

**Aus der Klinik für Allgemeine, Unfall- und Wiederherstellungschirurgie**

**Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München**

**Direktor: Prof. Dr. med. Wolfgang Böcker**

**Evaluation der Wirkung eines  
BMP-7-beladenen Hydrogels im murinen  
intramedullären Injektionsmodell**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Lena Maria Mittlmeier

aus

München

2019

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Matthias Schieker

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Christoph Auernhammer  
Priv.-Doz. Dr. med. Stefan Grote

Mitbetreuung durch die  
promovierten Mitarbeiter: Priv.-Doz. Dr. med. Carl Neuerburg  
Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Attila Aszodi

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 14.02.2019

# Inhaltsverzeichnis

<b>I</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>I</b>
<b>II</b>	<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>III</b>
<b>III</b>	<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>IV</b>
<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Osteoporose-assoziierte Frakturen</b> .....	<b>1</b>
1.1.1	Definition der Osteoporose und pathophysiologische Aspekte.....	1
1.1.2	Die proximale Femurfraktur und Sekundärfrakturen bei Osteoporose .....	3
1.1.3	Konzepte der sekundären Frakturprävention.....	4
<b>1.2</b>	<b>Regenerative Therapieansätze</b> .....	<b>9</b>
1.2.1	Tissue Engineering und biokompatible thermosensitive Hydrogele als Trägersubstanzen .....	9
1.2.2	Das BDI-Hydrogel .....	10
1.2.3	Wirkung von BMP-7 .....	11
1.2.4	Klinische Einsatzgebiete der Bone Morphogenetic Proteins .....	13
<b>2</b>	<b>Ziele der Arbeit</b> .....	<b>14</b>
<b>3</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>16</b>
<b>3.1</b>	<b>Die Präparation des BDI-Hydrogels und Versuchsdurchführung</b> .....	<b>16</b>
<b>3.2</b>	<b>Ex-vivo Analyse der behandelten und nativen Femora</b> .....	<b>21</b>
3.2.1	Röntgentomographische Analyse der Mikroarchitektur .....	21
3.2.2	Präparataufbereitung und Bestimmung der Mineral apposition rate.....	27
3.2.3	Immunhistochemische Untersuchungen zur BMP-7-Expression im mineralisierten Knochen .....	29
3.2.4	Histologische Färbungen .....	29
<b>3.3</b>	<b>Statistische Auswertung</b> .....	<b>31</b>
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>32</b>
<b>4.1</b>	<b>Allgemeine Beobachtungen</b> .....	<b>32</b>
<b>4.2</b>	<b>Die Knochenmikroarchitektur im <math>\mu</math>-CT</b> .....	<b>32</b>
4.2.1	Quantitative Analyse des trabekulären Knochens .....	33
4.2.2	Quantitative Analyse des kortikalen Knochens .....	36
<b>4.3</b>	<b>Vergleich der unterschiedlichen Knochenregionen im <math>\mu</math>-CT</b> .....	<b>38</b>
<b>4.4</b>	<b>Ergebnisse der histologischen und immunhistochemischen Analysen</b> .....	<b>40</b>

<b>5 Diskussion</b> .....	<b>44</b>
<b>5.1 Diskussion der Methodik</b> .....	<b>44</b>
5.1.1 Das Tiermodell und die Wahl der Versuchsendpunkte .....	44
5.1.2 Die Wahl der BMP-7-Konzentration im BDI-Hydrogel .....	46
5.1.3 Die Untersuchungstechniken .....	47
<b>5.2 Bewertung der allgemeinen Beobachtungen</b> .....	<b>48</b>
<b>5.3 Diskussion der histomorphometrischen und immunhistochemischen         Ergebnisse</b> .....	<b>48</b>
<b>5.4 Diskussion der <math>\mu</math>-CT-Untersuchungen</b> .....	<b>48</b>
5.4.1 Unterschiede zwischen den verschiedenen Behandlungen .....	49
5.4.2 Einfluss der Zeit.....	51
5.4.3 Vergleich der unterschiedlichen Knochenregionen .....	51
<b>5.5 Klinische Relevanz und Ausblick</b> .....	<b>51</b>
<b>6 Zusammenfassung</b> .....	<b>54</b>
<b>7 Anhang</b> .....	<b>56</b>
<b>8 Literatur</b> .....	<b>81</b>
<b>9 Danksagung</b> .....	<b>89</b>
<b>10 Lebenslauf</b> .....	<b>90</b>
<b>11 Nachtrag</b> .....	<b>93</b>
<b>12 Eidesstattliche Versicherung</b> .....	<b>94</b>

# I Abkürzungsverzeichnis

$\mu$ -CT	Microcomputertomographie
$\mu$ m	Mikrometer
ANOVA	Analysis of variance
APES	3-Aminopropyltriethoxysilan
Aq. dest.	Aqua destillata
ASBMR	American Society for Bone and Mineral Research
B.Ar	Mean total crosssectional bone area
B.Ar/T.ar	Bone area / tissue area
BV/TV	Bone volume fraction / tissue volume fraction
BDI-Gel	Butandiisocynat-Gel
BMD	Bone mineral density
BMP(s)	Bone morphogenetic protein(s)
BV	Bone volume
CtTh	Cortical thickness
CtBMD	Cortical bone mineral density
DA	Degree of anisotropy
DIA	Diaphyse
DF	Distales Femur
DVO	Dachverband Osteologie
DXA	Dualröntgenabsorptiometrie
FDA	Food and Drug Administration
HE-Färbung	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
IOF	International Osteoporosis Foundation
KG	Körpergewicht
LWS	Lendenwirbelsäule
MAR	Mineral apposition rate
MG-Färbung	Masson-Goldner-Trichom-Färbung
MSCs	Mesenchymale Stammzellen
n.a.	nicht auswertbar
n.s.	nicht signifikant
Pluronic® P-123	[Poly(ethylenglycol)] <sub>n</sub> -[poly(propylenglycol)] <sub>m</sub> Block-Copolymer
PM	Proximale Metaphyse
PMMA	Polymethylmethacrylat

PTH	Parathormon
rhBMP-7	Rekombinantes humanes BMP-7
RIA	Reamer-Irrigator-Aspirator
ROI	Region of interest
SH	Schenkelhals
T.Ar	Mean total crosssectional tissue area
TbN	Trabecular number
TbBMD	Trabecular bone mineral density
TbSp	Trabecular separation
TbTh	Trabecular thickness
TBS	Tris buffered saline
TGF- $\beta$	Transforming growth factor beta
TV	Tissue volume
VOI	Volume of interest
WHO	Weltgesundheitsorganisation

## II Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b> Aufbau des Tierversuchs.....	18
<b>Abbildung 2:</b> Modifiziertes intramedulläres Injektionsmodell.....	20
<b>Abbildung 3:</b> Schematische Übersicht der untersuchten Femurregionen .....	23
<b>Abbildung 4:</b> Anatomische Landmarke im Bereich der distalen Wachstumsfuge .....	24
<b>Abbildung 5:</b> Regions of interest (ROI) im Bereich der Diaphyse .....	25
<b>Abbildung 6:</b> Bestimmung der Mineral apposition rate (MAR) .....	29
<b>Abbildung 7:</b> Vergleich der unterschiedlichen Knochenregionen.....	39
<b>Abbildung 8:</b> Masson-Goldner-Trichom-Färbung .....	41
<b>Abbildung 9:</b> Hämatoxylin-Eosin-Färbung.....	42
<b>Abbildung 10:</b> Immunhistochemischer Nachweis von BMP-7 .....	43

### III Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1:</b> Indikationen für eine medikamentöse Osteