung 17: Röntgenaufnahmen unterschiedlicher BSPId Individuen der ersten Versuchsreihe mit HO-Nachweis im markierten Areal (17a: BSPId-1.5 re. Bein D14; 17b: BSPId-1.9 re. Bein D7 (b) und D36 (c) im Verlauf)

4.2.3 Beurteilung BSP high dose

Es wurden insgesamt 20 Proben der BSPhd-Reihe beurteilt (n = 20). Bei Betrachtung der Ergebnisse der BSP high dose zeigte sich eine potenzielle Ossifikation (n=1) für einen Zeitraum von einer Woche. Die zu vermutende Verknöcherung trat innerhalb des Peaks von zwei Wochen mit einer Größe von 1,78mm auf und nahm im Verlauf von einer Woche entsprechend der Ossifikationen anderer Behandlungsarme ab, bis sie in D28 nicht mehr sicher nachzuweisen war. In allen anderen Röntgenkontrollen der BSP high dose zeigten sich keine auffälligen röntgendichten Strukturen, welche auf eine mögliche osteoinduktive Funktion des BSP hinweisen könnten. Bei 1/20 der möglichen HO-Formationen belief sich der prozentuale Anteil demnach auf 5 %. Die Verknöcherung war zum Zeitpunkt der Absetzung der Versuchstiere seit drei Wochen nicht mehr nachzuweisen, weshalb auf die weitere μ CT-graphische Diagnostik verzichtet wurde.

Nummer	Extremität	D7	D14	D21	D28	D35	D42
BSPhd-1.1	links	-	-	-	-	-	-
BSPhd-1.1	rechts	-	-	-	-	-	-
BSPhd-1.2	links	-	-	-	-	-	-
BSPhd-1.2	rechts	-	-	-	-	-	-
BSPhd-1.3	links	-	-	-	-	-	-
BSPhd-1.3	rechts	-	-	-	-	-	-
BSPhd-1.4	links	-	-	-	-	-	-
BSPhd-1.4	rechts	-	-	-	-	-	-
BSPhd-1.5	links	-	-	-	-	-	-
BSPhd-1.5	rechts	-	-	-	-	-	-
BSPhd-1.6	links	-	-	-	-	-	-
BSPhd-1.6	rechts	-	-	-	-	-	-
BSPhd-1.7	links	-	-	-	-	-	-
BSPhd-1.7	rechts	-	-	-	-	-	-
BSPhd-1.8	links	-	-	-	-	-	-
BSPhd-1.8	rechts	-	-	-	-	-	-
BSPhd-1.9	links	-	-	-	-	-	-
BSPhd-1.9	rechts	-	-	-	-	-	-
BSPhd-1.10	links	-	1,78	1,42	-	-	-
BSPhd-1.10	rechts	-	-	-	-	-	-
Mittelwert		-	0,09	0,07	-	-	-
Standardabweichung		-	0,38	0,3	-	-	-

Tabelle 17: HO-Formationen in [mm] BSPhd Tag 7 bis 42



Abbildung 18: Röntgenaufnahme der BSPhd der ersten Versuchsreihe mit HO-Nachweis im markierten Areal (BSPhd-1.10 li. Bein D14)

4.2.4 Beurteilung Positivkontrolle

Es wurden insgesamt 20 Scaffolds (n = 20) implantiert und an 10 Versuchstieren untersucht. Bei Begutachtung der Ergebnisse der Positivkontrolle zeigten sich im Bereich sämtlicher implantierter Kollagenschwämme Ossifikationen schon teils ab den Tagen 7 bis 42 mit einer mittleren Größe von 4,73 mm +/- 1,57 mm nach zwei Wochen. Die größten HO-Formationen konnten demnach verglichen mit den BSP-Reihen ebenso an Tag 14 gemessen werden. Die HO-Rate belief sich zum Zeitpunkt dieser Messung auf 100 % (n = 20) und konnte die Funktionalität des Studiendesigns somit nachweisen. In einigen Aufnahmen zeigte sich eine ähnliche Größenkonstanz wie bereits bei der Gruppe der BSP low dose nach Peak beschrieben. Einige Individuen zeigten bereits ab D21 vergleichbare Größenverhältnisse. Andere zeigten insbesondere ab D28 größenkonstante Gegebenheiten. Lediglich in 2/20 Fällen war eine ektope Verknöcherung zum Zeitpunkt der Euthanasie in D42 im Röntgen nicht mehr nachweisbar. Am letzten Untersuchungstag konnte für die verbliebenen HO eine mittlere Größe von 2,93 mm +/- 1,65 mm ermittelt werden.

Nummer	Extremität	D7	D14	D21	D28	D35	D42
PK-1.1	links	-	2,13	1,42	1,07	1,07	0,71
PK-1.1	rechts	-	2,13	1,78	1,42	1,067	-
PK-1.2	links	-	1,78	1,78	1,42	1,07	0,71
PK-1.2	rechts	-	2,49	2,13	1,42	1,42	1,07
PK-1.3	links	1,42	4,62	2,84	2,13	1,42	-
PK-1.3	rechts	2,49	4,98	3,56	3,56	3,56	3,56
PK-1.4	links	1,42	5,33	3,91	3,91	3,91	3,91
PK-1.4	rechts	2,49	5,69	4,98	4,98	4,62	4,27
PK-1.5	links	1,07	5,33	4,98	4,98	4,98	4,98
PK-1.5	rechts	1,42	5,33	3,56	3,2	3,2	3,2
PK-1.6	links	0,71	4,98	4,98	4,98	4,98	4,98
PK-1.6	rechts	1,07	3,56	3,2	2,49	2,13	1,78
PK-1.7	links	2,84	5,33	5,33	5,33	5,33	5,33
PK-1.7	rechts	1,42	4,62	4,62	4,27	4,27	4,27
PK-1.8	links	-	5,33	4,98	3,91	3,91	3,91
PK-1.8	rechts	1,78	5,33	3,2	2,49	2,49	2,49
PK-1.9	links	1,78	7,11	5,33	3,91	3,56	3,2
PK-1.9	rechts	-	7,11	4,98	3,56	2,49	2,49
PK-1.10	links	-	7,11	5,33	4,98	4,27	4,27
PK-1.10	rechts	1,78	4,27	3,56	3,56	3,56	3,56
Mittelwert		3,36	4,73	3,82	3,38	3,17	2,93
Standardabweichung		0,93	1,57	1,29	1,34	1,39	1,65

Tabelle 18: HO-Formationen in [mm] Positivkontrolle Tag 7 bis 42

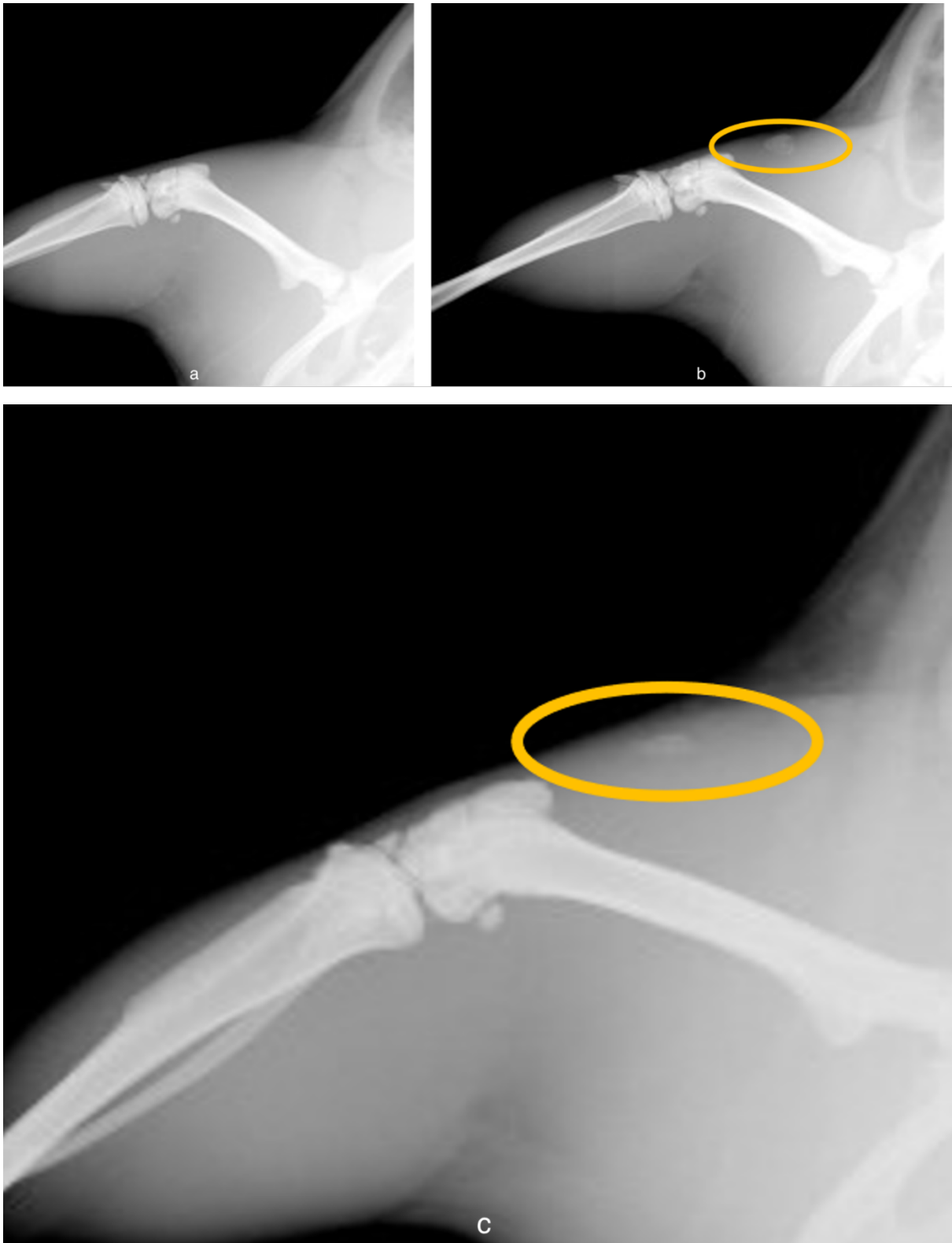


Abbildung 19: Röntgenaufnahmen der Positivkontrolle der ersten Versuchsreihe (PK1.5 li. Bein D7 (a) zunächst ohne HO; im Verlauf D14 (b) und D40 (c) mit HO-Nachweis im markierten Areal)

Nach Bestimmung des Durchmessers des ektopen Knochengewebes sowie Errechnen des wöchentlichen Durchschnitts ergab sich eine maximale Durchschnittsgröße, die sich in allen Behandlungsarmen mit Ausnahme der Negativkontrolle im Zuge der zweiten Woche festlegen ließ. Die miteinander vergleichbaren maximalen Größen der Positivkontrolle sowie der BSP-Reihe konnten aufzeigen, dass sich das BSP hinsichtlich des Zeitraums seiner osteoinduktiven Eigenschaft ähnlich wie das BMP verhält, auch die gebildeten Ossifikationen der BSPId wiesen im Zuge ihres Durchmessers teils größenkonstante Verhältnisse auf. Diese Tatsache zeigte sich jedoch bei den HO-Formationen der Positivkontrolle stärker ausgeprägt. Auf eine Darstellung der Negativkontrolle in der folgenden Tabelle wurde verzichtet, da sich die Ossifikation zu allen Zeitpunkten in ihrer Größe konstant zeigte und demnach linear darstellen würde. Ein Peak ergab sich für die Negativkontrolle zu keinem Zeitpunkt innerhalb der ersten Versuchsreihe.

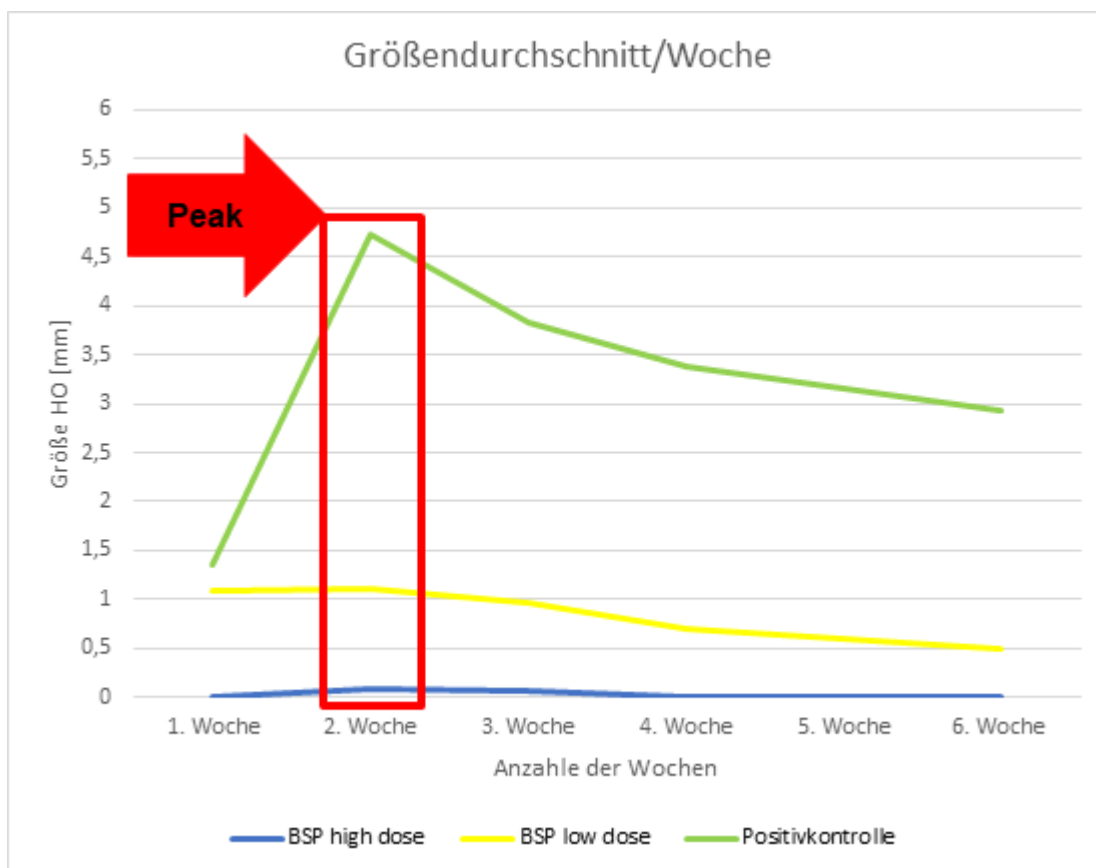


Diagramm 19: Wöchentliche Durchschnittsgröße der Ossifikationen (blau: BSPhd, gelb: BSPId, grün: PK) in [mm] mit Bestimmung der maximalen Größe nach zwei Wochen

4.2.5 Mikro-CT

Die weitere Diagnostik erfolgte mittels μ CT-graphischer Bildgebung (70 kV, 114 μ Amp und 16 μ m Resolution). Zur Untersuchung des mittels Absetzung gewonnenen Probenmaterials wurden zunächst einzelne Exemplare ausgewählt, um eine mögliche HO in der konventionell radiologischen Bildgebung verifizieren zu können. Es erfolgte die Untersuchung von insgesamt 12 Proben (siehe Abbildung 20 und 22) der ersten Versuchsreihe (jeweils vier Proben pro Gruppe). Hierbei wurden bevorzugt unterschiedliche Gewebeproben der BSPId sowie Positivkontrollen mit zum Zeitpunkt der Euthanasie konventionell radiologisch nachgewiesener HO zur weiteren Diagnostik ausgewählt und mit einer Auswahl an Ergebnissen der Negativkontrollen verglichen. Das Ziel bestand darin die ektopen Verknöcherungen der einzelnen Versuchsproben μ ct-graphisch zu sichern und Unterschiede hinsichtlich ihrer Volumina aufzuzeigen. Die Ergebnisse korrelierten mit den Messungen der konventionellen radiologischen Bilder der ektopen Verknöcherungen. Auf Untersuchungen der BSP high dose wurde im Rahmen der ersten Versuchsreihe verzichtet, da sich zum Zeitpunkt der Absetzung der Versuchstiere im konventionellen Röntgen keinerlei Anzeichen einer HO-Formation mehr darstellen ließ. Anhand der μ CT-Bildgebung war es möglich, die Proben in einer 3D-Rekonstruktion darzustellen. Für alle untersuchten HO der unterschiedlichen Gruppen ergab sich ein mittleres Volumen von $0,55 \text{ mm}^3 \pm 0,8 \text{ mm}^3$.

In Abbildung 20 a/b sind Gewebeteile der Negativkontrolle dargestellt. Bei den Proben handelte es sich um einen Muskelanteil des Musculus vastus lateralis der rechten sowie linken Extremität ein- und desselben Versuchstiers. Konventionell radiologisch sowie mittels μ CT konnte für beide Proben keine ektope Ossifikation nachgewiesen werden.

Bei Vergleich der Proben der Positivkontrolle (Abb. 20 c-f) fanden sich korrelierend zu den Voraufnahmen ektopen Verknöcherungen, die sich als weiße, unregelmäßige Formationen darstellten. Abbildung 21 zeigt das errechnete Volumen der zu Abbildung 20 zugehörigen Proben. Bei genauerer Betrachtung der untersuchten Positivkontrollen aus Abbildung 20 zeigt sich eine unregelmäßig bis ovale Struktur mit einem mittleren Volumen von $1,4 \text{ mm}^3 \pm 0,91 \text{ mm}^3$. Das Volumen der Positivkontrolle war verglichen mit der BSP-low-dose-Gruppe mit $0,19 \text{ mm}^3 \pm 0,05 \text{ mm}^3$ ($p = 0,06$) und der Negativkontrolle mit $0,06 \text{ mm}^3 \pm 0,1 \text{ mm}^3$ ($p = 0,04$) deutlich größer.

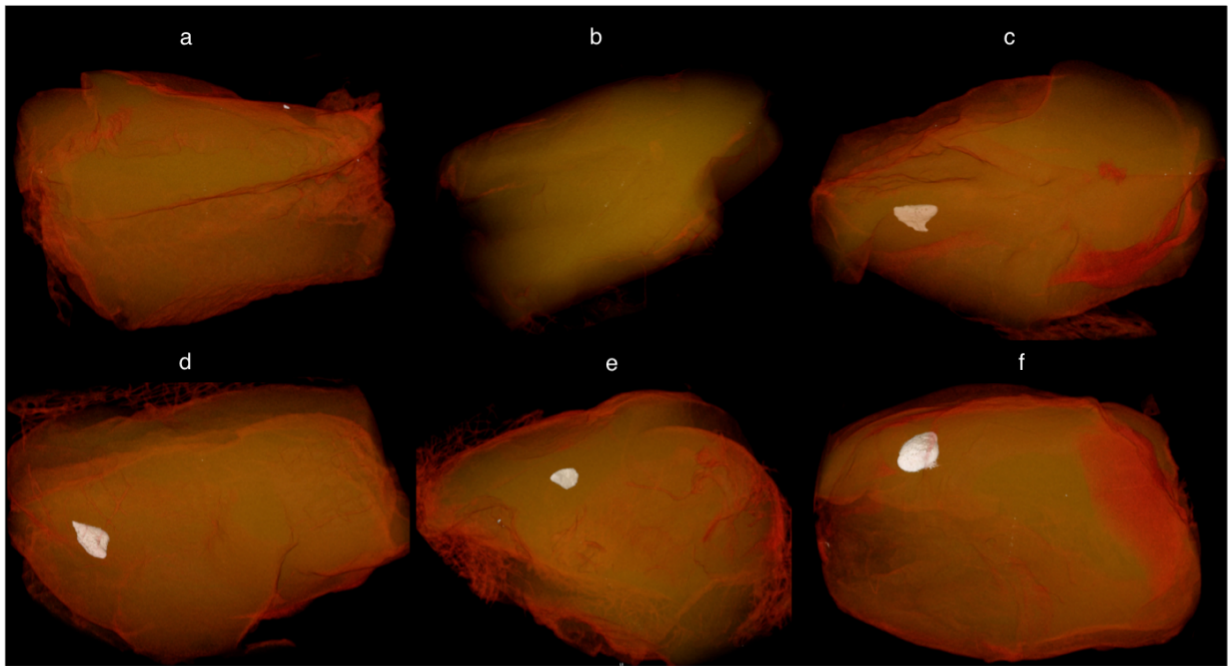


Abbildung 20: μ CT-graphische 3D-Rekonstruktion Kontrollgruppen (Negativkontrolle: NK-1.5 re. Bein (a), NK-1.5 li. Bein (b) ohne HO; Positivkontrolle: PK-1.4 li. Bein (c), PK-1.5 re. Bein (d), PK-1.6 re. Bein (e), PK-1.8 li. Bein (f) mit HO-Nachweis)

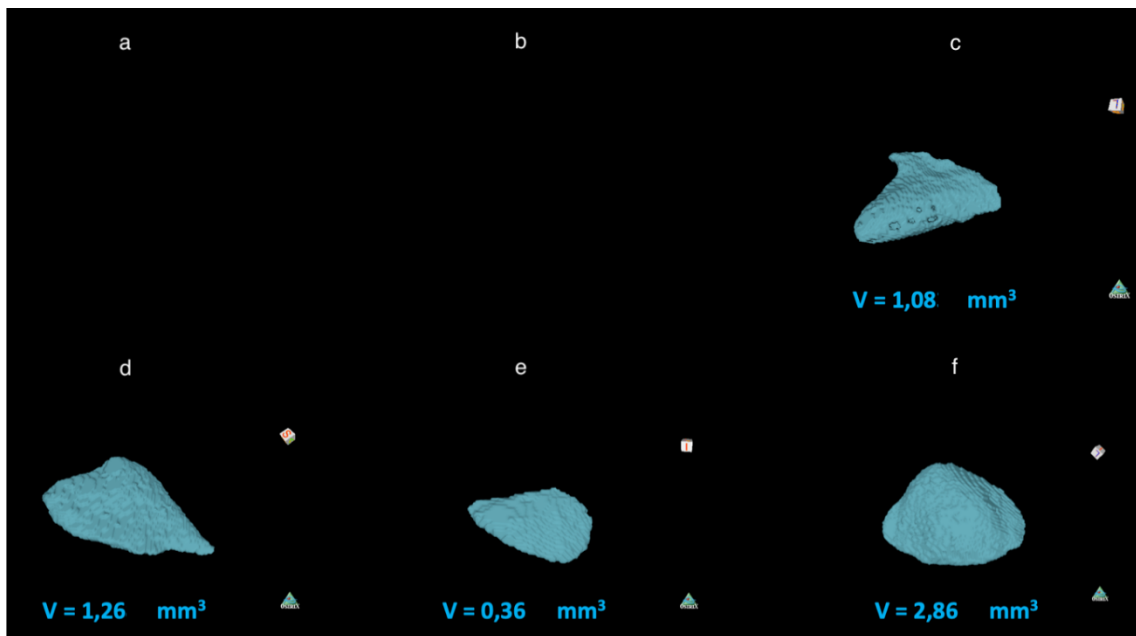


Abbildung 21: Volumen der einzelnen HO-Formationen aus Abbildung 20 (Negativkontrolle: NK-1.5 re. Bein (a), NK-1.5 li. Bein (b) kein Volumen bei fehlender HO; Positivkontrolle: PK-1.4 li. Bein (c), PK-1.5 re. Bein (d), PK-1.6 re. Bein (e), PK-1.8 li. Bein (f) in mm^3)

In Abbildung 22 werden weitere Proben der BSP-low-dose-Gruppe sowie Negativkontrollen dargestellt, um HO-Formationen der konventionell radiologischen Voraufnahmen zu verifizieren. Diese konnten für die Gruppe der BSP low dose bestätigt werden. Für das Untersuchungsmaterial der Negativkontrolle ergab sich der Nachweis einer ektopten Verknöcherung für nur ein Probenmaterial. Beide Ergebnisse korrelieren mit den zuvor angefertigten Röntgenbildern. Diese Tatsache könnte die Möglichkeit der Entstehung einer ektopten Ossifikation durch das Knochengerüst selbst vermuten lassen. Zur weiteren Quantifizierung erfolgte die Berechnung des Volumens des untersuchten Probenmaterials (Abbildung 23).

Das Knochenmaterial der Gruppe für BSPId sowie die Negativkontrolle zeigten ähnliche mittlere Volumina. Im Vergleich zu den Positivkontrollen der Abbildung 21 waren diese insgesamt kleiner. Qualitativ wirken die in Abbildung 23 dargestellten Formationen rauer hinsichtlich ihrer Oberfläche und unregelmäßiger in ihrer Form.

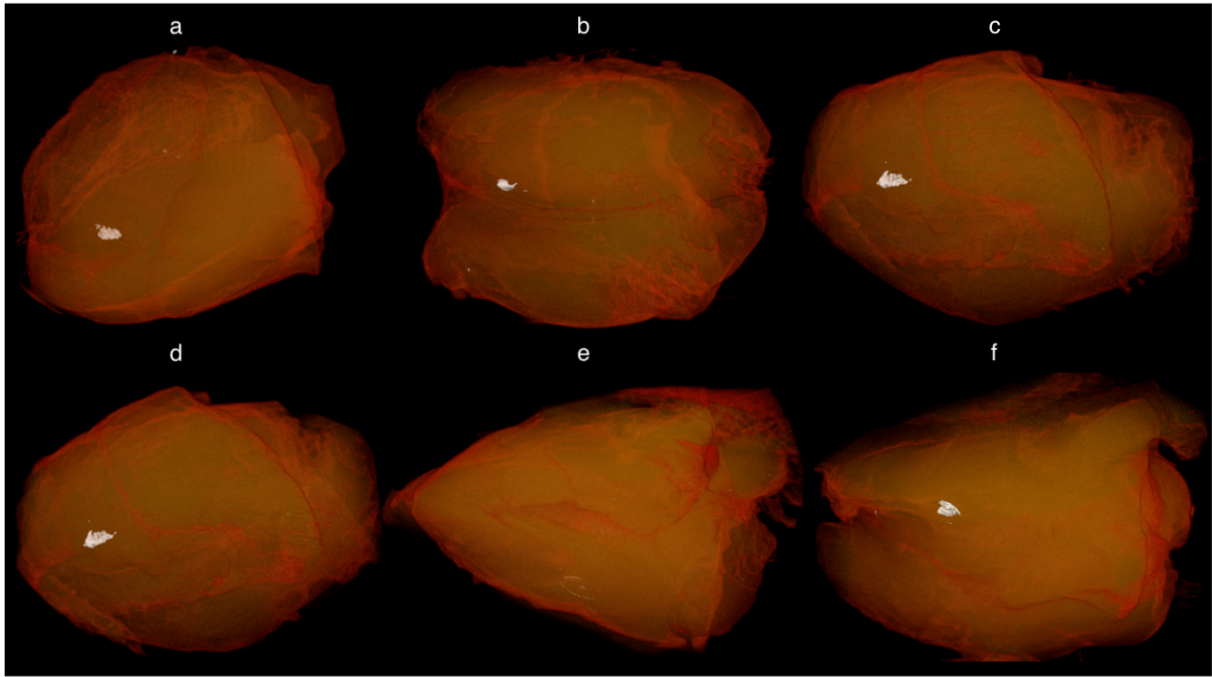


Abbildung 22: μ CT-graphische 3D-Rekonstruktion BSPId sowie Negativkontrolle (BSPId: BSPId-1.5 li. Bein (a), BSPId-1.6 re. Bein (b), BSPId-1.8 li. Bein (c), BSPId-1.9 re. Bein (d) mit HO, Negativkontrolle: NK-1.1 re. Bein (e) ohne HO, NK-1.4 re. Bein (f) mit HO-Nachweis)

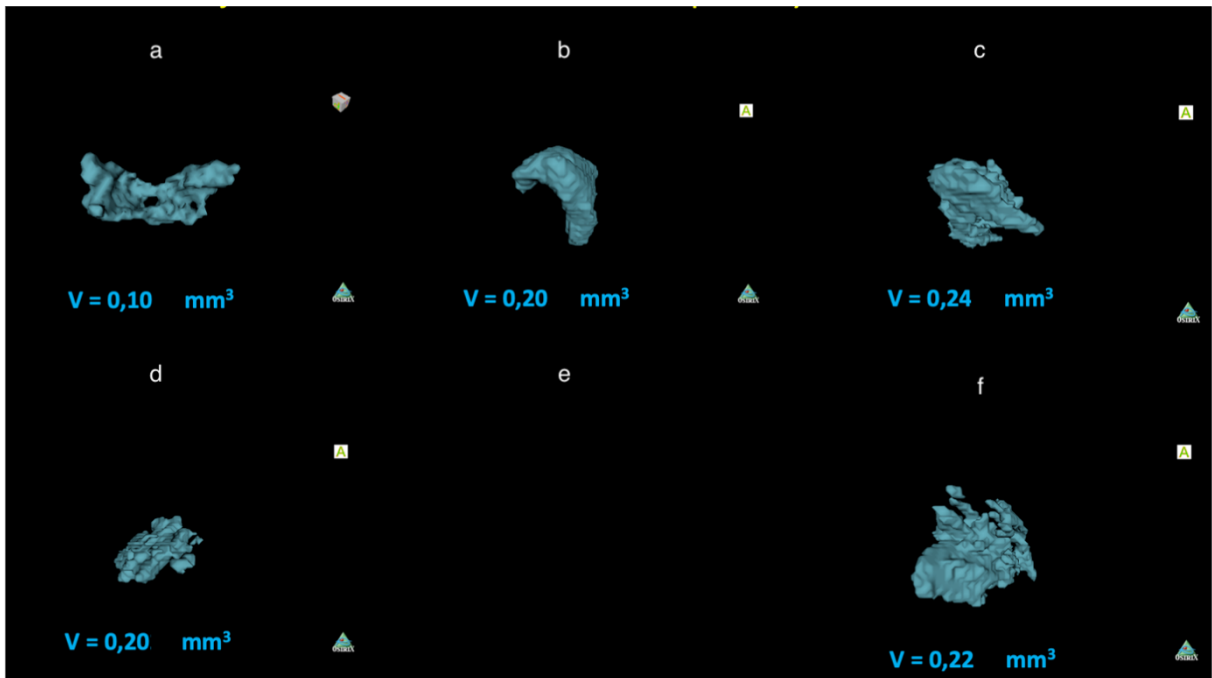


Abbildung 23: Volumen der einzelnen HO-Formationen aus Abbildung 22 (BSPId: BSPId-1.5 li. Bein (a), BSPId-1.6 re. Bein (b), BSPId-1.8 li. Bein (c), BSPId-1.9 re. Bein (d) in in mm³); Negativkontrolle: NK-1.1 re. Bein (e) kein Volumen bei fehlender HO, NK-1.4 re. Bein (f) in in mm³)

4.3 Zweite Versuchsreihe

Zur Prüfung einer relevanten Lokalisationsabhängigkeit der Kollagenschwämme im Gewebe wurden im Rahmen der zweiten Versuchsreihe die Scaffolds in die Oberschenkelmuskulatur (*Musculus vastus lateralis*) proximal sowie im Bereich der Unterschenkelmuskulatur (*Musculus gastrocnemius*) beider unterer Extremitäten implantiert. Hieraus ergaben sich vier Implantate je Versuchstier an insgesamt 12 Exemplaren. Es wurden je zwei Ratten zur Negativ- sowie Positivkontrolle operiert sowie je vier Ratten zur Untersuchung der beiden BSP-Gruppen. Nach Errechnung des Ossifikationspeaks von zwei Wochen nach vorangegangener Studienreihe erfolgten die Röntgenkontrollen an D7 und D14 mit anschließender Absetzung der Versuchstiere. Für die Behandlungsarme der kompletten BSP-Reihe ergaben sich keine Hinweise für Ossifikationen in der konventionell radiologischen sowie μ CT-graphischen Auswertung, weshalb auf die tabellarische Darstellung sowie weitere Analysen der einzelnen Gruppen verzichtet wurde. In der Positivkontrolle ergaben sich insgesamt 8 von 8 möglichen Ossifikationen. Bei der Negativkontrolle fanden sich zwei von 8. Demnach beliefen sich die prozentualen Anteile auf 100 und 25 %. Wie in Tabelle 20 dargestellt, zeigt sich eine maximale Ossifikationsrate der Positivkontrolle innerhalb der ersten zwei Wochen entsprechend dem Peak der ersten Versuchsreihe.

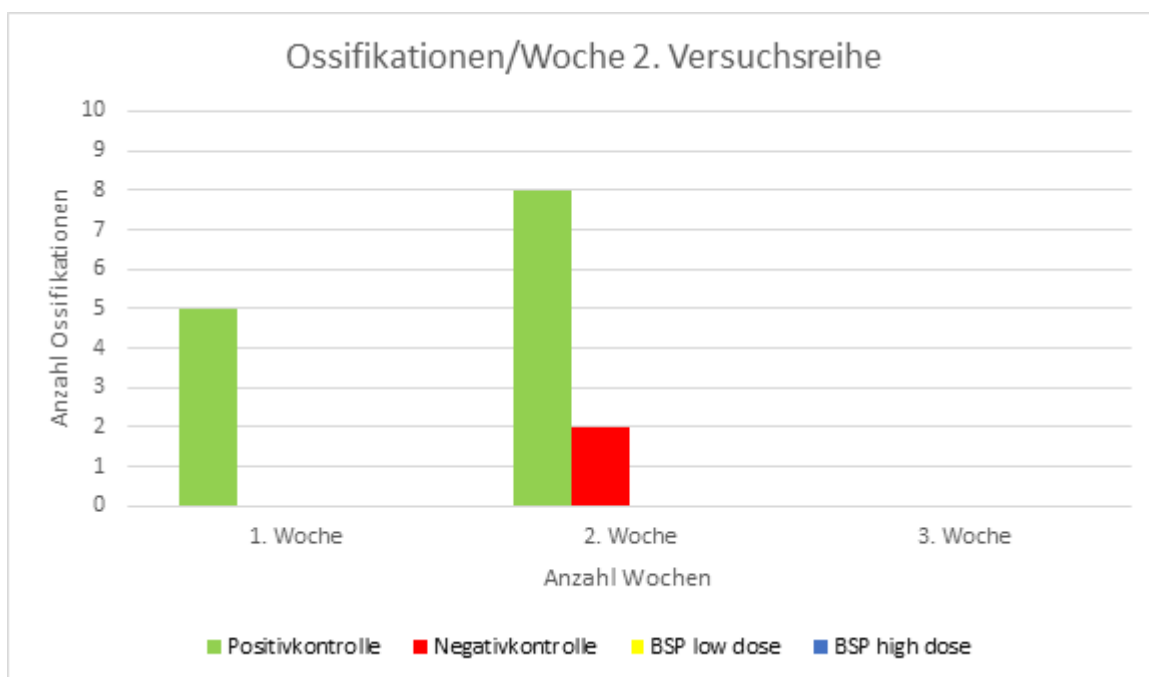


Diagramm 20: Anzahl der Ossifikationen der zweiten Versuchsreihe (blau: BSPhd, gelb: BSP Id, rot: NK, grün: PK) im Zeitraum von drei Wochen

4.4 Statistische Auswertung und Signifikanz

Nachfolgend werden zum besseren Verständnis zunächst die Gemeinsamkeiten und Unterschiede beider Versuchsreihen nochmalig aufgezeigt. Beide Untersuchungsabschnitte bestanden aus insgesamt vier Gruppen. Hierbei dienten das BMP (Positivkontrolle) sowie reines Aqua destillata (Negativkontrolle) als Kontrollgruppen. Für das BMP konnten durch andere Arbeitsgruppen bereits *in vitro* sowie *in vivo* osteoinduktive Einflüsse nachgewiesen werden [231-233]. Forschungsgegenstand der vorliegenden Arbeit war das BSP, welches einerseits in geringer und andererseits in höherer Konzentration untersucht werden sollte. Alle genannten Substrate wurden im Rahmen von Arbeiten an der Sterilbank in den Räumlichkeiten des Unfallchirurgischen Labors der Universitätsmedizin Mainz auf Atelokollagen-Scaffolds appliziert, in transportsicheren Behältern zu den jeweiligen OP-Räumlichkeiten verbracht und mittels Muskel-Pouch-Technik als gängige Methode des Tissue Engineerings an unterschiedlichen Lokalisationen der Versuchstiere implantiert. Hierbei gestaltete sich das prä-, peri- sowie postoperative Vorgehen in allen Behandlungsarmen beider Versuchsreihen annähernd vergleichbar. Die Versuchstiere hatten am OP-Tag ein Körpergewicht von 350-400g. Postoperativ erfolgten Röntgenkontrollen (konventionell radiologisch, CT-graphisch) mit anschließend qualitativer sowie quantitativer Datenanalyse.

Im Rahmen der ersten Versuchsreihe wurden insgesamt 35 Ratten mit je zwei implantierten Scaffolds untersucht. Die Aufteilung der Versuchstiere in Bezug auf die unterschiedlichen Behandlungsarme gestaltete sich wie folgt: 10 BSP low dose, 10 BSP high dose, 10 Positivkontrollen und 5 Negativkontrollen. Demnach wurden insgesamt 70 substratgetränkte Kollagenschwämmchen verwendet. Die Implantation der Knochengerüste erfolgte in den Musculus vastus lateralis distal an beiden unteren Extremitäten der Versuchstiere. Bei der zweiten Versuchsreihe wurden insgesamt 12 Versuchstiere mit je vier Scaffolds untersucht. Es ergaben sich je zwei Ratten für die Negativ- und Positivkontrollen sowie je vier für beide BSP-Behandlungsarme. Die Trägersubstanzen wurden in den Musculus vastus lateralis proximal sowie die Unterschenkelmuskulatur der unteren Extremitäten beidseits implantiert. Bei beiden Studienreihen ergaben sich osteoinduktive Ergebnisse in den Positivkontrollen, sodass von einer allgemeinen Funktionalität des Experiments ausgegangen werden

kann. In nachfolgender Tabelle werden die Ergebnisse der unterschiedlichen Gruppen beider Versuchsreihen aufgeführt.

	BSPId	BSPhd	Positiv- kontrolle	Negativ- kontrolle
1. Versuchsreihe				
Anzahl Scaffolds	20	20	20	10
Anzahl Ossifikationen	12	1	20	2
Prozentualer Anteil (%)	60	5	100	20
Mittelwert der HO- Durchmesser (mm)	0,60	0,03	3,19	0,36
Standardabweichung (mm)	0,70	0,12	1,24	0,75
2. Versuchsreihe				
Anzahl Scaffolds	16	16	8	8
Anzahl Ossifikationen	0	0	8	2
Prozentualer Anteil (%)	0	0	100	25
Mittelwert der HO- Durchmesser (mm)	0	0	3,11	0,27
Standardabweichung (mm)	0	0	0,68	0,46

Tabelle 21: Vergleich beider Versuchsreihen (Anzahl der implantierten Scaffolds, Anzahl der HO, Mittelwert der HO-Durchmesser im konventionellen Röntgen +/- Standardabweichung in mm)

Nach deskriptiver Analyse zur Erhebung der Rohdaten erfolgte eine Signifikanztestung mittels zweiseitigen T-Test. Für die statistische Analyse wurden die Programme SPSS Statistics der Firma IBM sowie Excel mit Data Analytics Erweiterung der Firma Microsoft verwendet. Die Analyse erfolgte als Signifikanzniveau und wurde mit einem p-Wert kleiner 0,05 festgesetzt. Es erfolgte neben der quantitativen Auswertung eine qualitative Analyse, wobei für den Nachweis einer Ossifikation ein arbiträrer Wert von 1 festgesetzt wurde. Bei fehlender HO im konventionellen Röntgen wurde diese für die quantitative Auswertung mit einem Zahlenwert von 0 angegeben.

Im Rahmen der ersten Versuchsreihe zeigten sich bei 60 % der implantierten Scaffolds im Behandlungsarm der BSPId Zeichen einer Verknöcherung mit einer mittleren Größe von 0,60 mm +/- 0,70 mm. In der qualitativen Analyse zeigte sich im Größenvergleich

ein signifikanter Unterschied zwischen BSPId und der Negativkontrolle ($p = 0,04$). Die HO der BSPId-Gruppe war im Durchschnitt um 0,24 mm größer. In der qualitativen Auswertung konnte das Signifikanzniveau nicht über den gesamten Beobachtungszeitraum erreicht werden, jedoch zeigte sich auch hier die HO-Größe betreffend einen signifikanten Unterschied zwischen BSPId und Negativkontrolle bis Tag 21 ($p = 0,01$). Neben der Negativkontrolle mit einem Mittelwert von 0,36 mm +/- 0,75 mm war auch die BSPhd-Gruppe mit 0,03 mm +/- 0,12 mm im Vergleich zur BSPId-Gruppe kleiner ($p = 0,04$ respektive $p < 0,05$). In der Positivkontrolle (BMP) zeigten sich durchschnittliche Größen von 3,19 mm +/- 1,24 mm. Der Durchmesser der HO reichte von 1,78 mm bis 7,11 mm. Verglichen mit den anderen Behandlungsarmen des Experiments waren diese HO wesentlich größer (BSPId $p < 0,05$; BSPhd $p < 0,05$; Negativkontrolle $p < 0,05$). Alle HO der unterschiedlichen Untersuchungsgruppen zeigten an Tag 14 konventionell-radiologisch ihr maximales Größenwachstum. Nach dieser Spitze resultierte bei manchen der Verknöcherungen eine sukzessive Abnahme, bis sie röntgenologisch nicht mehr nachweisbar waren. Einige der ossären Herde zeigten jedoch über einen bestimmten Zeitraum größenkonstantes Verhalten, welches bis hin zur Euthanasie der Versuchstiere anhielt (siehe Tabelle 16 bis 18). Im folgenden Diagramm ist die durchschnittliche Größenverteilung aller HO der ersten Versuchsreihe postoperativ dargestellt.

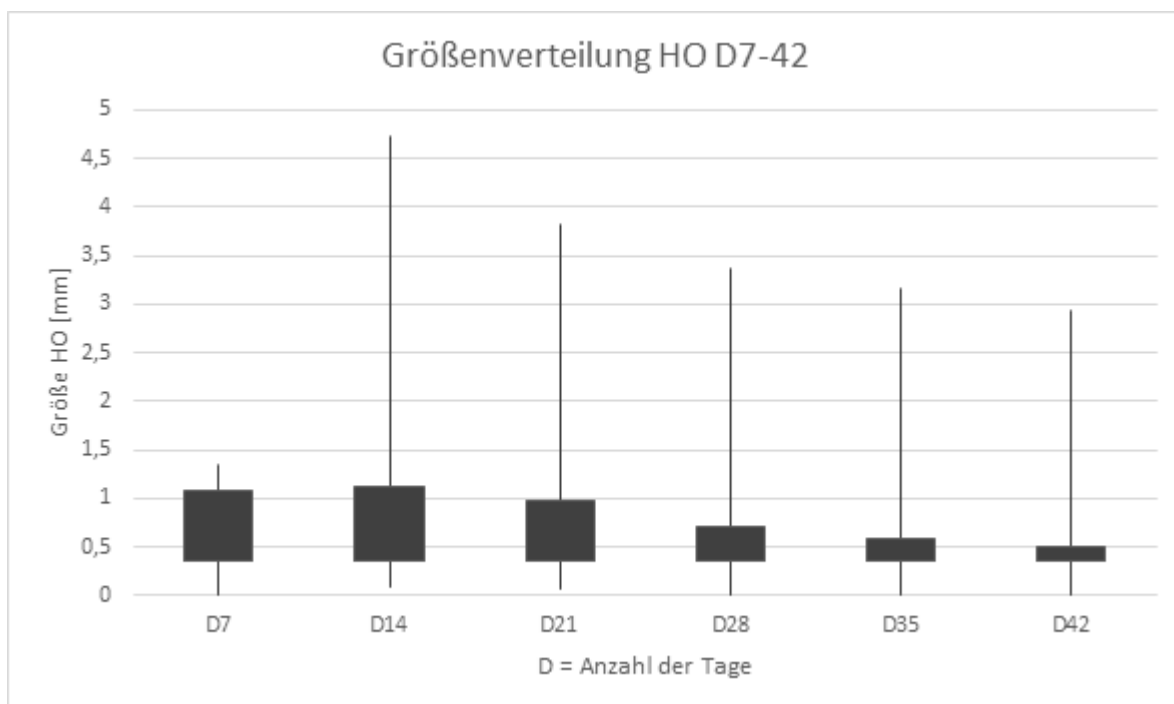


Diagramm 22: Durchschnittliche Größenverteilung der ersten Versuchsreihe Tag 7 - 42

Im Zuge der zweiten Versuchsreihe waren in beiden BSP-Gruppen keine Hinweise für Ossifikationen in den Röntgenkontrollen zu finden, womit sich der prozentuale Anteil auf 0 % beläuft und demnach eine osteoinduktive Wirkung durch das BSP für die zweite Versuchsreihe eindeutig nicht nachgewiesen werden konnte. Die mittleren Größen der Positiv- (3,11 mm +/- 0,68 mm) sowie Negativkontrolle (0,27 mm +/- 0,46 mm) waren mit den Ergebnissen der ersten Versuchsreihe vergleichbar (siehe Tabelle 21). Beim Vergleich beider Versuchsreihen hinsichtlich der Anzahl der HO konnte für das BSPId ein signifikanter Unterschied in Bezug auf die Lokalisation der implantierten Scaffolds nachgewiesen werden ($p < 0,05$). Die Implantation am distalen Oberschenkel ermöglichte die Entstehung von HO. Für das Einsetzen der Knochengerüste am proximalen Oberschenkel zeigten sich für die BSP niedriger Konzentration, als auch höherer Konzentration keine Hinweise für ektopische Ossifikationen.

CT-graphisch konnten die am Tage der Absetzung noch vorhandenen HO-Formationen gesichert werden und 3D-Rekonstruktionen sowie Volumenanalysen einzelner Proben erfolgen. Es erfolgten Untersuchungen von jeweils 4 Proben der beiden Kontrollgruppen sowie der BSPId-Gruppe der ersten Versuchsreihe. Die mittleren Volumina der BSPId mit $0,19 \text{ mm}^3 \pm 0,05 \text{ mm}^3$ ($p = 0,06$) sowie Negativkontrolle mit $0,06 \text{ mm}^3 \pm 0,1 \text{ mm}^3$ ($p = 0,04$) waren verglichen mit den Positivkontrollen mit $1,4 \text{ mm}^3 \pm 0,91 \text{ mm}^3$ (Abbildung 22 und 23) insgesamt kleiner.

Die Interpretation der vorliegenden Ergebnisse erfolgt im nächsten Kapitel (siehe 5.2.1 Interpretation der statistischen Auswertung).

5 Diskussion

Besonders nach Infektionen bzw. als Posttraumata stellen kritische Knochendefekte hinsichtlich der jeweiligen Therapiemethoden für die Medizin eine große Herausforderung dar und führen oftmals zu einem komplexen sowie langwierigen Behandlungsverlauf. Weiterhin weisen Knochenbrüche bei gerade älteren Menschen ein höheres Risiko an verzögerten Heilungsprozessen sowie Komplikationen auf. Daraus resultierend ergibt sich durch den demographischen Wandel ein zusätzliches sozioökonomisches Problem in herannahender Zukunft. Aktuell gilt der autologe Knochenersatz als Goldstandard, um kritische Knochendefekte zu therapieren. Diese Behandlungsmethode ist begrenzt durch die Menge an verfügbarem Knochenmaterial und mögliche Komplikationen an den Entnahmestellen des Materials. Es zeigt sich im Rahmen der Forschung ein deutliches Streben nach alternativen Methoden, welches sich aktuell weitestgehend in Richtung der Biomaterialien sowie des Tissue Engineerings bewegt. Der 3D-Druck stellt hierfür besonders für die Herstellung von Trägermaterialien einen besonderen Meilenstein dar. Gerüste aus medizinischem Tricalciumphosphat konnten sich bereits in präklinischen Tierversuchen unter Beweis stellen und weisen eine Biokompatibilität sowie osteokonduktive Wirkung auf [216;217].

Als Vertreter der Biokeramiken stellen sie die mechanische Stabilität sicher, bis das neu gebildete Knochengewebe wieder selbstständig seine stützende Funktion übernehmen kann. Insbesondere die Stabilität spielt im Rahmen der Frakturversorgung eine besondere Rolle, da die Therapie auf eine frühzeitige Wiederherstellung der Funktion sowie Re-Mobilisierung der Patienten abzielt. Etwaige Verzögerungen im Rahmen des Heilungsverlaufs steigern das Auftreten potenzieller Komplikationen. Führende Biomaterialien sollten demnach besondere Eigenschaften aufweisen. Dazu gehören eine osteoinduktive, osteokonduktive sowie osteogene Wirkung neben einer möglichst hohen Biokompatibilität/-aktivität. Auf diesem Wege kann eine möglichst natürliche Interaktion im Zuge der Geweberegeneration ermöglicht werden, sodass die Zellaktivität unter nahezu physiologischen Bedingungen unterstützt wird (siehe 2.3.2.1). Weiterhin kann durch Zugabe von Wachstumsfaktoren die Interaktion, der am Remodeling beteiligten Komponenten gesteigert werden. Vor allem Vertreter der BMPs (BMP-2/BMP-7) zeigten

insbesondere gute osteoinduktive Eigenschaften hinsichtlich der Knochenbildung/-regeneration. An dieser Stelle setzt die Forschung des BSP an. Bereits in zahlreichen Studien konnte eine regulierende Wirkung des Proteins auf die Bildung des Knochengewebes nachgewiesen werden. Es soll vor allem bei der Angiogenese und demnach zu Beginn der Knochensynthese eine Rolle spielen. Die Frage, ob das BSP allein als einer der Vertreter der SIBLING-Familie auch selbstständig eine Ossifikation mithilfe eines Biogerüsts außerhalb von Knochengewebe induzieren könnte, ist weitestgehend ungeklärt. Diese Studie beschäftigt sich mit der Wirkung von BSP-getränkten Kollagen-Scaffolds auf die Ossifikation in ektooper Lage im Tierversuch. Die Kontrollgruppen setzen sich aus einer Negativkontrolle (Aqua destillata) sowie Positivkontrolle (BMP) zusammen. Das BSP als Untersuchungsgegenstand wurde im Rahmen zweier Versuchsreihen in einer niedrigen sowie hohen Konzentration unterteilt und im Zuge eines operativen Eingriffs an unterschiedlichen Lokalisationen im Muskel-Pouch-Modell bei 51 Ratten über ein Kollagengerüst implantiert. In regelmäßigen Abständen erfolgten die konventionell radiologische Diagnostik sowie Quantifizierung der Ergebnisse.

5.1 Diskussion der Studiengestaltung

5.1.1 Kontrollgruppen

Innerhalb der vier verwendeten Versuchsgruppen erfolgte die Einteilung der Kontrollgruppen zunächst in eine Positiv- sowie Negativkontrolle. Die Kollagen-Scaffolds der Negativkontrolle wurden mit Aqua destillata getränkt, sodass in diesem Falle kein relevanter Einfluss der verwendeten Substanz auf das Ossifikationspotenzial angenommen werden konnte. Dies konnte auch im Rahmen der konventionell-radiologischen Verlaufskontrollen nachgewiesen werden. Es zeigte sich in beiden Versuchsreihen jeweils ein Individuum mit teils beidseits gebildeter Ossifikationen. Im Rahmen der ersten Versuchsreihe fiel auf, dass die Versuchstiere der Negativkontrolle am selben Tag unmittelbar nach der Positivkontrolle operiert wurden, sodass von einer Kontamination der Instrumente ausgegangen wurde. Daraufhin erfolgte der operative Eingriff der Negativkontrolle im Zuge der zweiten Versuchsreihe vor mit Wachstumsfaktoren getränkten Scaffolds. Einer potenziellen Kontamination wurde insbesondere während der initialen Vorbereitungen im Labor

sowie innerhalb des operativen Verlaufs adäquat vorgebeugt. Es zeigte sich jedoch erneut innerhalb eines Versuchstiers der Negativkontrolle Ossifikationen im Bereich der implantierten Knochenersatzgerüste nach schon einer bis zwei Wochen. Teils konnte das vermutete Knochengewebe über den gesamten Zeitraum der Röntgenkontrollen dargestellt werden, was in der Positivkontrolle sowie den BSP-Gruppen nicht der Fall war. Die Knochenmatrix besteht nahezu zu 90 % aus kollagenen Proteinen [218]. Abhängig von den jeweiligen Stadien der Knochenbildung spielen unterschiedliche Kollagene (I, III, V, FACIT-Kollagene) eine maßgebliche Rolle im Zuge der Osteogenese [219]. Aufgrund dieser Tatsache wird von einer potenziell osteoinduktiven Wirkung der Kollagen-Scaffolds selbst ohne Zugabe von Wachstumsfaktoren ausgegangen. Eine 2021 veröffentlichte Studie zeigte beispielsweise eine positive Wirkung von 3D-gedruckten Kollagenmikrofasern auf die Lebensfähigkeit sowie Regeneration von PDL-Zellen, die bei der Bildung des Alveolarknochens sowie Wurzelzements eine maßgebliche Rolle spielen [220].

Eine weitere Kontrollgruppe der Studie stellt die Positivkontrolle dar. Diese soll zeigen, dass eine ektope Ossifikation durch Hinzugabe osteoinduktiver Wachstumsfaktoren innerhalb dieser Versuchsreihen überhaupt möglich ist. Hierfür eignen sich vor allem die Proteine der BMPs. Zahlreiche Studien konnten ihren osteoinduktiven Einfluss bereits belegen, sodass insbesondere das BMP-2 sowie -7 bereits für den klinischen Alltag zur Behandlung von Knochendefekten zugelassen sind. Weiterhin konnten bisher auch hinsichtlich ektope Ossifikationen insgesamt gute Ergebnisse durch BMP erzielt werden [6;7;179;213]. In beiden Versuchsreihen zeigten sich radiologisch durchgehend erfolgreiche ektope Ossifikationen durch Anwendung von rekombinantem BMP-2 sowie BMP-7. Die Ergebnisse der Positivkontrollen konnten aufgrund der guten Resultate als Vergleichsindex für die übrigen Behandlungsarme genutzt werden. Die beiden Kontrollgruppen zeigten deutliche Unterschiede. Während innerhalb der Negativkontrolle nahezu keine ektope Ossifikationen nachweisbar waren, fand sich bei den Versuchstieren der Positivkontrolle in allen Individuen radiologisch nachweislich ein- bis beidseitige heterotope Knochengewebsbildungen. Die gewählte Methodik der Studie ist demnach geeignet. Zwei weitere Untersuchungsgruppen ergaben sich aus dem zu untersuchenden BSP und werden im nachfolgenden Unterpunkt näher erläutert.

5.1.2 Bone Sialoprotein

Das Bone Sialoprotein (Rat BSP2) galt im Rahmen dieser Dissertation als Untersuchungsgegenstand und kam in zwei unterschiedlichen Behandlungsarmen zur Anwendung. Initial erfolgte eine Pilotstudie mit 5 µg sowie 0,5 µg BSP2 in Kombination mit NaCl. Es zeigte sich eine mangelnde Resorptionsfähigkeit der zu untersuchenden Flüssigkeiten durch die dafür vorgesehenen Scaffolds, sodass eine unbestimmte Restmenge des Substrats während der Sterilbankarbeiten in den Petrischalen verblieb. Diese Problematik fand sich gleichermaßen in den Kontrollgruppen. Die Röntgenkontrollen drei sowie acht Wochen postoperativ ergaben insgesamt keine Ergebnisse im Sinne von Ossifikationen, weswegen die Absetzung der Tiere erfolgte und die Vorbereitung der zu implantierenden Kollagenschwämme neu überdacht wurde. Im Zuge der darauffolgenden Versuchsreihen wurden die Kollagenschwämme in unterschiedlichen Mengen (BSP high dose: 5 µg, low dose: 1 µg) mit Aqua destillata benetzt. Während der Sterilbankarbeiten zeigte sich eine komplette Resorption des zu untersuchenden Substrats durch die gewählten Knochenersatzgerüste. Nach Operation der Versuchstiere konnten sich vor allem in der Reihe der BSP low dose zahlreiche Ossifikationen mit Peak nach etwa zwei Wochen zeigen. Bei ebenso erfolgreicher Positivkontrolle konnte von einem Erfolg der Methode ausgegangen werden. Die Diskussion der unterschiedlichen Ergebnisse wird in Kapitel 5.2 näher erläutert.

5.1.3 Trägersubstanz

Als Knochenersatzgerüst und demnach Trägersubstanz der Substrate kam es zum Einsatz von AteloCell (Hölzel Diagnostika Handels GmbH), die speziell aus boviner Dermis gewonnen werden. Mit einer Porengröße von 200 bis 400 µm sowie einer porösen Struktur stellen sie eine angemessene Grundlage zur Bildung von Knochengewebe dar. Es handelt sich um schwammförmige Typ-I-Atelokollagengerüste mit wabenartiger Struktur, welche eine vereinfachte Zellversorgung sowie Ausscheidung von Abfallprodukten ermöglicht. AteloCell konnte im Rahmen zahlreicher Studien hinsichtlich von Knochen- und Knorpelgewebe bisher erfolgreiche Ergebnisse erzielen [221-226]. Im Rahmen des experimentellen Teils zeigten sich jedoch nicht selten HO-Formationen in den Negativkontrollen. Der

überwiegende Anteil (etwa 90 %) der Knochenmatrix besteht aus Kollagenen, die maßgeblich an osteogenetischen Prozessen beteiligt sind. Das in den Versuchsreihen verwendete Knochengerüst besteht aus Kollagen Typ I. Eine Aktivierung osteoregulativer Mechanismen durch die Trägersubstanz selbst kann demnach angenommen werden. Es konnten bereits förderliche Einflüsse durch Kollagenmikrofasern auf PDL-Zellen nachgewiesen werden. Diese tragen zur Entstehung der alveolaren Knochensubstanz bei [220]. Eine aktuelle Studie von 2022 konnte weiterhin im Tierversuch an Mäusen einen Einfluss des BSP auf die Heilung von Alveolarknochen ebenso nachweisen [242]. Beide Proteine könnten demnach potenziell eine eigens osteoregulative Funktion aufweisen. Gegebenenfalls könnten weitere Untersuchungen der unterschiedlichen Knochengerüste zu Erkenntnissen führen, die die HO-Formationen der Negativkontrollen, die im Zuge dieses Experiments auftraten, zukünftig erklären könnten. Es sollte jedoch nicht außer Betracht gelassen werden, dass ein geeignetes Knochengerüst die Voraussetzung für die Bildung von Knochengewebe im Rahmen des Tissue Engineerings darstellt. Mizuno und Kollegen konnten weiterhin eine osteoregulative Funktion durch Kollagen Typ 1 nachweisen [230].

5.1.4 Tiermodell und Muskel-Pouch-Technik

Hinsichtlich des BSP konnten bisher zahlreiche in vitro Studien eine fraglich ossifizierende Wirkung des Proteins der SIBLING-Familie nachgewiesen werden. Für den Nachweis einer derartigen Funktion galt es im nächsten Schritt Untersuchungen im lebenden Organismus vorzunehmen. Für die ersten in vivo Studien kommen vor allem Nagetiere zum Einsatz. Bezüglich des BMP konnten hierfür zahlreiche wissenschaftliche Ergebnisse der knochenbildenden Wirkung gesammelt werden. Da diese Dissertation hauptsächlich auf die Frage eines möglichen Einflusses durch BSP auf die Ossifikation in vivo abzielte, erfolgte die Entscheidung zur Durchführung der Untersuchungen in Muskel-Pouch-Technik zur Beobachtung ektooper Ossifikationen an Ratten ohne Hinzufügen von zellulären Bestandteilen oder anderweitiger Wachstumsfaktoren auf die Knochenersatzgerüste. Ratten eignen sich aufgrund ihres schnellen Wachstums besonders gut zur Evaluierung von Knochenbildungsprozessen. Die Muskel-Pouch-Technik stellt ein insgesamt unkompliziertes und schonendes operatives Verfahren dar. Hierbei kommt es zur

Einbringung des Trägermaterials in eine manuell gebildete Muskeltasche mit nachfolgend voller Belastbarkeit der Versuchstiere [106-109]. Im Zuge dieser Dissertation erfolgte eine Aufteilung in zwei unterschiedliche Versuchsreihen. Hierbei wurden die Lokalisationen der implantierten Knochenersatzgerüste moduliert. Während aller Operationen befanden sich die Versuchstiere in adäquater Narkose unter Prüfung der Reflexe. Zur Vorbeugung eines Temperaturverlusts wurden die Nagetiere während des operativen Eingriffs auf einer Wärmeplatte gelagert. Im ersten Zug erfolgte das Einbringen des Substrats getränkter Scaffolds in die distale Oberschenkelmuskulatur streckseitig nahe der Patella an jeweils beiden unteren Extremitäten. Da in beiden Versuchsreihen eine 100%ige HO-Rate für die Positivkontrollen nachgewiesen werden konnte, ist von einer allgemeinen Funktionalität des Experiments auszugehen. Für die Gruppe der BSPId-Gruppe konnten in der ersten Versuchsreihe 10/20 HO radiologisch dargestellt werden.

Zur näheren Evaluierung einer lokalisationsabhängigen knochenbildenden Wirkung kam es im Rahmen der zweiten Versuchsreihe zur Implantation der Scaffolds in die proximale Oberschenkelmuskulatur hüftgelenksnah sowie die proximale Unterschenkelmuskulatur beugeseitig an beiden unteren Extremitäten. Hierbei konnten lediglich in den Positivkontrollen Ossifikationen nachgewiesen werden. Für beide Untersuchungsgruppen der BSP ergaben sich insgesamt keine ektopen Ossifikationen in den Röntgenkontrollen, selbst nach Ablauf des Peak-Zeitraums von 14 Tagen. Die fehlenden HO-Formationen der BSP-Reihe konnten CT-graphisch verifiziert werden, sodass von einer lokalisationsabhängigen Bildung der HO ausgegangen werden kann.

5.2 Diskussion der Ergebnisse

5.2.1 Interpretation der statistischen Auswertung

Zu Beginn erfolgen in diesem Abschnitt die Analyse und Interpretation der statistisch gesammelten Daten. Wie bereits beschrieben konnten mittels zweiseitiger T-Testung einzelne Versuchsgruppen miteinander verglichen und p-Werte bestimmt werden. Bei p-Werten $< 0,05$ können untersuchte Größen als signifikant erachtet werden. Bei bekannter osteoinduktiver Wirkung durch BMP wurde dieses als Positivkontrolle genutzt. Erneut bestätigte sich dieser Effekt, durch signifikante Ossifikationen in der BMP-Gruppe über den gesamten Versuchszeitraum hinweg im Vergleich zur Negativkontrolle. Ebenfalls unterschied sich die BSP low dose Gruppe signifikant von der Negativkontrolle über den gesamten Versuchszeitraum in der qualitativen Größenanalyse. In der quantitativen Auswertung konnte das Signifikanzniveau bis Tag 21 für BSPId erreicht werden. Dies kann durch den oben beschriebenen Rückgang der Ossifikationen ab Tag 14 erklärt werden. Zu jedem Zeitpunkt zeigte sich eine quantitativ wie qualitativ schwächere Ossifikation der BSPId im Vergleich zur Positivkontrolle. Niedrig dosiertes BSP zeigte eine osteoinduktive Wirkung, die jedoch schwächer war als die von BMP. Hoch dosiertes BSP unterschied sich statistisch nicht von der Negativkontrolle. Beim Vergleich der BSPId-Gruppe beider Versuchsreihen konnte ein signifikanter Unterschied zwischen diesen Gruppen nachgewiesen werden ($p < 0,05$). Bei Implantation der Scaffolds im Bereich der distalen Oberschenkelmuskulatur konnten HO erzielt werden. Derartige Ergebnisse konnten im proximalen Oberschenkel- sowie Unterschenkelbereich nicht erzielt werden. Es fanden sich keine ektopen Ossifikationen für diese Loci. Da sich die BSPId-Gruppen im Implantationsort der Scaffolds unterschieden, nehmen wir an, dass die Lokalisation für die Bildung von HO, insbesondere bei niedrig dosiertem BSP, eine wesentliche Rolle spielt. Aus dem BSPId-Behandlungsarm sowie den Kontrollgruppen der ersten Versuchsreihe wurden jeweils vier Proben entnommen und die Volumina der HO mittels μ CT bestimmt. Die Ergebnisse waren hier analog, mit großen Ossifikationen in der Positivkontrolle, kleineren Ossifikationen in der BSPId-Gruppe sowie kaum nachweisbaren HO in der Negativkontrolle. Der BSPId-Behandlungsarm erreichte hier keine statistische Signifikanz ($p = 0,06$), jedoch ist darauf hinzuweisen, dass auch der T-Test zwischen Positiv- und Negativkontrolle gerade einmal ein p von 0,04 ergab. Dies ist auf die sehr kleine Testgruppe von je vier untersuchten Proben

zurückzuführen. Es ist davon auszugehen, dass bei einer größeren Testreihe analoge statistische Ergebnisse zu den Analysen im konventionellen Röntgen zu erwarten sind.

5.2.2 Bone Sialoprotein unterschiedlicher Konzentrationen

Im Rahmen der ersten Versuchsreihe erfolgte die muskuläre Implantation der mit BSP getränkten Scaffolds im distalen Oberschenkelbereich patellanah. Da sich die Positivkontrollen (BMP) als erfolgreich herausstellten, kann zunächst davon ausgegangen werden, dass die Kalzifikationen in der Bildgebung der BSP-Reihe als Ossifikationen zu werten sind. Auffällig ist, dass sich insgesamt eine höhere Verknöcherungsrate in den BSP-Scaffolds niedrigerer Konzentration im Vergleich zur BSP high dose Reihe zeigte. So stellt sich die Frage, warum die Ossifikationen durch BSP in geringerer Konzentration stärker ausgeprägt waren.

Dies kann gegebenenfalls anhand der Funktion des BSP erklärt werden. BSP lässt sich vor allem in mineralisiertem Gewebe finden und wird von Osteoblasten freigesetzt. Es trägt zur Synthese von Hydroxylapatit bei. Diese Funktion konnte in BSP-Knockout-Mäusen aufgrund von Anomalien hinsichtlich der ossären Entwicklung sowie des Mineralisationsgrads nachgewiesen werden [4;227]. Eine im Jahre 2003 veröffentlichte Studie befasste sich mit der osteoblastären Bindungsfähigkeit von intaktem BSP, Fibronectin (Positivkontrolle) und einigen BSP-Resten im Rahmen eines in vitro Experiments. Hier zeigte sich vor allem bei einer bestimmten Peptidgruppe eine besonders hohe Bindungsaktivität der Osteoblasten und im Vergleich zu anderen BSP-Resten eine gesteigerte Adhäsionszahl, sodass davon ausgegangen werden kann, dass außerhalb des oben genannten Peptidbereichs keiner der Peptidreste eine relevante Osteoblasten-Bindung aufweist. Erst nach massiver Konzentrationserhöhung (200-fach) konnte auch in anderen BSP-Peptiden eine gewisse Aktivität erzielt werden. Eine intakte RGD-Sequenz erwies sich als ein besonderes Merkmal, um die Bindung von BSP-Resten an Osteoblasten zu ermöglichen [228]. Es wurde jedoch in mehreren Studien ein RGD-Sequenz-unabhängiges Adhäsionspotenzial des BSP detektiert, sodass von mindestens einer bisher unbekanntem Bindungsregion ausgegangen werden kann [135-139]. Die Funktion des BSP könnte demnach abhängig von der Anzahl der sich im umliegenden Gewebe befindlichen Osteoblasten und mesenchymalen Zellen sowie der bisher

unbekannten BSP-Bindungsstellen sein. Der Wirkmechanismus der knochenbildenden Zellen wurde bereits im Rahmen der Literaturrecherche beschrieben. Deren Aktivierung ist abhängig von zahlreichen Prozessen des Knochenstoffwechsels. Rapuano und Kollegen entdeckten zudem ein unterschiedliches Bindungspotenzial der BSP-Reste [228]. Dadurch könnten die sich im umgebenden Gewebe lokalisierten Zielzellen bevorzugt zunächst an die am stärksten adhäsiv wirkenden Peptidketten binden und nach Überschreiten einer bisher unbekanntes Schwelle eine knochenbildende Wirkung beziehungsweise osteoregulative Einflüsse in Verbindung mit den jeweiligen BSPs auslösen. Da innerhalb des Experiments kein zusätzlicher Reiz (Fraktur, RUNX2) gesetzt wurde, um die Differenzierung bzw. Aktivität der unter anderem Osteoblasten zu triggern, kann davon ausgegangen werden, dass sich deren Anzahl sowie Wirkung innerhalb der einzelnen Individuen im Rahmen des physiologischen Knochenstoffwechsels konstant darstellen lassen könnte. Abbildung 24 soll ein vereinfachtes Schema der Annahme zeigen.

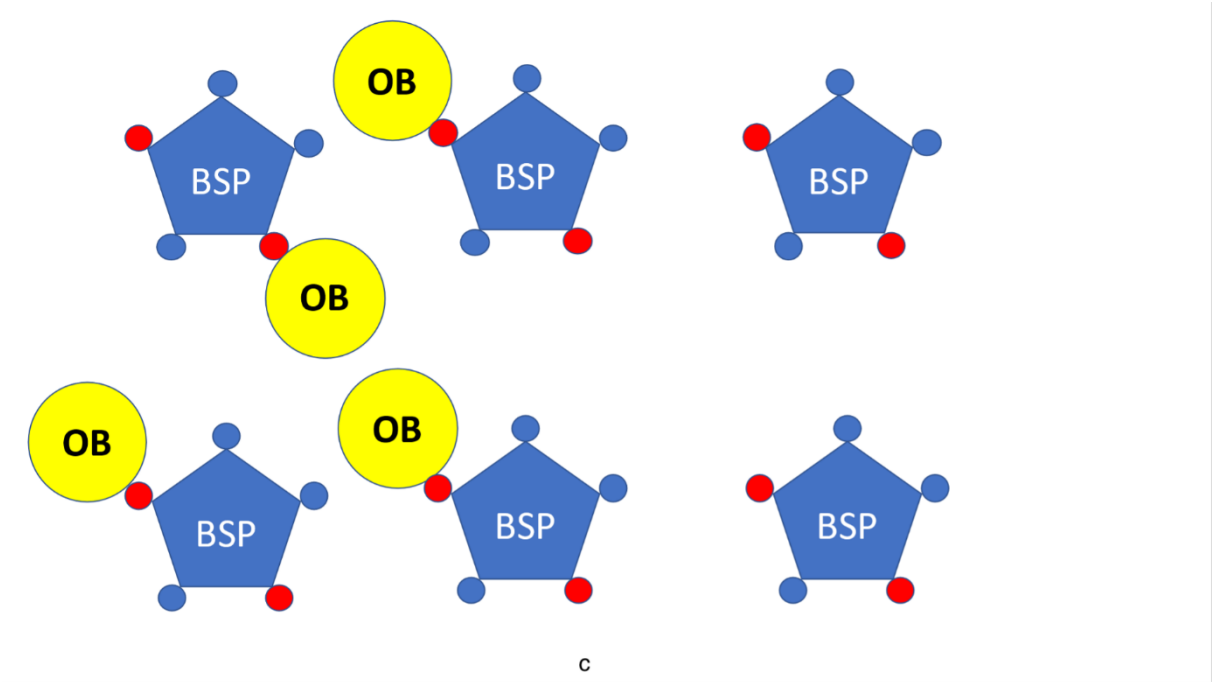
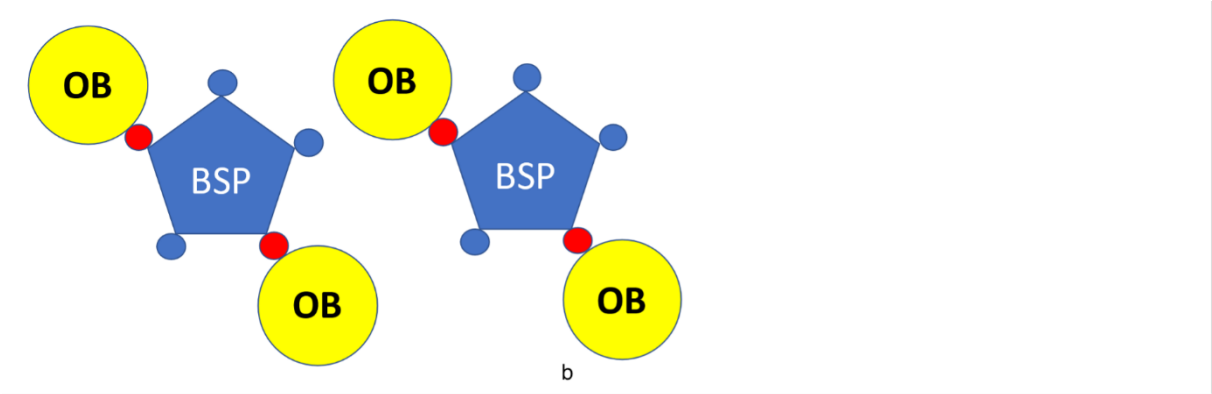
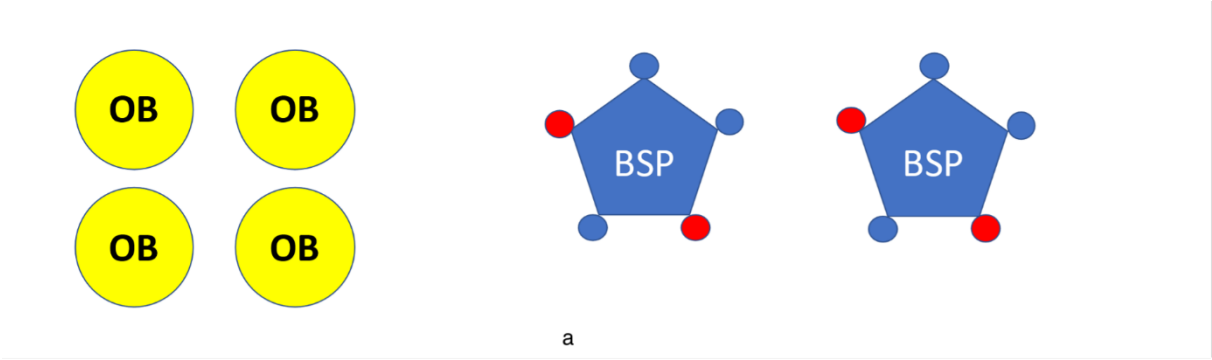


Abbildung 24a-c: Vermutetes Adhäsionsprofil Osteoblasten (OB) und BSP unterschiedlicher Konzentrationen

Abbildung 24 zeigt Osteoblasten (gelb) und BSP-Moleküle (blau) anhand eines vereinfachten Schemas. Die potenziellen Bindungsstellen beider Partnerzellen zeigen ein unterschiedlich starkes Adhäsionspotenzial (stark = rot, schwach = blau). Bei geringerer Konzentration von BSP wird eine Ausschöpfung der Bindungskapazität der stärker adhäsiv wirkenden BSP-Peptidreste durch Osteoblasten erzielt (Abbildung 24b). Unter Annahme einer gewissen Adhäsionsschwelle könnte daraus der Mineralisierungsprozess und damit eine mögliche Ossifikation resultieren. Bei Vermehrung der BSP-Konzentration zeigt sich die reine Bindungsanzahl zwischen Osteoblasten und BSP zwar insgesamt unverändert, jedoch sind deutlich mehr BSP-Moleküle ohne Bindungspartner zu erkennen (Abbildung 24c). Weiterhin könnten Bindungsstellen, die für die Mineralisierung notwendig sind, unbesetzt bleiben, sodass die Aktivierung der Funktionen der Osteoblasten sowie des BSP durch Nichterreichen des zu vermutenden Schwellenbereichs ausbleibt. Dies könnte die unzureichende Aktivierung einer potenziell osteoinduktiven Wirkung des BSP höherer Konzentration teils erklären. Das Schema ist deutlich vereinfacht und soll eher als Anstoß für weitere Untersuchungen dienen. In diesem Zuge können ebenfalls enzymbedingte Mechanismen (Aktivierungen, Hemmungen), die im Zuge des Knochenstoffwechsels eine wichtige Rolle spielen, besser erforscht werden.

Es konnten bisher in anderen Experimenten ähnlich kontroverse Ergebnisse hinsichtlich der Zell-BSP-Bindung erzielt werden. In einer 2016 veröffentlichten Studie zeigte sich bei Steigerung der BSP-Konzentration ebenso eine zunächst kaum relevante Änderung der Osteoblastenadhäsion auf Titanoberflächen. Anfänglich war sogar eine zunächst geringere Proliferationsrate der Osteoblasten auf dem mit BSP-beschichteten Titan verglichen mit der BSP-freien Gruppe erkennbar. Im Verlauf der Untersuchungen schien das BSP höherer Konzentration dennoch eine Auswirkung auf die Differenzierung der Zellen sowie die Mineralisation auszuüben [112]. Weitere Untersuchungen zur Wirkung des BSP auf Osteoblasten in vitro zeigten beispielsweise eine verringerte Expression der Alkalischen Phosphatase bei einer Konzentration des BSP sowohl von 50 µg/ml als auch 200 µg/ml. Die Veränderung der Dosierung hatte demnach keinen relevanten Einfluss auf die Genexpression selbst, jedoch konnten ein gesteigertes Überleben der Osteoblasten sowie die Bildung eines interzellulären Netzwerks bei vergrößerter Zellfläche beobachtet werden [229].

Da es in der vorliegenden Studie sechs Wochen postoperativ in der BSP high dose Gruppe röntgenologisch zu keiner relevanten Ossifikation kam und die BSP low dose Gruppe sowie Positivkontrolle bereits einen Rückgang der Verknöcherungen zeigte, war nicht mehr von einer osteoinduktiven Spätreaktion des BSP höherer Konzentration auszugehen und es erfolgte die Absetzung der Tiere. Die größte HO zeigte sich nach zwei Wochen. Ähnliche Zeiten einer osteoinduktiven Funktion ergaben auch andere Untersuchungen, die sich mit der Thematik des Tissue Engineerings mittels Kollagen Typ 1 befassten. Im Rahmen von in vitro Experimenten anhand von Knochenmarkszellen konnten Mizuno und Kollegen eine erhöhte Aktivierung bedeutsamer Komponenten des Knochenstoffwechsels sowie weiterhin ein Mitwirken an Mineralisationsprozessen durch Kollagen Typ 1 in oben genanntem Zeitraum nachweisen [230]. Dieser Ansatz kann im Rahmen immunhistochemischer Untersuchungen näher erforscht werden. Ein weiterer Denkansatz zur Erklärung der höheren HO-Rate der niedrig dosierten im Vergleich zur höher dosierten BSP-Gruppe wäre, dass es im Rahmen einer negativen Rückkoppelung bei proteinogener Übersättigung durch BSP zu einer Aktivitätsreduktion der Zielzellen kommt. Der Knochenstoffwechsel unterliegt einem komplexen Regelkreislauf, wobei speziell den Osteoblasten ein maßgeblich regulierender Einfluss zuteil kommt. Eine wichtige Aufgabe ist die Sezernierung von BSP, welches die Mineralisierung von Knochengewebe fördert. Ein Überschuss könnte zu einer reduzierten Freisetzung von BSP durch die Osteoblasten selbst führen und damit den Prozess der Osteogenese negativ beeinflussen [19, 165].

5.2.3 Bone Sialoprotein und Bone Morphogenic Protein

Es stellte sich in der röntgenologischen Bildgebung eine höhere HO-Rate der Positivkontrolle verglichen mit den BSP-Gruppen dar. Die ossären Formationen waren weiterhin insgesamt größer in ihrem Erscheinungsbild. Dies lässt auf eine stärkere osteoinduktive Wirkung des BMP gegenüber des BSP schließen. Die Verknöcherungen des BSP bildeten sich zudem schneller zurück. Hieraus ergibt sich folglich die Frage, warum die Matrixproteine BSP sowie BMP eine womöglich unterschiedlich starke osteoinduktive Wirkung aufweisen. Zur Gegenüberstellung beider Proteine soll die nachfolgende Tabelle dienen:

Vergleich	BMP	BSP
Hauptgruppe:	TGF-Beta	SIBLING
Chemischer Aufbau und Signalweg:	N-/C-Terminale Cystein-Reste Serin/Threonin-Kinase-Rezeptoren, SMAD	N-/C-Terminale Keine Cystein-Reste Integrin-vermittelt, (RGD-Sequenz)
Vorkommen:	u.a. Bewegungsapparat, Urogenital- und Reproduktionstrakt, Herz-, Lungengewebe, Seh-, Zahnhalteapparat	u.a. Bewegungsapparat, Nabelschnur, Zahnhalteapparat, Thrombozyten

Tabelle 23: Vergleich Eigenschaften BMP und BSP [82-84; 231-236]

Bei Vergleich beider Proteine zeigt sich, dass das BMP wie bisher bekannt in weitaus mehr physiologischen Vorgängen des Körpers eine maßgebliche Rolle spielt und zum Beginn einer Signalkaskade die Bindung von lediglich zwei bis drei aktivierten BMP-Molekülen als ausreichend gilt [70, 76, 81]. Die Signalwege der BMP tragen, wie bereits im Rahmen dieser Dissertation erläutert, maßgeblich zur Knochenentwicklung bei. Beispielsweise konnte eine regulative Funktion auf Mesenchymzellen mittels Inhibition des BMP durch Noggin sowie Gremlin nachgewiesen werden. Dies führte in vitro zu Störungen der zellulären Kondensation [231]. Weiterhin zeigte sich bei Inaktivierung des SMAD4 von Mäusen eine deutliche Neigung zu skelettalen Fehlbildungen mit teils komplettem Verlust von Gliedmaßen [232]. In Untersuchungen mit gemeinsamer Ablation von BSP-2 sowie BMP-4 konnten zudem Knorpelsynthesefunktionsstörungen aufgezeigt werden [233]. Das BMP wurde im Rahmen dieser Dissertation bereits als Allrounder Protein beschrieben, da seine Funktionen über die des reinen Knochenstoffwechsels und damit der Regulation von Osteoblasten hinausgehen. So spielen sie bei der Embryonalentwicklung zur Aktivierung entwicklungsgenetischer Prozesse eine tragende Rolle. Im weiteren Verlauf wirken sie regulativ auf die Zellproliferation, deren Differenzierung, Migration und Apoptose. Durch die Gruppe der BMP kann eine adäquate Entwicklung unterschiedlichster Organe gewährleistet werden. Hierzu gehören unter anderem der

Urogenitaltrakt, das Herz- sowie Lungengewebe [82-84; 234]. Hinsichtlich der chemischen Struktur beider Proteine fällt auf, dass das BMP verglichen mit dem BSP mehrere Cystein-Reste aufweist. Hierbei handelt es sich um eine Alpha-Aminosäure mit einer schwefelhaltigen Seitenkette ($-\text{CH}_2-\text{SH}$). Das Enantiomer L-Cystein wird beim Menschen aus Serin und Methionin in der Leber gebildet. Bei Oxidation der Seitenketten zweier Cystein-Reste erfolgt die Bildung einer Disulfidbrücke und folglich die Entstehung von Cystin. Derartige Bindungen stabilisieren die Tertiär- wie Quartärstruktur von Proteinen und tragen maßgeblich zu einem adäquaten Proteinstoffwechsel bei [235]. Daraus folgt, dass das BMP in seiner proteinogenen Struktur wohl stabiler als das BSP erscheint. Hier findet sich eine RGD-Sequenz am C-Terminus des Proteins, wodurch es über einen Integrin-Rezeptor vom Vitronektin-Typ ($\alpha\text{v}\beta 3$) die Möglichkeit besitzt, an unterschiedliche Zellen zu binden. Integrine sind Transmembranrezeptoren, die Zellen mit anderen Zellen beziehungsweise Liganden verbinden können. Sie sind damit von großer Bedeutung für die Signaltransduktion. Der Vitronektin-Typ kommt vor allem in Fibroblasten und Endothelzellen vor und kann unter anderem von Liganden wie Osteopontin und BSP gebunden werden [236]. Fibroblasten sind nicht vollständig ausdifferenzierte Zellen, die hauptsächlich im Bindegewebe vorkommen und die Aufgabe zur Produktion von Kollagen und Elastin erfüllen. Unter dem Einfluss von BMP wird die Differenzierung der Fibroblasten zu Osteoblasten getriggert, wodurch der Knochenstoffwechsel in Gang gesetzt werden kann [237]. Dies könnte weiterhin die insgesamt besseren Ossifikationsergebnisse im Rahmen der Röntgenkontrollen durch die Positivkontrolle mittels BMP erklären. Ob das BSP die Möglichkeit besitzt Fibroblasten direkt zu osteoproduktiven Zellen differenzieren zu lassen, ist anhand der aktuellen Studienlage nicht sicher zu belegen. Als potenzielle Zielzellen des BSP kann eine gegenseitige Beeinflussung jedoch angenommen werden.

5.2.4 Lokalisationsabhängigkeit im Gewebe

In der zweiten Versuchsreihe wurden Kollagenschwämme proximal in den Oberschenkel sowie in die Unterschenkelmuskulatur implantiert. Unabhängig von der Konzentration ergaben sich keine HO für die BSP-Gruppen. Dies wirft die Frage auf, warum die osteoinduktive Funktion des BSP je nach Lokalisation in der unteren Extremität variiert. Da in beiden Versuchsreihen bei allen Implantationen in der Positivkontrolle HO nachgewiesen werden konnten, war folglich von einer Funktionsfähigkeit der zweiten Operationstechnik auszugehen. Die folgende Abbildung zeigt den Anteil der am Längenwachstum beteiligten Knochenanteile der unteren Extremität eines Menschen. Der Großteil des Wachstums des Oberschenkelknochens stammt aus den distalen Anteilen des Femurs. Bei Anwendung dieses Modells auf das Bein einer Ratte könnte es sein, dass Fibroblasten oder Osteoblasten in bestimmten Bereichen des Oberschenkelknochens häufiger vorkommen. Die Entfernung der potenziellen Zielzellen zu den implantierten Gerüsten könnte die Knochenbildung demnach verhindert haben.



Abbildung 25: Anteil der Wachstumszonen unterschiedlicher Knochenanteile (rechts), prozentualer Anteil des Längenwachstums auf die gesamte untere Extremität bezogen (links) [238]

Die Entwicklung des menschlichen Oberschenkelknochens erfolgt beim Fetus durch endochondrale Verknöcherung an beiden Femur-Enden und kann in unterschiedliche Stadien nach Carnegie unterteilt werden [239]. Die sogenannten Epiphysenfugen finden sich zwischen der Meta- und Epiphyse von Röhrenknochen und bestimmen bis zum Abschluss deren Wachstums die Länge des jeweiligen Knochens. Wie in Abbildung 25 dargestellt zeigt sich im Bereich des distalen Femurs die größte Wachstumszone verglichen mit den anderen Anteilen der unteren Extremität [238]. Osteoblasten entwickeln sich nach Aktivierung ihrer Differenzierung aus mesenchymalen Zellen. Diese finden sich vorwiegend im Knochenmark, welches in den Markräumen der Knochen zu finden ist. Es lassen sich grundlegend zwei Formen unterscheiden. Im roten Knochenmark sind vornehmlich Stamm- sowie Blutzellen unterschiedlicher Reifegrade zu finden. Hierzu gehören mitunter die mesenchymalen Stammzellen als Vorläuferzellen der Osteoblasten. Das rote Knochenmark findet sich beim langen Röhrenknochen vor allem im meta- bis epiphysären Bereich, was die Annahme einer lokalisationsbevorzugten Ossifikation im distalen Bereich des Femurs unterstützen könnte. Ein möglicher Migrationsprozess der Osteoblasten könnte diese Annahme unterstützen. Die im Rahmen der zweiten Versuchsreihe implantierten Scaffolds wiesen vor allem die Nähe zum diaphysären Anteil des Femurs auf. In der Diaphyse findet sich vorwiegend gelbes Knochenmark ohne stamm- oder blutzellbildende Funktion [240]. Die Bildung ektopter Ossifikation könnte gerade in diesen Bereichen deutlichen Einschränkungen unterliegen. Diese Annahme könnte durch weitere Forschung mittels Zugabe von geeigneten Zielzellen (u.a. Osteoblasten, mesenchymale Zellen) des BSP untersucht werden. Demnach bestünde bereits zu Beginn eine örtliche Nähe zu den jeweiligen Bindungspartnern. Sollten sich dann unter diesen hypothetischen Bedingungen HO für die proximale Oberschenkelmuskulatur ergeben, kann die fehlende osteoinduktive Wirkung des BSPId aufgrund fehlender Zielzellen im Rahmen der zweiten Versuchsreihe dieser Studie erklärt werden.

5.3 Schlussfolgerung

In der Dissertation wurden bildgebende Verfahren zur quantitativen und qualitativen Auswertung einer möglichen Ossifikation durch das BSP genutzt. Konventionelle radiologische Kontrollen konnten die HO nachweisen und deren Verlauf über mehrere Wochen darstellen. Mithilfe μ CT-basierter Diagnostik war es möglich das Volumen der nachgewiesenen HO zu bestimmen. Um die Resultate der ektopen Ossifikationen gezielter zu evaluieren, bieten im Verlauf histologische und immunhistochemische Methoden die Möglichkeit einer mikroskopisch morphologischen Auswertung. Das Muskel-Pouch-Modell erwies sich als geeignete Methode zur Evaluierung der osteoinduktiven Wirkung des BSP. Sowohl bei Arbeiten an der Sterilbank als auch intraoperativ sollten mögliche Kontaminationen der eingesetzten Materialien vermieden werden. Das OP-Verfahren ist unkompliziert und insgesamt schonend für Versuchstiere verglichen mit anderen Tissue-Engineering-Methoden. Um das Abnagen von Fäden durch die Ratten zu verhindern, könnte versuchsweise die Implantation der Kollagen-Scaffolds künftig im Rückenbereich erfolgen. Dabei kann die Lokalisation verschiedener muskulärer Abschnitte weiter untersucht werden. Die Verwendung von BMP als Positivkontrolle lieferte insgesamt zufriedenstellende Ergebnisse, sodass das gewählte Tissue-Engineering-Modell als angemessen und das Experiment als funktional bewertet werden kann.

6 Zusammenfassung

Die demografische Alterung stellt das Gesundheitssystem vor erhebliche gesellschaftliche Herausforderungen, die bereits heute sowohl im ambulanten als auch im stationären Sektor deutlich sichtbar sind. Neben der tertiären Prävention ist insbesondere die Förderung von Autonomie, sozialer Teilhabe sowie die Lebensqualität im höheren Alter von entscheidender Bedeutung. Bei erhöhtem Sturzrisiko und geringerer Knochendichte sind Knochenersatzmaterialien zukünftig unabdingbar. Das Bone Morphogenic Protein ist in vielen menschlichen Geweben präsent und wird bereits klinisch für seine osteoinduktiven und -regulativen Eigenschaften genutzt [6, 7]. Das Bone-Sialoprotein, ein Mitglied der small integrin-binding ligand N-linked glycoproteins, ist eine wesentliche Komponente der extrazellulären Knochenmatrix. Im Rahmen experimenteller Untersuchungen wurden sowohl in vitro als auch in vivo mehrfach potenzielle Einflüsse des BSP auf den Knochenstoffwechsel nachgewiesen [5;112;120-127;229].

Im Rahmen dieser Dissertation wurde die osteoinduktive Eigenschaft des BSP der SIBLING-Familie anhand des Muskel-Pouch-Modells an 51 männlichen Wistar-Ratten im Alter von sechs Wochen untersucht. Ziel war es, die potenzielle Knochenbildung durch BSP mittels Kollagen-Typ-1-Scaffolds zu evaluieren. Hierzu wurden zwei unterschiedliche Konzentrationen des BSP untersucht. Das BMP diente als Positivkontrolle, da es in zahlreichen früheren Studien osteoinduktive Eigenschaften gezeigt hat [231-233]. Die Auswertung wurde durch regelmäßige Röntgenkontrollen über einen Zeitraum von sechs bis acht Wochen durchgeführt. In der ersten Versuchsreihe wurden insgesamt 70 Scaffolds an 35 Versuchstieren untersucht. Die Implantation erfolgte in die distale Oberschenkelmuskulatur streckseitig an beiden unteren Extremitäten. In 60 % der implantierten Scaffolds im Behandlungsarm der BSPId wurden HO-Formationen mit einer durchschnittlichen Größe von 0,60 mm +/- 0,70 mm festgestellt. Diese waren im Vergleich zur Negativkontrolle ($p = 0,04$) sowie zur BSPPhd-Gruppe ($p < 0,05$) insgesamt größer. Die ektopen Verknöcherungen der Positivkontrolle hatten eine durchschnittliche Größe von 3,19 mm +/- 1,24 mm. Im Vergleich zu den anderen Behandlungsarmen des Experiments waren diese signifikant größer (BSPId $p < 0,05$; BSPPhd $p < 0,05$; Negativkontrolle $p < 0,05$). An Tag 14 war das maximale Größenwachstum der einzelnen heterotopen Ossifikationen

sichtbar. Die Verknöcherungen nahmen im weiteren Verlauf ab und waren teilweise nicht mehr nachweisbar. Einige der HO blieben jedoch über Wochen hinweg in ihrer Größe konstant bis zum Zeitpunkt der Euthanasie der Versuchstiere. Unterschiede innerhalb der Versuchsgruppen könnten auf unterschiedliche Bindungskapazitäten der RGD-Sequenzen sowie der möglichen Zielzellen (z.B. Osteoblasten, Fibroblasten, mesenchymale Zellen) zurückzuführen sein. In der zweiten Versuchsreihe wurden insgesamt 12 Ratten mit je 4 Scaffolds operiert. Die Implantation der Kollagenschwämme erfolgte in die proximale Oberschenkel- und Unterschenkelmuskulatur beidseits. Nach drei Wochen zeigten weder konventionelle Radiologie noch μ CT-Aufnahmen Hinweise auf ektope Ossifikationen in beiden BSP-Gruppen, sodass die Tiere nach 21 Tagen abgesetzt wurden. Die Ossifikationsrate für BSP lag bei 0 %. Die Lokalisation der Scaffolds war besonders für das niedrig dosierte BSP wichtig. Es gab einen signifikanten Unterschied in der Anzahl ektooper Verknöcherungen durch BSPId zwischen den zwei Versuchsreihen ($p < 0,01$). Heterotope Ossifikationen traten nur in der ersten Versuchsreihe im distalen Bereich des Musculus vastus lateralis auf.

Diese Studie zeigt, dass BSP osteoinduktive Eigenschaften besitzt. Weitere Forschung könnte sich auf die optimale BSP-Konzentration sowie Platzierung der Knochengerüste konzentrieren. Zusätzlich sind histologische und immunhistochemische Untersuchungen erforderlich, um die knochenbildende Funktion des BSP weiter zu bewerten und mögliche Interaktionen sowie Prozesse auf Zellebene zu identifizieren. Auf Basis der derzeitigen Datenlage ist es möglich, dass BSP zukünftig im Rahmen therapeutischer Ansätze klinisch relevant wird.

7 Literaturverzeichnis

- [1] Gans, Schmitz-Veltin (Hrsg.): Räumliche Konsequenzen des demographischen Wandels: T. 6, Demographische Trends in Deutschland - Folgen für Städte und Regionen. Hannover: Forschungs- und Sitzungsberichte der ARL, 226, 2006. URN: urn:nbn:de:0168-ssoar-284019
- [2] Scheidt-Nave C, Richter S, Fuchs J, Kuhlmeier A. Herausforderungen an die Gesundheitsforschung für eine alternde Gesellschaft am Beispiel "Multimorbidität" [Challenges to health research for aging populations using the example of "multimorbidity"]. Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz. 2010 May;53(5):441-50. German. doi: 10.1007/s00103-010-1052-9. PMID: 20376419.
- [3] Chen X, Wang Z, Duan N, Zhu G, Schwarz EM, Xie C. Osteoblast-osteoclast interactions. Connect Tissue Res. 2018 Mar;59(2):99-107. doi: 10.1080/03008207.2017.1290085. Epub 2017 Mar 21. PMID: 28324674; PMCID: PMC5612831.
- [4] Staines KA, MacRae VE, Farquharson C. The importance of the SIBLING family of proteins on skeletal mineralisation and bone remodelling. J Endocrinol. 2012 Sep;214(3):241-55. doi: 10.1530/JOE-12-0143. Epub 2012 Jun 13. Erratum in: J Endocrinol. 2013 Nov;219(2):X1. PMID: 22700194.
- [5] Bellahcène A, Menard S, Bufalino R, Moreau L, Castronovo V. Expression of bone sialoprotein in primary human breast cancer is associated with poor survival. Int J Cancer. 1996 Aug 22;69(4):350-3. doi: 10.1002/(SICI)1097-0215(19960822)69:4<350;AID-IJC19>3.0.CO;2-9. PMID: 8797881.
- [6] Lavery K, Swain P, Falb D, Alaoui-Ismaili MH. BMP-2/4 and BMP-6/7 differentially utilize cell surface receptors to induce osteoblastic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. J Biol Chem. 2008 Jul 25;283(30):20948-58. doi: 10.1074/jbc.M800850200. Epub 2008 Apr 24. PMID: 18436533; PMCID: PMC3258927.
- [7] Li X, Yi W, Jin A, Duan Y, Min S. Effects of sequentially released BMP-2 and BMP-7 from PELA microcapsule-based scaffolds on the bone regeneration. Am J Transl Res. 2015 Aug 15;7(8):1417-28. PMID: 26396672; PMCID: PMC4568797.
- [8] Daniel D. Chiras: Human Body Systems. Jones & Bartlett Publishers, 29. Mai 2012, ISBN 978-1-4496-4793-3, S. 91.
- [9] Rainer Flindt: Amazing Numbers in Biology. Springer Science & Business Media, 21. Dezember 2006, ISBN 978-3-540-30147-9, S. 208.
- [10] Bartl R., Bartl C., Osteoporose-Manual: Diagnostik, Prävention und Therapie; Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2004, DOI: 10.1007/978-3-642-18792-6, ISBN: 9783540208921, S. 5.
- [11] Bartl R., Bartl C. (2021) Evolution des Skelettes. In: Das Osteoporose Manual. Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-662-62528-6_1, ISBN 978-3-662-62528-6.
- [12] Young G.C. Ordovician microvertebrate remains from the Amadeus Basin, central Australia. J. Vertebr. Paleontol. 1997; 17:1–25.
- [13] Donoghue PC, Sansom IJ, Downs JP. Early evolution of vertebrate skeletal tissues and cellular interactions, and the canalization of skeletal development. J Exp Zool B Mol Dev Evol. 2006 May 15;306(3):278-94. doi: 10.1002/jez.b.21090. PMID: 16555304.
- [14] H. Francillon-Vieillot, V. de Buffrénil, J. Castanet, J. Géraudie, F. J. Meunier, J.-Y. Sire, L. Zylberberg, A. de Ricqlès: Microstructure and mineralization of vertebrate skeletal tissues. In: J. G.

- Carter (Hrsg.): Skeletal Biomineralization: Patterns, Process and Evolutionary Trends. Van Nostrand Reinhold, New York 1990, S. 471–548.
- [15] F. Witzmann, R. Soler-Gijón: The bone histology of osteoderms in temnospondyl amphibians and in the chroniosuchian *Bystrowiella*. In: *Acta Zoologica*. 91, 2010, S. 96–114.
- [16] Rodan GA. The development and function of the skeleton and bone metastases. *Cancer*. 2003 Feb 1;97(3 Suppl):726-32. doi: 10.1002/cncr.11147. PMID: 12548569.
- [17] Taichman RS. Blood and bone: two tissues whose fates are intertwined to create the hematopoietic stem-cell niche. *Blood*. 2005 Apr 1;105(7):2631-9. doi: 10.1182/blood-2004-06-2480. Epub 2004 Dec 7. PMID: 15585658.
- [18] Bartl R, Frisch B (1993) *Biopsy of bone in internal medicine, an atlas and sourcebook*. Kluwer, Dordrecht/Boston/London.
- [19] Werner Linß, Jochen Fanghänel: *Histologie: Zytologie, allgemeine Histologie, mikroskopische Anatomie*. Walter de Gruyter, 1998, ISBN 3-11-014032-2, S. 65–68.
- [20] Watson EC, Adams RH. *Biology of Bone: The Vasculature of the Skeletal System*. Cold Spring Harb Perspect Med. 2018 Jul 2;8(7): a031559. doi: 10.1101/cshperspect. a031559. PMID: 28893838; PMCID: PMC6027931.
- [21] Benninghoff, Drenckhahn: *Anatomie, Bd.1. 17. Auflage*. Elsevier, Urban&FischerVerlag, München 2008, ISBN 978-3-437-42342-0, S. 133–136, 274–276.) (Bartl R, Frisch B (1993) *Biopsy of bone in internal medicine, an atlas and sourcebook*. Kluwer, Dordrecht/Boston/London.
- [20] Franke J., Runge H. (Hrsg.), 1987: *Osteoporose - Diagnose, Differentialdiagnose und Therapie*, Verlag: Volk und Gesundheit, Berlin, S. 316.
- [21] Florencio-Silva R, Sasso GR, Sasso-Cerri E, Simões MJ, Cerri PS. *Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells*. *Biomed Res Int*. 2015; 2015:421746. doi: 10.1155/2015/421746. Epub 2015 Jul 13. PMID: 26247020; PMCID: PMC4515490.
- [22] Rhee JW, Lee KW, Sohn WJ, Lee Y, Jeon OH, Kwon HJ, Kim DS. Regulation of matrix metalloproteinase-9 gene expression and cell migration by NF-kappa B in response to CpG-oligodeoxynucleotides in RAW 264.7 cells. *Mol Immunol*. 2007 Feb;44(6):1393-400. doi: 10.1016/j.molimm.2006.05.003. Epub 2006 Jun 15. PMID: 16780951.
- [23] Tobeiha M, Moghadasian MH, Amin N, Jafarnejad S. RANKL/RANK/OPG Pathway: A Mechanism Involved in Exercise-Induced Bone Remodeling. *Biomed Res Int*. 2020 Feb 19; 2020:6910312. doi: 10.1155/2020/6910312. PMID: 32149122; PMCID: PMC7053481.
- [24] Kim JM, Lin C, Stavre Z, Greenblatt MB, Shim JH. Osteoblast-Osteoclast Communication and Bone Homeostasis. *Cells*. 2020 Sep 10;9(9):2073. doi: 10.3390/cells9092073. PMID: 32927921; PMCID: PMC7564526.
- [25] Clarke B. Normal bone anatomy and physiology. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2008 Nov;3 Suppl 3(Suppl 3): S131-9. doi: 10.2215/CJN.04151206. PMID: 18988698; PMCID: PMC3152283.
- [26] Boyce BF, Xing L, Shakespeare W, Wang Y, Dalgarno D, Iulucci J, Sawyer T. Regulation of bone remodeling and emerging breakthrough drugs for osteoporosis and osteolytic bone metastases. *Kidney Int Suppl*. 2003 Jun;(85): S2-5. doi: 10.1046/j.1523-1755.63.s85.2.x. PMID: 12753255.
- [27] Rasmussen H., *Basic aspects of bone function and calcium metabolism*. *Intern Encyclop Pharmacol Ther*. Vol. 1; 1970: 51.

- [28] Lewiecki EM. Role of sclerostin in bone and cartilage and its potential as a therapeutic target in bone diseases. *Ther Adv Musculoskelet Dis*. 2014 Apr;6(2):48-57. doi: 10.1177/1759720X13510479. PMID: 24688605; PMCID: PMC3956136.
- [29] Delgado-Calle J, Sato AY, Bellido T. Role and mechanism of action of sclerostin in bone. *Bone*. 2017 Mar; 96:29-37. doi: 10.1016/j.bone.2016.10.007. Epub 2016 Oct 12. PMID: 27742498; PMCID: PMC5328835.
- [30] Uda Y, Azab E, Sun N, Shi C, Pajevic PD. Osteocyte Mechanobiology. *Curr Osteoporos Rep*. 2017 Aug;15(4):318-325. doi: 10.1007/s11914-017-0373-0. PMID: 28612339; PMCID: PMC5656287.
- [31] Kremer EA, Chen Y, Suzuki K, Nagase H, Gorski JP. Hydroxyapatite induces autolytic degradation and inactivation of matrix metalloproteinase-1 and -3. *J Bone Miner Res*. 1998 Dec;13(12):1890-902. doi: 10.1359/jbmr.1998.13.12.1890. PMID: 9844107.
- [32] Gualeni B, de Vernejoul MC, Marty-Morieux C, De Leonardis F, Franchi M, Monti L, Forlino A, Houillier P, Rossi A, Geoffroy V. Alteration of proteoglycan sulfation affects bone growth and remodeling. *Bone*. 2013 May;54(1):83-91. doi: 10.1016/j.bone.2013.01.036. Epub 2013 Jan 28. PMID: 23369989; PMCID: PMC3607217.
- [33] Suzuki A, Minamide M, Iwaya C, Ogata K, Iwata J. Role of Metabolism in Bone Development and Homeostasis. *Int J Mol Sci*. 2020 Nov 26;21(23):8992. doi: 10.3390/ijms21238992. PMID: 33256181; PMCID: PMC7729585.
- [34] Fischer V, Haffner-Luntzer M, Amling M, Ignatius A. Calcium and vitamin D in bone fracture healing and post-traumatic bone turnover. *Eur Cell Mater*. 2018 Jun 22; 35:365-385. doi: 10.22203/eCM.v035a25. PMID: 29931664.
- [35] Robert Franz Schmidt, Florian Lang, Manfred Heckmann (Hrsg.): *Physiologie des Menschen*. 31. Auflage. Springer Medizin Verlag, Heidelberg 2010, ISBN 978-3-642-01650-9.
- [36] Blaine J, Chonchol M, Levi M. Renal control of calcium, phosphate, and magnesium homeostasis. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2015 Jul 7;10(7):1257-72. doi: 10.2215/CJN.09750913. Epub 2014 Oct 6. Erratum in: *Clin J Am Soc Nephrol*. 2015 Oct 7;10(10):1886-7. PMID: 25287933; PMCID: PMC4491294.
- [37] Burt MG, Mangelsdorf BL, Srivastava D, Petersons CJ. Acute effect of calcium citrate on serum calcium and cardiovascular function. *J Bone Miner Res*. 2013 Feb;28(2):412-8. doi: 10.1002/jbmr.1761. PMID: 22991234.
- [38] Dhingra R, Sullivan LM, Fox CS, Wang TJ, D'Agostino RB Sr, Gaziano JM, Vasani RS. Relations of serum phosphorus and calcium levels to the incidence of cardiovascular disease in the community. *Arch Intern Med*. 2007 May 14;167(9):879-85. doi: 10.1001/archinte.167.9.879. PMID: 17502528.
- [39] Weaver CM, Alexander DD, Boushey CJ, Dawson-Hughes B, Lappe JM, LeBoff MS, Liu S, Looker AC, Wallace TC, Wang DD. Calcium plus vitamin D supplementation and risk of fractures: an updated meta-analysis from the National Osteoporosis Foundation. *Osteoporos Int*. 2016 Jan;27(1):367-76. doi: 10.1007/s00198-015-3386-5. Epub 2015 Oct 28. Erratum in: *Osteoporos Int*. 2016 Aug;27(8):2643-6. PMID: 26510847; PMCID: PMC4715837.
- [40] Bartl R. (Hrsg.), *Klinische Osteologie – Entstehung, Diagnostik, Prävention und Therapie aller Knochenerkrankungen*, Georg Thieme Verlag KG, 2014 Stuttgart, S. 37.
- [41] Voelkl J, Lang F, Eckardt KU, Amann K, Kuro-O M, Pasch A, Pieske B, Alesutan I. Signaling pathways involved in vascular smooth muscle cell calcification during hyperphosphatemia. *Cell Mol Life Sci*. 2019 Jun;76(11):2077-2091. doi: 10.1007/s00018-019-03054-z. Epub 2019 Mar 18. PMID: 30887097; PMCID: PMC6502780.

- [42] Paloiian NJ, Giachelli CM. A current understanding of vascular calcification in CKD. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2014 Oct 15;307(8): F891-900. doi: 10.1152/ajprenal.00163.2014. Epub 2014 Aug 20. PMID: 25143458; PMCID: PMC4200295.
- [43] Deutsche Gesellschaft für Ernährung : Die Referenzwerte für die Nährstoffzufuhr : Magnesium. Abgerufen 18.10.21.
- [44] Chiavistelli S, Giustina A, Mazziotti G. Parathyroid hormone pulsatility: physiological and clinical aspects. *Bone Res*. 2015 Jan 27; 3:14049. doi: 10.1038/boneres.2014.49. PMID: 26273533; PMCID: PMC4472146.
- [45] Schmitt CP, Schaefer F, Bruch A, Veldhuis JD, Schmidt-Gayk H, Stein G, Ritz E, Mehls O. Control of pulsatile and tonic parathyroid hormone secretion by ionized calcium. *J Clin Endocrinol Metab*. 1996 Dec;81(12):4236-43. doi: 10.1210/jcem.81.12.8954021. PMID: 8954021.
- [46] Edward M. Brown, MD, Martin Pollak, MD, and Steven C. Hebert, MD: The Extracellular Calcium-Sensing Receptor: Its Role in Health and Disease; *Annual Review of Medicine* 1998 49:1, 15-29.
- [47] COPP DH, CAMERON EC. Demonstration of a hypocalcemic factor (calcitonin) in commercial parathyroid extract. *Science*. 1961 Dec 22;134(3495):2038. doi: 10.1126/science.134.3495.2038. PMID: 13881212.
- [48] Dusso AS, Brown AJ, Slatopolsky E. Vitamin D. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2005 Jul;289(1): F8-28. doi: 10.1152/ajprenal.00336.2004. PMID: 15951480.
- [49] Kumar R. Vitamin D metabolism and mechanisms of calcium transport. *J Am Soc Nephrol*. 1990 Jul;1(1):30-42. doi: 10.1681/ASN.V1130. PMID: 2104249.
- [50] Renz-Polster, Krautzig (Hrsg.), *Basislehrbuch Innere Medizin – kompakt-greifbar-verständlich*, 5. Auflage, 2013, Elsevier GmbH, Urban & Fischer Verlag, ISBN: 978-3-437-41114-4, S. 694.
- [51] Dineen R, Behan LA, Kelleher G, Hannon MJ, Brady JJ, Rogers B, Keevil BG, Tormey W, Smith D, Thompson CJ, McKenna MJ, Arlt W, Stewart PM, Agha A, Sherlock M. The contribution of serum cortisone and glucocorticoid metabolites to detrimental bone health in patients receiving hydrocortisone therapy. *BMC Endocr Disord*. 2020 Oct 10;20(1):154. doi: 10.1186/s12902-020-00633-1. PMID: 33036588; PMCID: PMC7547490.
- [52] Seeman E. Age- and menopause-related bone loss compromise cortical and trabecular microstructure. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2013 Oct;68(10):1218-25. doi: 10.1093/gerona/glt071. Epub 2013 Jul 5. PMID: 23833200.
- [53] Brancatella A, Marcocci C. TSH suppressive therapy and bone. *Endocr Connect*. 2020 Jul;9(7): R158-R172. doi: 10.1530/EC-20-0167. PMID: 32567550; PMCID: PMC7424360.
- [54] Delitala AP, Scuteri A, Doria C. Thyroid Hormone Diseases and Osteoporosis. *J Clin Med*. 2020 Apr 6;9(4):1034. doi: 10.3390/jcm9041034. PMID: 32268542; PMCID: PMC7230461.
- [55] Gera S, Sant D, Haider S, Korkmaz F, Kuo TC, Mathew M, Perez-Pena H, Xie H, Chen H, Batista R, Ma K, Cheng Z, Hadelia E, Robinson C, Macdonald A, Miyashita S, Williams A, Jebian G, Miyashita H, Gumerova A, Ievleva K, Smith P, He J, Ryu V, DeMambro V, Quinn MA, Meseck M, Kim SM, Kumar TR, Iqbal J, New MI, Lizneva D, Rosen CJ, Hsueh AJ, Yuen T, Zaidi M. First-in-class humanized FSH blocking antibody targets bone and fat. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2020 Nov 17;117(46):28971-28979. doi: 10.1073/pnas.2014588117. Epub 2020 Oct 30. PMID: 33127753; PMCID: PMC7682550.

- [56] Khosla S. Estrogen Versus FSH Effects on Bone Metabolism: Evidence From Interventional Human Studies. *Endocrinology*. 2020 Aug 1;161(8): bqaa111. doi: 10.1210/endo/bqaa111. PMID: 32602895; PMCID: PMC7371389.
- [57] Wolf JH., Julius Wolff und sein Gesetz der Transformation der Knochen". In: *Der Orthopäde*. Band 24, Nummer 5, Springer, September 1995, ISSN 0085-4530, S. 378 ff, PMID 7478499.
- [58] Ireland A, Maden-Wilkinson T, Ganse B, Degens H, Rittweger J. Effects of age and starting age upon side asymmetry in the arms of veteran tennis players: a cross-sectional study. *Osteoporos Int*. 2014 Apr;25(4):1389-400. doi: 10.1007/s00198-014-2617-5. Epub 2014 Feb 15. PMID: 24531424.
- [59] Patel DS, Roth M, Kapil N. Stress fractures: diagnosis, treatment, and prevention. *Am Fam Physician*. 2011 Jan 1;83(1):39-46. PMID: 21888126.
- [60] Eriksen EF. Cellular mechanisms of bone remodeling. *Rev Endocr Metab Disord*. 2010 Dec;11(4):219-27. doi: 10.1007/s11154-010-9153-1. PMID: 21188536; PMCID: PMC3028072.
- [65] Kurth A., Lange U. (Hrsg.): *Fachwissen Osteologie*, 1. Auflage, 2018, Elsevier GmbH, ISBN: 978-3-437-22102-6, S. 6: P351, Augat P.
- [69] Chen D, Zhao M, Harris SE, Mi Z. Signal transduction and biological functions of bone morphogenetic proteins. *Front Biosci*. 2004 Jan 1; 9:349-58. doi: 10.2741/1090. PMID: 14766372.
- [70] Chen D, Zhao M, Mundy GR. Bone morphogenetic proteins. *Growth Factors*. 2004 Dec;22(4):233-41. doi: 10.1080/08977190412331279890. PMID: 15621726.
- [71] Urist MR. Bone: formation by autoinduction. *Science*. 1965 Nov 12;150(3698):893-9. doi: 10.1126/science.150.3698.893. PMID: 5319761.
- [72] Kaps C, Bramlage C, Smolian H, Haisch A, Ungethüm U, Burmester GR, Sittinger M, Gross G, Häupl T. Bone morphogenetic proteins promote cartilage differentiation and protect engineered artificial cartilage from fibroblast invasion and destruction. *Arthritis Rheum*. 2002 Jan;46(1):149-62. doi: 10.1002/1529-0131(200201)46:1<149: AID-ART10058>3.0.CO;2-W. PMID: 11817587.
- [73] Loozen LD, Krzyt MC, Kragten AHM, Schoenfeldt T, Croes M, Oner CF, Dhert WJA, Alblas J. BMP-2 gene delivery in cell-loaded and cell-free constructs for bone regeneration. *PLoS One*. 2019 Jul 31;14(7): e0220028. doi: 10.1371/journal.pone.0220028. PMID: 31365542; PMCID: PMC6668905.
- [74] Bramlage CP, Häupl T, Kaps C, Bramlage P, Müller GA, Strutz F. Bone Morphogenetic Proteins im Skelettsystem -- eine zusammenfassende Darstellung [Bone morphogenetic proteins in the skeletal system]. *Z Rheumatol*. 2005 Sep;64(6):416-22. German. doi: 10.1007/s00393-005-0665-0. PMID: 16184350.
- [75] Chen G, Xu H, Yao Y, Xu T, Yuan M, Zhang X, Lv Z, Wu M. BMP Signaling in the Development and Regeneration of Cranium Bones and Maintenance of Calvarial Stem Cells. *Front Cell Dev Biol*. 2020 Mar 10; 8:135. doi: 10.3389/fcell.2020.00135. PMID: 32211409; PMCID: PMC7075941.
- [76] Lowery JW, Rosen V. The BMP Pathway and Its Inhibitors in the Skeleton. *Physiol Rev*. 2018 Oct 1;98(4):2431-2452. doi: 10.1152/physrev.00028.2017. PMID: 30156494.
- [77] Chien SY, Tsai CH, Liu SC, Huang CC, Lin TH, Yang YZ, Tang CH. Noggin Inhibits IL-1 β and BMP-2 Expression, and Attenuates Cartilage Degeneration and Subchondral Bone Destruction in

Experimental Osteoarthritis. *Cells*. 2020 Apr 10;9(4):927. doi: 10.3390/cells9040927. PMID: 32290085; PMCID: PMC7226847.

[78] Hu K, Sun H, Gui B, Sui C. Gremlin-1 suppression increases BMP-2-induced osteogenesis of human mesenchymal stem cells. *Mol Med Rep*. 2017 Apr;15(4):2186-2194. doi: 10.3892/mmr.2017.6253. Epub 2017 Feb 28. PMID: 28260028; PMCID: PMC5364878.

[79] Khokha MK, Hsu D, Brunet LJ, Dionne MS, Harland RM. Gremlin is the BMP antagonist required for maintenance of Shh and Fgf signals during limb patterning. *Nat Genet*. 2003 Jul;34(3):303-7. doi: 10.1038/ng1178. PMID: 12808456.

[80] Jani P, Zhang H, Benson MD, Qin C. Noggin inhibition of mouse dentinogenesis. *J Oral Biosci*. 2020 Mar;62(1):72-79. doi: 10.1016/j.job.2019.11.001. Epub 2019 Dec 17. PMID: 31862386; PMCID: PMC6959969.

[81] Harrison CA, Al-Musawi SL, Walton KL. Prodomains regulate the synthesis, extracellular localisation and activity of TGF- β superfamily ligands. *Growth Factors*. 2011 Oct;29(5):174-86. doi: 10.3109/08977194.2011.608666. Epub 2011 Aug 24. PMID: 21864080.

[82] Wang S, Chen Q, Simon TC, Strebeck F, Chaudhary L, Morrissey J, Liapis H, Klahr S, Hruska KA. Bone morphogenic protein-7 (BMP-7), a novel therapy for diabetic nephropathy. *Kidney Int*. 2003 Jun;63(6):2037-49. doi: 10.1046/j.1523-1755.2003.00035.x. PMID: 12753291.

[83] Zeisberg M, Bottiglio C, Kumar N, Maeshima Y, Strutz F, Müller GA, Kalluri R. Bone morphogenic protein-7 inhibits progression of chronic renal fibrosis associated with two genetic mouse models. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2003 Dec;285(6): F1060-7. doi: 10.1152/ajprenal.00191.2002. Epub 2003 Aug 12. PMID: 12915382.

[84] Zeisberg M, Shah AA, Kalluri R. Bone morphogenic protein-7 induces mesenchymal to epithelial transition in adult renal fibroblasts and facilitates regeneration of injured kidney. *J Biol Chem*. 2005 Mar 4;280(9):8094-100. doi: 10.1074/jbc.M413102200. Epub 2004 Dec 9. PMID: 15591043.

[85] Schuster L, Ardjomandi N, Munz M, Umrath F, Klein C, Rupp F, Reinert S, Alexander D. Establishment of Collagen: Hydroxyapatite/BMP-2 Mimetic Peptide Composites. *Materials (Basel)*. 2020 Mar 7;13(5):1203. doi: 10.3390/ma13051203. PMID: 32155998; PMCID: PMC7085073.

[86] Dougados M, Baeten D. Spondyloarthritis. *Lancet*. 2011 Jun 18;377(9783):2127-37. doi: 10.1016/S0140-6736(11)60071-8. PMID: 21684383.

[87] Briolay A, El Jamal A, Arnolfo P, Le Goff B, Blanchard F, Magne D, Bougault C. Enhanced BMP-2/BMP-4 ratio in patients with peripheral spondyloarthritis and in cytokine- and stretch-stimulated mouse chondrocytes. *Arthritis Res Ther*. 2020 Oct 12;22(1):234. doi: 10.1186/s13075-020-02330-9. PMID: 33046134; PMCID: PMC7552569.

[88] Bowness P. HLA-B27. *Annu Rev Immunol*. 2015; 33:29-48. doi: 10.1146/annurev-immunol-032414-112110. PMID: 25861975.

[89] Grandon B, Rincheval-Arnold A, Jah N, Corsi JM, Araujo LM, Glatigny S, Prevost E, Roche D, Chiocchia G, Guénel I, Gaumer S, Breban M. HLA-B27 alters BMP/TGF β signalling in *Drosophila*, revealing putative pathogenic mechanism for spondyloarthritis. *Ann Rheum Dis*. 2019 Dec;78(12):1653-1662. doi: 10.1136/annrheumdis-2019-215832. Epub 2019 Sep 28. PMID: 31563893.

[90] Luo X, Hutley LJ, Webster JA, Kim YH, Liu DF, Newell FS, Widberg CH, Bachmann A, Turner N, Schmitz-Peiffer C, Prins JB, Yang GS, Whitehead JP. Identification of BMP and activin

membrane-bound inhibitor (BAMBI) as a potent negative regulator of adipogenesis and modulator of autocrine/paracrine adipogenic factors. *Diabetes*. 2012 Jan;61(1):124-36. doi: 10.2337/db11-0998. PMID: 22187378; PMCID: PMC3237663.

[91] Motomura M, Shimokawa F, Kobayashi T, Yamashita Y, Mizoguchi I, Sato Y, Murakami Y, Shimizu I, Matsui T, Murakami M, Funaba M. Relationships between expression levels of genes related to adipogenesis and adipocyte function in dogs. *Mol Biol Rep*. 2019 Oct;46(5):4771-4777. doi: 10.1007/s11033-019-04923-3. Epub 2019 Aug 12. PMID: 31407244.

[92] Wang X, Chen J, Li L, Zhu CL, Gao J, Rampersad S, Bu L, Qu S. New association of bone morphogenetic protein 4 concentrations with fat distribution in obesity and Exenatide intervention on it. *Lipids Health Dis*. 2017 Apr 4;16(1):70. doi: 10.1186/s12944-017-0462-1. PMID: 28376799; PMCID: PMC5379507.

[93] Wang S, Gu M, Jiang H, Zheng X. BMP-2 upregulates the AKT/mTOR pathway in breast cancer with microcalcification and indicates a poor prognosis. *Clin Transl Oncol*. 2020 Aug;22(8):1263-1271. doi: 10.1007/s12094-019-02248-y. Epub 2019 Dec 20. PMID: 31863351.

[94] Scimeca M, Giocondo R, Montanaro M, Granaglia A, Bonfiglio R, Tancredi V, Mauriello A, Urbano N, Schillaci O, Bonanno E. BMP-2 Variants in Breast Epithelial to Mesenchymal Transition and Microcalcifications Origin. *Cells*. 2020 Jun 2;9(6):1381. doi: 10.3390/cells9061381. PMID: 32498363; PMCID: PMC7348762.

[95] Ren J, Wang Y, Ware T, Iaria J, Ten Dijke P, Zhu HJ. Reactivation of BMP signaling by suboptimal concentrations of MEK inhibitor and FK506 reduces organ-specific breast cancer metastasis. *Cancer Lett*. 2020 Nov 28; 493:41-54. doi: 10.1016/j.canlet.2020.07.042. Epub 2020 Aug 6. PMID: 32768522.

[96] Eckhardt BL, Cao Y, Redfern AD, Chi LH, Burrows AD, Roslan S, Sloan EK, Parker BS, Loi S, Ueno NT, Lau PKH, Latham B, Anderson RL. Activation of Canonical BMP4-SMAD7 Signaling Suppresses Breast Cancer Metastasis. *Cancer Res*. 2020 Mar 15;80(6):1304-1315. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-19-0743. Epub 2020 Jan 15. PMID: 31941699.

[97] Williams PA, Peacocke AR. The physical properties of a glycoprotein from bovine cortical bone (bone sialoprotein). *Biochim Biophys Acta*. 1965 Nov 1;101(3):327-35. doi: 10.1016/0926-6534(65)90011-4. PMID: 5862222.

[98] McKee M, William G., Chapter 2 Bone Matrix and Mineralization, *Pediatric Bone*, Elsevier, 2012, doi.org/10.1016/B978-0-12-382040-2.10002-4.

[99] Ganss B, Kim RH, Sodek J. Bone sialoprotein. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1999;10(1):79-98. doi: 10.1177/10454411990100010401. PMID: 10759428.

[100] Fedarko NS, Fohr B, Robey PG, Young MF, Fisher LW. Factor H binding to bone sialoprotein and osteopontin enables tumor cell evasion of complement-mediated attack. *J Biol Chem*. 2000 Jun 2;275(22):16666-72. doi: 10.1074/jbc.M001123200. PMID: 10747989.

[101] Foster BL, Ao M, Willoughby C, Soenjaya Y, Holm E, Lukashova L, Tran AB, Wimer HF, Zervas PM, Nociti FH Jr, Kantovitz KR, Quan BD, Sone ED, Goldberg HA, Somerman MJ. Mineralization defects in cementum and craniofacial bone from loss of bone sialoprotein. *Bone*. 2015 Sep; 78:150-64. doi: 10.1016/j.bone.2015.05.007. Epub 2015 May 9. PMID: 25963390; PMCID: PMC4466207.

[102] Lamour V, Nokin MJ, Henry A, Castronovo V, Bellahcène A. Les protéines SIBLING - Outils moléculaires de la progression tumorale et de l'angiogenèse [SIBLING proteins: molecular tools for

tumor progression and angiogenesis]. *Med Sci (Paris)*. 2013 Nov;29(11):1018-25. French. doi: 10.1051/medsci/20132911019. Epub 2013 Nov 20. PMID: 24280506.

[103] Qin C, Baba O, Butler WT. Post-translational modifications of sibling proteins and their roles in osteogenesis and dentinogenesis. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2004 Jun 4;15(3):126-36. doi: 10.1177/154411130401500302. PMID: 15187031.

[104] Boudiffa M, Wade-Gueye NM, Guignandon A, Vanden-Bossche A, Sabido O, Aubin JE, Jurdic P, Vico L, Lafage-Proust MH, Malaval L. Bone sialoprotein deficiency impairs osteoclastogenesis and mineral resorption in vitro. *J Bone Miner Res*. 2010 Dec;25(12):2669-79. doi: 10.1002/jbmr.245. Erratum in: *J Bone Miner Res*. 2011 Feb;26(2):439. Erratum in: *J Bone Miner Res*. 2020 Aug;35(8):1617. PMID: 20812227.

[105] Malaval L, Wade-Gu ye NM, Boudiffa M, Fei J, Zirngibl R, Chen F, Laroche N, Roux JP, Burt-Pichat B, Duboeuf F, Boivin G, Jurdic P, Lafage-Proust MH, Am d e J, Vico L, Rossant J, Aubin JE. Bone sialoprotein plays a functional role in bone formation and osteoclastogenesis. *J Exp Med*. 2008 May 12;205(5):1145-53. doi: 10.1084/jem.20071294. Epub 2008 May 5. PMID: 18458111; PMCID: PMC2373846.

[106] Wade-Gueye NM, Boudiffa M, Vanden-Bossche A, Laroche N, Aubin JE, Vico L, Lafage-Proust MH, Malaval L. Absence of bone sialoprotein (BSP) impairs primary bone formation and resorption: the marrow ablation model under PTH challenge. *Bone*. 2012 May;50(5):1064-73. doi: 10.1016/j.bone.2012.02.014. PMID: 22586700.

[107] Wade-Gueye NM, Boudiffa M, Laroche N, Vanden-Bossche A, Fournier C, Aubin JE, Vico L, Lafage-Proust MH, Malaval L. Mice lacking bone sialoprotein (BSP) lose bone after ovariectomy and display skeletal site-specific response to intermittent PTH treatment. *Endocrinology*. 2010 Nov;151(11):5103-13. doi: 10.1210/en.2010-0091. Epub 2010 Sep 15. PMID: 20844009.

[108] Ecarot-Charrier B, Bouchard F, Delloye C. Bone sialoprotein II synthesized by cultured osteoblasts contains tyrosine sulfate. *J Biol Chem*. 1989 Nov 25;264(33):20049-53. PMID: 2584207.

[109] Vijaykumar A, Dyrkacz P, Vidovic-Zdrilic I, Maye P, Mina M. Expression of BSP-GFP^{tpz} Transgene during Osteogenesis and Reparative Dentinogenesis. *J Dent Res*. 2020 Jan;99(1):89-97. doi: 10.1177/0022034519885089. Epub 2019 Nov 4. PMID: 31682548; PMCID: PMC6927219.

[110] Ao M, Chavez MB, Chu EY, Hemstreet KC, Yin Y, Yadav MC, Mill n JL, Fisher LW, Goldberg HA, Somerman MJ, Foster BL. Overlapping functions of bone sialoprotein and pyrophosphate regulators in directing cementogenesis. *Bone*. 2017 Dec; 105:134-147. doi: 10.1016/j.bone.2017.08.027. Epub 2017 Sep 1. PMID: 28866368; PMCID: PMC5730356.

[111] Busch A, J ger M, Dittrich F, Wegner A, Landgraeber S, Haversath M. Synovial bone sialoprotein indicates aseptic failure in total joint arthroplasty. *J Orthop Surg Res*. 2020 May 27;15(1):193. doi: 10.1186/s13018-020-01718-2. PMID: 32460850; PMCID: PMC7254687.

[112] Baranowski A, Klein A, Ritz U, Ackermann A, Anthonissen J, Kaufmann KB, Brendel C, G tz H, Rommens PM, Hofmann A. Surface Functionalization of Orthopedic Titanium Implants with Bone Sialoprotein. *PLoS One*. 2016 Apr 25;11(4): e0153978. doi: 10.1371/journal.pone.0153978. PMID: 27111551; PMCID: PMC4844107.

[113] Bellahc ne A, Merville MP, Castronovo V. Expression of bone sialoprotein, a bone matrix protein, in human breast cancer. *Cancer Res*. 1994 Jun 1;54(11):2823-6. PMID: 8187059.

[114] Diel IJ, Solomayer EF, Seibel MJ, Pfeilschifter J, Maisenbacher H, Gollan C, Pecherstorfer M, Conradi R, Kehr G, Boehm E, Armbruster FP, Bastert G. Serum bone sialoprotein in patients with

primary breast cancer is a prognostic marker for subsequent bone metastasis. *Clin Cancer Res.* 1999 Dec;5(12):3914-9. PMID: 10632320.

[115] Waltregny D, Bellahcène A, Van Riet I, Fisher LW, Young M, Fernandez P, Dewé W, de Leval J, Castronovo V. Prognostic value of bone sialoprotein expression in clinically localized human prostate cancer. *J Natl Cancer Inst.* 1998 Jul 1;90(13):1000-8. doi: 10.1093/jnci/90.13.1000. PMID: 9665149.

[116] Fedarko NS, Jain A, Karadag A, Van Eman MR, Fisher LW. Elevated serum bone sialoprotein and osteopontin in colon, breast, prostate, and lung cancer. *Clin Cancer Res.* 2001 Dec;7(12):4060-6. PMID: 11751502.

[117] Barnes GL, Javed A, Waller SM, Kamal MH, Hebert KE, Hassan MQ, Bellahcene A, Van Wijnen AJ, Young MF, Lian JB, Stein GS, Gerstenfeld LC. Osteoblast-related transcription factors Runx2 (Cbfa1/AML3) and MSX2 mediate the expression of bone sialoprotein in human metastatic breast cancer cells. *Cancer Res.* 2003 May 15;63(10):2631-7. PMID: 12750290.

[118] Fisher LW, McBride OW, Termine JD, Young MF. Human bone sialoprotein. Deduced protein sequence and chromosomal localization. *J Biol Chem.* 1990 Feb 5;265(4):2347-51. PMID: 2404984.

[119] Fisher LW, Hawkins GR, Tuross N, Termine JD. Purification and partial characterization of small proteoglycans I and II, bone sialoproteins I and II, and osteonectin from the mineral compartment of developing human bone. *J Biol Chem.* 1987 Jul 15;262(20):9702-8. PMID: 3597437.

[120] Oldberg A, Franzén A, Heinegård D. The primary structure of a cell-binding bone sialoprotein. *J Biol Chem.* 1988 Dec 25;263(36):19430-2. PMID: 3198635.

[121] Ecarot-Charrier B, Bouchard F, Delloye C. Bone sialoprotein II synthesized by cultured osteoblasts contains tyrosine sulfate. *J Biol Chem.* 1989 Nov 25;264(33):20049-53. PMID: 2584207.

[122] Midura RJ, McQuillan DJ, Benham KJ, Fisher LW, Hascall VC. A rat osteogenic cell line (UMR 106-01) synthesizes a highly sulfated form of bone sialoprotein. *J Biol Chem.* 1990 Mar 25;265(9):5285-91. PMID: 2318894.

[123] Franzén A, Heinegård D. Isolation and characterization of two sialoproteins present only in bone calcified matrix. *Biochem J.* 1985 Dec 15;232(3):715-24. doi: 10.1042/bj2320715. PMID: 4091817; PMCID: PMC1152943.

[124] Fisher LW, Whitson SW, Avioli LV, Termine JD. Matrix sialoprotein of developing bone. *J Biol Chem.* 1983 Oct 25;258(20):12723-7. PMID: 6355090.

[125] Uccello M, Malaguarnera G, Vacante M, Motta M. Serum bone sialoprotein levels and bone metastases. *J Cancer Res Ther.* 2011 Apr-Jun;7(2):115-9. doi: 10.4103/0973-1482.82912. PMID: 21768695.

[126] Chenu C, Delmas PD. Platelets contribute to circulating levels of bone sialoprotein in human. *J Bone Miner Res.* 1992 Jan;7(1):47-54. doi: 10.1002/jbmr.5650070108. PMID: 1549958.

[127] Chen JK, Shapiro HS, Wrana JL, Reimers S, Heersche JN, Sodek J. Localization of bone sialoprotein (BSP) expression to sites of mineralized tissue formation in fetal rat tissues by in situ hybridization. *Matrix.* 1991 Apr;11(2):133-43. doi: 10.1016/s0934-8832(11)80217-9. PMID: 2072878.

- [128] Chen J, McKee MD, Nanci A, Sodek J. Bone sialoprotein mRNA expression and ultrastructural localization in fetal porcine calvarial bone: comparisons with osteopontin. *Histochem J.* 1994 Jan;26(1):67-78. PMID: 8169152.
- [129] Bianco P, Riminucci M, Bonucci E, Termine JD, Robey PG. Bone sialoprotein (BSP) secretion and osteoblast differentiation: relationship to bromodeoxyuridine incorporation, alkaline phosphatase, and matrix deposition. *J Histochem Cytochem.* 1993 Feb;41(2):183-91. doi: 10.1177/41.2.8419458. PMID: 8419458.
- [130] Helfrich MH, Nesbitt SA, Dorey EL, Horton MA. Rat osteoclasts adhere to a wide range of RGD (Arg-Gly-Asp) peptide-containing proteins, including the bone sialoproteins and fibronectin, via a beta 3 integrin. *J Bone Miner Res.* 1992 Mar;7(3):335-43. doi: 10.1002/jbmr.5650070314. PMID: 1585836.
- [131] Roche P, Goldberg HA, Delmas PD, Malaval L. Selective attachment of osteoprogenitors to laminin. *Bone.* 1999 Apr;24(4):329-36. doi: 10.1016/s8756-3282(98)00194-x. PMID: 10221545.
- [132] Sommarin Y, Larsson T, Heinegård D. Chondrocyte-matrix interactions. Attachment to proteins isolated from cartilage. *Exp Cell Res.* 1989 Sep;184(1):181-92. doi: 10.1016/0014-4827(89)90376-5. PMID: 2792223.
- [133] Somerman MJ, Fisher LW, Foster RA, Sauk JJ. Human bone sialoprotein I and II enhance fibroblast attachment in vitro. *Calcif Tissue Int.* 1988 Jul;43(1):50-3. doi: 10.1007/BF02555169. PMID: 3145122.
- [134] Bellahcène A, Bonjean K, Fohr B, Fedarko NS, Robey FA, Young MF, Fisher LW, Castronovo V. Bone sialoprotein mediates human endothelial cell attachment and migration and promotes angiogenesis. *Circ Res.* 2000 Apr 28;86(8):885-91. doi: 10.1161/01.res.86.8.885. PMID: 10785511.
- [135] Mintz KP, Grzesik WJ, Midura RJ, Robey PG, Termine JD, Fisher LW. Purification and fragmentation of nondenatured bone sialoprotein: evidence for a cryptic, RGD-resistant cell attachment domain. *J Bone Miner Res.* 1993 Aug;8(8):985-95. doi: 10.1002/jbmr.5650080812. PMID: 8213261.
- [136] Rydén C, Yacoub AI, Maxe I, Heinegård D, Oldberg A, Franzén A, Ljungh A, Rubin K. Specific binding of bone sialoprotein to *Staphylococcus aureus* isolated from patients with osteomyelitis. *Eur J Biochem.* 1989 Sep 15;184(2):331-6. doi: 10.1111/j.1432-1033.1989.tb15023.x. PMID: 2792103.
- [137] Rydén C, Tung HS, Nikolaev V, Engström A, Oldberg A. *Staphylococcus aureus* causing osteomyelitis binds to a nonapeptide sequence in bone sialoprotein. *Biochem J.* 1997 Nov 1;327 (Pt 3)(Pt 3):825-9. doi: 10.1042/bj3270825. PMID: 9581562; PMCID: PMC1218863.
- [138] Yacoub A, Lindahl P, Rubin K, Wendel M, Heinegård D, Rydén C. Purification of a bone sialoprotein-binding protein from *Staphylococcus aureus*. *Eur J Biochem.* 1994 Jun 15;222(3):919-25. doi: 10.1111/j.1432-1033.1994.tb18940.x. PMID: 8026501.
- [139] Tung Hs, Guss B, Hellman U, Persson L, Rubin K, Rydén C. A bone sialoprotein-binding protein from *Staphylococcus aureus*: a member of the staphylococcal Sdr family. *Biochem J.* 2000 Feb 1;345 Pt 3(Pt 3):611-9. PMID: 10642520; PMCID: PMC1220796.
- [140] Saxne T, Zunino L, Heinegård D. Increased release of bone sialoprotein into synovial fluid reflects tissue destruction in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1995 Jan;38(1):82-90. doi: 10.1002/art.1780380113. PMID: 7818577.

- [141] McGovern JA, Griffin M, Hutmacher DW. Animal models for bone tissue engineering and modelling disease. *Dis Model Mech*. 2018 Apr 23;11(4): dmm033084. doi: 10.1242/dmm.033084. PMID: 29685995; PMCID: PMC5963860.
- [142] Drosse I, Volkmer E, Capanna R, De Biase P, Mutschler W, Schieker M. Tissue engineering for bone defect healing: an update on a multi-component approach. *Injury*. 2008 Sep;39 Suppl 2: S9-20. doi: 10.1016/S0020-1383(08)70011-1. PMID: 18804579.
- [143] Sharma P, Kumar P, Sharma R, Bhatt VD, Dhot PS. Tissue Engineering; Current Status & Futuristic Scope. *J Med Life*. 2019 Jul-Sep;12(3):225-229. doi: 10.25122/jml-2019-0032. PMID: 31666821; PMCID: PMC6814873.
- [144] Ikada Y. Challenges in tissue engineering. *J R Soc Interface*. 2006 Oct 22;3(10):589-601. doi: 10.1098/rsif.2006.0124. PMID: 16971328; PMCID: PMC1664655.
- [145] Bigham-Sadegh A, Oryan A. Selection of animal models for pre-clinical strategies in evaluating the fracture healing, bone graft substitutes and bone tissue regeneration and engineering. *Connect Tissue Res*. 2015 Jun;56(3):175-94. doi: 10.3109/03008207.2015.1027341. Epub 2015 Apr 22. PMID: 25803622.
- [146] Nakamura T, Shirakata Y, Shinohara Y, Miron RJ, Furue K, Noguchi K. Osteogenic potential of recombinant human bone morphogenetic protein-9/absorbable collagen sponge (rhBMP-9/ACS) in rat critical size calvarial defects. *Clin Oral Investig*. 2017 Jun;21(5):1659-1665. doi: 10.1007/s00784-016-1963-4. Epub 2016 Oct 11. PMID: 27726024.
- [147] Lohmann P, Willuweit A, Neffe AT, Geisler S, Gebauer TP, Beer S, Coenen HH, Fischer H, Hermanns-Sachweh B, Lendlein A, Shah NJ, Kiessling F, Langen KJ. Bone regeneration induced by a 3D architected hydrogel in a rat critical-size calvarial defect. *Biomaterials*. 2017 Jan; 113:158-169. doi: 10.1016/j.biomaterials.2016.10.039. Epub 2016 Oct 28. PMID: 27815999.
- [148] Zhang H, Mao X, Du Z, Jiang W, Han X, Zhao D, Han D, Li Q. Three dimensional printed macroporous polylactic acid/hydroxyapatite composite scaffolds for promoting bone formation in a critical-size rat calvarial defect model. *Sci Technol Adv Mater*. 2016 Apr 8;17(1):136-148. doi: 10.1080/14686996.2016.1145532. PMID: 27877865; PMCID: PMC5101962.
- [149] Newman E, Turner AS, Wark JD. The potential of sheep for the study of osteopenia: current status and comparison with other animal models. *Bone*. 1995 Apr;16(4 Suppl):277S-284S. doi: 10.1016/8756-3282(95)00026-a. PMID: 7626315.
- [150] Pobloth AM, Schell H, Petersen A, Beierlein K, Kleber C, Schmidt-Bleek K, Duda GN. Tubular open-porous β -tricalcium phosphate polycaprolactone scaffolds as guiding structure for segmental bone defect regeneration in a novel sheep model. *J Tissue Eng Regen Med*. 2018 Apr;12(4):897-911. doi: 10.1002/term.2446. Epub 2017 Jun 29. PMID: 28485078.
- [151] Hollinger JO, Kleinschmidt JC. The critical size defect as an experimental model to test bone repair materials. *J Craniofac Surg*. 1990 Jan;1(1):60-8. doi: 10.1097/00001665-199001000-00011. PMID: 1965154.
- [152] Keating JF, Simpson AH, Robinson CM. The management of fractures with bone loss. *J Bone Joint Surg Br*. 2005 Feb;87(2):142-50. doi: 10.1302/0301-620x.87b2.15874. PMID: 15736731.
- [153] Shasha N, Krywulak S, Backstein D, Pressman A, Gross AE. Long-term follow-up of fresh tibial osteochondral allografts for failed tibial plateau fractures. *J Bone Joint Surg Am*. 2003;85-A Suppl 2:33-9. doi: 10.2106/00004623-200300002-00005. PMID: 12721343.

- [154] Gustilo RNB, Merkow RL, Templeman D. The management of open fractures. *J Bone Joint Surg*, 1990;72-A:299–304.
- [155] Paley D, Maar DC. Ilizarov bone transport treatment for tibial defects. *J Orthop Trauma*. 2000 Feb;14(2):76-85. doi: 10.1097/00005131-200002000-00002. PMID: 10716377.
- [156] Shadjou N, Hasanzadeh M. Graphene and its nanostructure derivatives for use in bone tissue engineering: Recent advances. *J Biomed Mater Res A*. 2016 May;104(5):1250-75. doi: 10.1002/jbm.a.35645. Epub 2016 Jan 29. PMID: 26748447.
- [157] Shadjou N, Hasanzadeh M, Khalilzadeh B. Graphene based scaffolds on bone tissue engineering. *Bioengineered*. 2018 Jan 1;9(1):38-47. doi: 10.1080/21655979.2017.1373539. Epub 2017 Nov 30. PMID: 29095664; PMCID: PMC5972914.
- [158] Qasim M, Chae DS, Lee NY. Advancements and frontiers in nano-based 3D and 4D scaffolds for bone and cartilage tissue engineering. *Int J Nanomedicine*. 2019 Jun 11; 14:4333-4351. doi: 10.2147/IJN.S209431. PMID: 31354264; PMCID: PMC6580939.
- [159] De Mori A, Peña Fernández M, Blunn G, Tozzi G, Roldo M. 3D Printing and Electrospinning of Composite Hydrogels for Cartilage and Bone Tissue Engineering. *Polymers (Basel)*. 2018 Mar 8;10(3):285. doi: 10.3390/polym10030285. PMID: 30966320; PMCID: PMC6414880.
- [160] Zhang L, Yang G, Johnson BN, Jia X. Three-dimensional (3D) printed scaffold and material selection for bone repair. *Acta Biomater*. 2019 Jan 15; 84:16-33. doi: 10.1016/j.actbio.2018.11.039. Epub 2018 Nov 24. PMID: 30481607.
- [161] Patel H, Bonde M, Srinivasan G. Biodegradable polymer scaffold for tissue engineering. *Trends Biomater Artif Organs*. 2011; 25:20–9.
- [162] Nuss KM, Auer JA, Boos A, von Rechenberg B. An animal model in sheep for biocompatibility testing of biomaterials in cancellous bones. *BMC Musculoskelet Disord*. 2006 Aug 15; 7:67. doi: 10.1186/1471-2474-7-67. PMID: 16911787; PMCID: PMC1578562.
- [163] Pearce AI, Richards RG, Milz S, Schneider E, Pearce SG. Animal models for implant biomaterial research in bone: a review. *Eur Cell Mater*. 2007 Mar 2; 13:1-10. doi: 10.22203/ecm.v013a01. PMID: 17334975.
- [164] Reichert JC, Saifzadeh S, Wullschlegel ME, Epari DR, Schütz MA, Duda GN, Schell H, van Griensven M, Redl H, Hutmacher DW. The challenge of establishing preclinical models for segmental bone defect research. *Biomaterials*. 2009 Apr;30(12):2149-63. doi: 10.1016/j.biomaterials.2008.12.050. Epub 2009 Feb 10. PMID: 19211141.
- [165] Kular J, Tickner J, Chim SM, Xu J. An overview of the regulation of bone remodelling at the cellular level. *Clin Biochem*. 2012 Aug;45(12):863-73. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2012.03.021. Epub 2012 Mar 23. PMID: 22465238.
- [166] Clarke B. Normal bone anatomy and physiology. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2008 Nov;3 Suppl 3(Suppl 3): S131-9. doi: 10.2215/CJN.04151206. PMID: 18988698; PMCID: PMC3152283.
- [167] Shapiro F. Cortical bone repair. The relationship of the lacunar-canalicular system and intercellular gap junctions to the repair process. *J Bone Joint Surg Am*. 1988 Aug;70(7):1067-81. PMID: 3042791.
- [168] Schell H, Duda GN, Peters A, Tsitsilonis S, Johnson KA, Schmidt-Bleek K. The haematoma and its role in bone healing. *J Exp Orthop*. 2017 Dec;4(1):5. doi: 10.1186/s40634-017-0079-3. Epub 2017 Feb 7. PMID: 28176273; PMCID: PMC5296258.

- [169] Scott MA, Levi B, Askarinam A, Nguyen A, Rackohn T, Ting K, Soo C, James AW. Brief review of models of ectopic bone formation. *Stem Cells Dev.* 2012 Mar 20;21(5):655-67. doi: 10.1089/scd.2011.0517. Epub 2012 Jan 4. PMID: 22085228; PMCID: PMC3295855.
- [170] EDMONDS HW, COE HE, TABRAH FL. Bone formation in skin and muscle; a localized tissue malformation or heterotopia. *J Pediatr.* 1948 Nov;33(11):618-23. doi: 10.1016/s0022-3476(48)80276-3. PMID: 18891055.
- [171] Shore EM, Kaplan FS. Insights from a rare genetic disorder of extra-skeletal bone formation, fibrodysplasia ossificans progressiva (FOP). *Bone.* 2008 Sep;43(3):427-33. doi: 10.1016/j.bone.2008.05.013. Epub 2008 May 28. PMID: 18590993; PMCID: PMC2601573.
- [172] Pignolo RJ, Shore EM, Kaplan FS. Fibrodysplasia ossificans progressiva: diagnosis, management, and therapeutic horizons. *Pediatr Endocrinol Rev.* 2013 Jun;10 Suppl 2(0 2):437-48. PMID: 23858627; PMCID: PMC3995352.
- [173] Park JC, So SS, Jung IH, Yun JH, Choi SH, Cho KS, Kim CS. Induction of bone formation by *Escherichia coli*-expressed recombinant human bone morphogenetic protein-2 using block-type macroporous biphasic calcium phosphate in orthotopic and ectopic rat models. *J Periodontol Res.* 2011 Dec;46(6):682-90. doi: 10.1111/j.1600-0765.2011.01390.x. Epub 2011 Jun 27. PMID: 21702756.
- [174] Kempen DH, Lu L, Hefferan TE, Creemers LB, Heijink A, Maran A, Dhert WJ, Yaszemski MJ. Enhanced bone morphogenetic protein-2-induced ectopic and orthotopic bone formation by intermittent parathyroid hormone (1-34) administration. *Tissue Eng Part A.* 2010 Dec;16(12):3769-77. doi: 10.1089/ten.TEA.2010.0173. Epub 2010 Sep 9. PMID: 20666615; PMCID: PMC2991197.
- [175] Lee JH, Kim CS, Choi KH, Jung UW, Yun JH, Choi SH, Cho KS. The induction of bone formation in rat calvarial defects and subcutaneous tissues by recombinant human BMP-2, produced in *Escherichia coli*. *Biomaterials.* 2010 May;31(13):3512-9. doi: 10.1016/j.biomaterials.2010.01.075. Epub 2010 Feb 9. PMID: 20149447.
- [176] Ma D, Yao H, Tian W, Chen F, Liu Y, Mao T, Ren L. Enhancing bone formation by transplantation of a scaffold-free tissue-engineered periosteum in a rabbit model. *Clin Oral Implants Res.* 2011 Oct;22(10):1193-1199. doi: 10.1111/j.1600-0501.2010.02091.x. Epub 2011 Feb 8. PMID: 21303418.
- [177] Takaoka K, Nakahara H, Yoshikawa H, Masuhara K, Tsuda T, Ono K. Ectopic bone induction on and in porous hydroxyapatite combined with collagen and bone morphogenetic protein. *Clin Orthop Relat Res.* 1988 Sep;(234):250-4. PMID: 3409583.
- [178] Hulsart-Billström G, Hu Q, Bergman K, Jonsson KB, Åberg J, Tang R, Larsson S, Hilborn J. Calcium phosphates compounds in conjunction with hydrogel as carrier for BMP-a study on ectopic bone formation in rats. *Acta Biomater.* 2011 Aug;7(8):3042-9. doi: 10.1016/j.actbio.2011.04.021. Epub 2011 Apr 27. PMID: 21569871.
- [179] Luca L, Rougemont AL, Walpoth BH, Boure L, Tami A, Anderson JM, Jordan O, Gurny R. Injectable rhBMP-2-loaded chitosan hydrogel composite: osteoinduction at ectopic site and in segmental long bone defect. *J Biomed Mater Res A.* 2011 Jan;96(1):66-74. doi: 10.1002/jbm.a.32957. Epub 2010 Oct 26. PMID: 21105153.
- [180] Barbieri D, Yuan H, de Groot F, Walsh WR, de Bruijn JD. Influence of different polymeric gels on the ectopic bone forming ability of an osteoinductive biphasic calcium phosphate ceramic. *Acta Biomater.* 2011 May;7(5):2007-14. doi: 10.1016/j.actbio.2011.01.017. Epub 2011 Jan 15. PMID: 21241835.

- [181] Barbieri D, Renard AJ, de Bruijn JD, Yuan H. Heterotopic bone formation by nano-apatite containing poly(D, L-lactide) composites. *Eur Cell Mater.* 2010 Jun 5; 19:252-61. doi: 10.22203/ecm.v 019a24. PMID: 20526989.
- [182] Warnke PH, Springer IN, Wiltfang J, Acil Y, Eufinger H, Wehmöller M, Russo PA, Bolte H, Sherry E, Behrens E, Terheyden H. Growth and transplantation of a custom vascularised bone graft in a man. *Lancet.* 2004 Aug 28-Sep 3;364(9436):766-70. doi: 10.1016/S0140-6736(04)16935-3. PMID: 15337402.
- [183] Meinberg EG, Clark D, Miclau KR, Marcucio R, Miclau T. Fracture repair in the elderly: Clinical and experimental considerations. *Injury.* 2019 Jun;50 Suppl 1(Suppl 1): S62-S65. doi: 10.1016/j.injury.2019.05.005. Epub 2019 May 11. PMID: 31130210; PMCID: PMC7021229.
- [184] Martin V, Bettencourt A. Bone regeneration: Biomaterials as local delivery systems with improved osteoinductive properties. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2018 Jan 1; 82:363-371. doi: 10.1016/j.msec.2017.04.038. Epub 2017 Apr 11. PMID: 29025670.
- [185] Iaquinta MR, Mazzoni E, Manfrini M, D'Agostino A, Trevisiol L, Nocini R, Trombelli L, Barbanti-Brodano G, Martini F, Tognon M. Innovative Biomaterials for Bone Regrowth. *Int J Mol Sci.* 2019 Jan 31;20(3):618. doi: 10.3390/ijms20030618. PMID: 30709008; PMCID: PMC6387157.
- [186] Tang D, Tare RS, Yang LY, Williams DF, Ou KL, Oreffo RO. Biofabrication of bone tissue: approaches, challenges and translation for bone regeneration. *Biomaterials.* 2016 Mar; 83:363-82. doi: 10.1016/j.biomaterials.2016.01.024. Epub 2016 Jan 9. PMID: 26803405.
- [187] Perez JR, Kouroupis D, Li DJ, Best TM, Kaplan L, Correa D. Tissue Engineering and Cell-Based Therapies for Fractures and Bone Defects. *Front Bioeng Biotechnol.* 2018 Jul 31; 6:105. doi: 10.3389/fbioe.2018.00105. PMID: 30109228; PMCID: PMC6079270.
- [188] Cao W., Hench L.L. Bioactive Materials. *Ceram. Int.* 1996; 22:493–507. doi: 10.1016/0272-8842(95)00126-3.
- [189] Dorozhkin SV. Amorphous calcium (ortho)phosphates. *Acta Biomater.* 2010 Dec;6(12):4457-75. doi: 10.1016/j.actbio.2010.06.031. Epub 2010 Jul 6. PMID: 20609395.
- [190] Nyberg E, Holmes C, Witham T, Grayson WL. Growth factor-eluting technologies for bone tissue engineering. *Drug Deliv Transl Res.* 2016 Apr;6(2):184-94. doi: 10.1007/s13346-015-0233-3. PMID: 25967594.
- [191] Badylak SF, Freytes DO, Gilbert TW. Reprint of: Extracellular matrix as a biological scaffold material: Structure and function. *Acta Biomater.* 2015 Sep;23 Suppl: S17-26. doi: 10.1016/j.actbio.2015.07.016. PMID: 26235342.
- [192] Hussey GS, Cramer MC, Badylak SF. Extracellular Matrix Bioscaffolds for Building Gastrointestinal Tissue. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol.* 2017 Sep 14;5(1):1-13. doi: 10.1016/j.jcmgh.2017.09.004. PMID: 29276748; PMCID: PMC5736871.
- [193] Iqbal N., Khan A.S., Asif A., Yar M., Haycock J.W., Rehman I.U. Recent concepts in biodegradable polymers for tissue engineering paradigms: A critical review. *Int. Mater. Rev.* 2019; 64:91–126. doi: 10.1080/09506608.2018.1460943.
- [194] Cameron DJ, Shaver MP. Aliphatic polyester polymer stars: synthesis, properties and applications in biomedicine and nanotechnology. *Chem Soc Rev.* 2011 Mar;40(3):1761-76. doi: 10.1039/c0cs00091d. Epub 2010 Nov 16. PMID: 21082079.

- [195] Xia H., Li X., Gao W., Fu X., Fang R.H., Zhang L., Zhang K. Tissue repair and regeneration with endogenous stem cells. *Nat. Rev. Mater.* 2018; 3:174–193. doi: 10.1038/s41578-018-0027-6.
- [196] Lee KY, Jeong L, Kang YO, Lee SJ, Park WH. Electrospinning of polysaccharides for regenerative medicine. *Adv Drug Deliv Rev.* 2009 Oct 5;61(12):1020-32. doi: 10.1016/j.addr.2009.07.006. Epub 2009 Jul 28. PMID: 19643155.
- [197] Sheikh Z, Najeeb S, Khurshid Z, Verma V, Rashid H, Glogauer M. Biodegradable Materials for Bone Repair and Tissue Engineering Applications. *Materials (Basel).* 2015 Aug 31;8(9):5744-5794. doi: 10.3390/ma8095273. PMID: 28793533; PMCID: PMC5512653.
- [198] Bauer TW, Muschler GF. Bone graft materials. An overview of the basic science. *Clin Orthop Relat Res.* 2000 Feb;(371):10-27. PMID: 10693546.
- [199] Giannoudis PV, Tzioupis C, Green J. Surgical techniques: how I do it? The Reamer/Irrigator/Aspirator (RIA) system. *Injury.* 2009 Nov;40(11):1231-6. doi: 10.1016/j.injury.2009.07.070. Epub 2009 Sep 23. PMID: 19783249.
- [200] Brutus JP, Loftus JB. Gerdy's tubercle as a source of cancellous bone graft for surgery of the upper extremity: description of technique. *J Hand Surg Am.* 2006 Jan;31(1):147-9. doi: 10.1016/j.jhssa.2005.07.011. PMID: 16443119.
- [201] Finkemeier CG. Bone-grafting and bone-graft substitutes. *J Bone Joint Surg Am.* 2002 Mar;84(3):454-64. doi: 10.2106/00004623-200203000-00020. PMID: 11886919.
- [202] Giannoudis PV, Dinopoulos H, Tsiridis E. Bone substitutes: an update. *Injury.* 2005 Nov;36 Suppl 3: S20-7. doi: 10.1016/j.injury.2005.07.029. PMID: 16188545.
- [203] Khan SN, Cammisa FP Jr, Sandhu HS, Diwan AD, Girardi FP, Lane JM. The biology of bone grafting. *J Am Acad Orthop Surg.* 2005 Jan-Feb;13(1):77-86. PMID: 15712985.
- [204] Ostermann PA, Haase N, Rübberdt A, Wich M, Ekkernkamp A. Management of a long segmental defect at the proximal meta-diaphyseal junction of the tibia using a cylindrical titanium mesh cage. *J Orthop Trauma.* 2002 Sep;16(8):597-601. doi: 10.1097/00005131-200209000-00010. PMID: 12352570.
- [205] Hofmann A, Gorbulev S, Guehring T, Schulz AP, Schupfner R, Raschke M, Huber-Wagner S, Rommens PM; CERTiFy Study Group. Autologous Iliac Bone Graft Compared with Biphasic Hydroxyapatite and Calcium Sulfate Cement for the Treatment of Bone Defects in Tibial Plateau Fractures: A Prospective, Randomized, Open-Label, Multicenter Study. *J Bone Joint Surg Am.* 2020 Feb 5;102(3):179-193. doi: 10.2106/JBJS.19.00680. PMID: 31809394; PMCID: PMC7508276.
- [206] Robinson L, Salma-Ancane K, Stipniece L, Meenan BJ, Boyd AR. The deposition of strontium and zinc Co-substituted hydroxyapatite coatings. *J Mater Sci Mater Med.* 2017 Mar;28(3):51. doi: 10.1007/s10856-017-5846-2. Epub 2017 Feb 14. PMID: 28197823.
- [207] Ambard AJ, Mueninghoff L. Calcium phosphate cement: review of mechanical and biological properties. *J Prosthodont.* 2006 Sep-Oct;15(5):321-8. doi: 10.1111/j.1532-849X.2006.00129.x. PMID: 16958734.
- [208] Wehland M, Steinwerth P, Aleshcheva G, Sahana J, Hemmersbach R, Lützenberg R, Kopp S, Infanger M, Grimm D. Tissue Engineering of Cartilage Using a Random Positioning Machine. *Int J Mol Sci.* 2020 Dec 16;21(24):9596. doi: 10.3390/ijms21249596. PMID: 33339388; PMCID: PMC7765923.

- [209] Patel A, Zaky SH, Schoedel K, Li H, Sant V, Beniash E, Sfeir C, Stolz DB, Sant S. Design and evaluation of collagen-inspired mineral-hydrogel nanocomposites for bone regeneration. *Acta Biomater.* 2020 Aug;112: 262-273. doi: 10.1016/j.actbio.2020.05.034. Epub 2020 Jun 1. PMID: 32497742; PMCID: PMC7446305.
- [210] Tang JZ, Nie MJ, Zhao JZ, Zhang GC, Zhang Q, Wang B. Platelet-rich plasma versus hyaluronic acid in the treatment of knee osteoarthritis: a meta-analysis. *J Orthop Surg Res.* 2020 Sep 11;15(1):403. doi: 10.1186/s13018-020-01919-9. PMID: 32912243; PMCID: PMC7488405.
- [211] Zhao J, Huang H, Liang G, Zeng LF, Yang W, Liu J. Effects and safety of the combination of platelet-rich plasma (PRP) and hyaluronic acid (HA) in the treatment of knee osteoarthritis: a systematic review and meta-analysis. *BMC Musculoskelet Disord.* 2020 Apr 11;21(1):224. doi: 10.1186/s12891-020-03262-w. PMID: 32278352; PMCID: PMC7149899.
- [212] Park CH, Woo KM. Fibrin-Based Biomaterial Applications in Tissue Engineering and Regenerative Medicine. *Adv Exp Med Biol.* 2018; 1064:253-261. doi: 10.1007/978-981-13-0445-3_16. PMID: 30471038.
- [213] White AP, Vaccaro AR, Hall JA, Whang PG, Friel BC, McKee MD. Clinical applications of BMP-7/OP-1 in fractures, nonunions and spinal fusion. *Int Orthop.* 2007 Dec;31(6):735-41. doi: 10.1007/s00264-007-0422-x. Epub 2007 Jul 25. PMID: 17962946; PMCID: PMC2266670.
- [214] James AW, LaChaud G, Shen J, Asatrian G, Nguyen V, Zhang X, Ting K, Soo C. A Review of the Clinical Side Effects of Bone Morphogenetic Protein-2. *Tissue Eng Part B Rev.* 2016 Aug;22(4):284-97. doi: 10.1089/ten.TEB.2015.0357. Epub 2016 Apr 19. PMID: 26857241; PMCID: PMC4964756.
- [215] Kim SG, Zhou J, Solomon C, Zheng Y, Suzuki T, Chen M, Song S, Jiang N, Cho S, Mao JJ. Effects of growth factors on dental stem/progenitor cells. *Dent Clin North Am.* 2012 Jul;56(3):563-75. doi: 10.1016/j.cden.2012.05.001. PMID: 22835538; PMCID: PMC4112411.
- [216] Kobbe P, Laubach M, Hutmacher DW, Alabdulrahman H, Sellei RM, Hildebrand F. Convergence of scaffold-guided bone regeneration and RIA bone grafting for the treatment of a critical-sized bone defect of the femoral shaft. *Eur J Med Res.* 2020 Dec 21;25(1):70. doi: 10.1186/s40001-020-00471-w. PMID: 33349266; PMCID: PMC7754593.
- [217] Meinberg EG, Clark D, Miclau KR, Marcucio R, Miclau T. Fracture repair in the elderly: Clinical and experimental considerations. *Injury.* 2019 Jun;50 Suppl 1(Suppl 1): S62-S65. doi: 10.1016/j.injury.2019.05.005. Epub 2019 May 11. PMID: 31130210; PMCID: PMC7021229.
- [218] Brodsky B, Persikov AV. Molecular structure of the collagen triple helix. *Adv Protein Chem.* 2005; 70:301-39. doi: 10.1016/S0065-3233(05)70009-7. PMID: 15837519.
- [219] Clarke B. Normal bone anatomy and physiology. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2008 Nov;3 Suppl 3(Suppl 3): S131-9. doi: 10.2215/CJN.04151206. PMID: 18988698; PMCID: PMC3152283.
- [220] Lin HH, Chao PG, Tai WC, Chang PC. 3D-Printed Collagen-Based Waveform Microfibrous Scaffold for Periodontal Ligament Reconstruction. *Int J Mol Sci.* 2021 Jul 20;22(14):7725. doi: 10.3390/ijms22147725. PMID: 34299345; PMCID: PMC8307958.
- [221] Inhibition of c-Jun N-terminal kinase signaling promotes osteoblastic differentiation of periodontal ligament stem cells and induces regeneration of periodontal tissues. Kaneko H, Hasegawa D, Itoyama T, Yoshida S, Tomokiyo A, Hamano S, Sugii H, Maeda H. *Arch Oral Biol.* 2021 Nov 26; 134:105323. PMID: 34896864.

- [222] Repairing Cartilage with Processed Chondrocyte Constructs: A 6-Month Study Using a Porcine Model. Kusanagi A, Blahut EB, Ogura T, Tsuchiya A, Mizuno S. *Cartilage*. 2021 Dec;13(2_suppl):1088S-1101S. PMID: 34763541
- [223] Effects of rice fermented extracts, "Sake Lees", on the functional activity of odontoblast-like cells (KN-3 cells). Okamoto K, Kakihara Y, Ohkura N, Tohma A, Washio A, Kitamura C, Noiri Y, Yamamura K, Saeki M. *Odontology*. 2021 Sep 8. Epub ahead of print. PMID: 34498157.
- [224] Assessment and Comparison of the Efficacy of Methotrexate, Prednisolone, Adalimumab, and Tocilizumab on Multipotency of Mesenchymal Stem Cells. Liu S, Kiyoi T, Ishida M, Mogi M. *Front Pharmacol*. 2020 Jul 3; 11:1004. PMID: 32719606
- [225] Heterogeneous Matrix Deposition in Human Tissue Engineered Cartilage Changes the Local Shear Modulus and Resistance to Local Construct Buckling. Jill M. Middendorf, Caroline Dugopolski, Stephen Kennedy, Eric Blahut, Itai Cohen, Lawrence J. Bonassar. *Journal of Biomechanics*, 2020, 109760.
- [226] Conditioned media from mesenchymal stromal cells and periodontal ligament fibroblasts under cyclic stretch stimulation promote bone healing in mouse calvarial defects. Ogisu K, Fujio M, Tsuchiya S, Tsuboi M, Qi C, Toyama N, Kamio H, Hibi H. *Cytotherapy*. 2020 Oct;22(10):543-551. PMID: 32798177.
- [227] Bouleftour, Wafa & Juignet, Laura & Bouët, Guénaëlle & Granito, Renata & Arnaud, Vanden-Bossche & Laroche, Norbert & Aubin, Jane & Lafage-Proust, Mh & Vico, Laurence & Malaval, Luc. (2016). The role of the SIBLING, Bone Sialoprotein in skeletal biology — Contribution of mouse experimental genetics. *Matrix Biology*. 52-54. 10.1016/j.matbio.2015.12.011. DOI:10.1016/j.matbio.2015.12.011.
- [228] Rapuano BE, Wu C, MacDonald DE. Osteoblast-like cell adhesion to bone sialoprotein peptides. *J Orthop Res*. 2004 Mar;22(2):353-61. doi: 10.1016/S0736-0266(03)00180-3. PMID: 15013096.
- [229] Klein A, Baranowski A, Ritz U, Götz H, Heinemann S, Mattyasovszky S, Rommens PM, Hofmann A. Effect of bone sialoprotein coated three-dimensional printed calcium phosphate scaffolds on primary human osteoblasts. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2018 Oct;106(7):2565-2575. doi: 10.1002/jbm.b.34073. Epub 2018 Jan 9. PMID: 29316208.
- [230] Mizuno M, Imai T, Fujisawa R, Tani H, Kuboki Y. Bone sialoprotein (BSP) is a crucial factor for the expression of osteoblastic phenotypes of bone marrow cells cultured on type I collagen matrix. *Calcif Tissue Int*. 2000 May;66(5):388-96. doi: 10.1007/s002230010078. PMID: 10773110.
- [231] Barna M, Niswander L. Visualization of cartilage formation: insight into cellular properties of skeletal progenitors and chondrodysplasia syndromes. *Dev Cell*. 2007 Jun;12(6):931-41. doi: 10.1016/j.devcel.2007.04.016. PMID: 17543865.
- [232] Bandyopadhyay A, Tsuji K, Cox K, Harfe BD, Rosen V, Tabin CJ. Genetic analysis of the roles of BMP2, BMP4, and BMP7 in limb patterning and skeletogenesis. *PLoS Genet*. 2006 Dec;2(12):e216. doi: 10.1371/journal.pgen.0020216. Epub 2006 Nov 6. PMID: 17194222; PMCID: PMC1713256.

- [233] Bénazet JD, Pignatti E, Nugent A, Unal E, Laurent F, Zeller R. Smad4 is required to induce digit ray primordia and to initiate the aggregation and differentiation of chondrogenic progenitors in mouse limb buds. *Development*. 2012 Nov;139(22):4250-60. doi: 10.1242/dev.084822. Epub 2012 Oct 3. PMID: 23034633.
- [234] Zakariyah, Abeer & Rajgara, Rashida & Veinot, John & Skerjanc, Ilona & Burgon, Patrick. (2017). Congenital heart defect causing mutation in Nkx2.5 displays in vivo functional deficit. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 105. 10.1016/j.yjmcc.2017.03.003. DOI:10.1016/j.yjmcc.2017.03.003
- [235] Peter Heinrich, Matthias Müller, Lutz Graeve (Hrsg.): Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie. 9. Auflage, Springer-Verlag, Heidelberg 2014, ISBN 978-3-642-17971-6, S. 485.
- [236] Takagi H, Suzuma K, Otani A, Oh H, Koyama S, Ohashi H, Watanabe D, Ojima T, Suganami E, Honda Y. Role of vitronectin receptor-type integrins and osteopontin in ischemia-induced retinal neovascularization. *Jpn J Ophthalmol*. 2002 May-Jun;46(3):270-8. doi: 10.1016/s0021-5155(02)00482-3. PMID: 12063036.
- [237] Rutherford RB, Gu K, Racenis P, Krebsbach PH. Early events: the in vitro conversion of BMP transduced fibroblasts to chondroblasts. *Connect Tissue Res*. 2003;44 Suppl 1:117-23. PMID: 12952184.
- [238] Exner, Ulrich: 2003 Normalwerte in Wachstum und Entwicklung; Print ISBN 9783137463023 · Online ISBN 9783131854728; DOI: 10.1055/b-0034-17872.
- [239] Suzuki Y, Matsubayashi J, Ji X, Yamada S, Yoneyama A, Imai H, Matsuda T, Aoyama T, Takakuwa T. Morphogenesis of the femur at different stages of normal human development. *PLoS One*. 2019 Aug 23;14(8): e0221569. doi: 10.1371/journal.pone.0221569. PMID: 31442281; PMCID: PMC6707600.
- [240] Lucas D. Structural organization of the bone marrow and its role in hematopoiesis. *Curr Opin Hematol*. 2021 Jan;28(1):36-42. doi: 10.1097/MOH.0000000000000621. PMID: 33177411; PMCID: PMC7769132.
- [241] Gudivada VN, Huang CJ, Luo YH, Dong GC. A Cyclic BMP-2 Peptide Upregulates BMP-2 Protein-Induced Cell Signaling in Myogenic Cells. *Polymers (Basel)*. 2021 Jul 31;13(15):2549. doi: 10.3390/polym13152549. PMID: 34372154; PMCID: PMC8347162.
- [242] Chavez MB, Tan MH, Kolli TN, Zachariadou C, Farah F, Mohamed FF, Chu EY, Foster BL. Bone Sialoprotein Is Critical for Alveolar Bone Healing in Mice. *J Dent Res*. 2023 Feb;102(2):187-196. doi: 10.1177/00220345221126716. Epub 2022 Nov 14. PMID: 36377066; PMCID: PMC9893390.
- [243] Kriegel A, Schlosser C, Habeck T, Dahmen C, Götz H, Clauder F, Armbruster FP, Baranowski A, Drees P, Rommens PM, Ritz U. Bone Sialoprotein Immobilized in Collagen Type I Enhances Bone Regeneration In vitro and In vivo. *Int J Bioprint*. 2022 Jul 12;8(3):591. doi: 10.18063/ijb.v8i3.591. PMID: 36105132; PMCID: PMC9469197.
- [244] Wang Z. Regulation of Cell Cycle Progression by Growth Factor-Induced Cell Signaling. *Cells*. 2021 Nov 26;10(12):3327. doi: 10.3390/cells10123327. PMID: 34943835; PMCID: PMC8699227.

8 Danksagung

In der elektronischen Version nicht enthalten.

9 Tabellarischer Lebenslauf

In der elektronischen Version nicht enthalten.

In der elektronischen Version nicht enthalten.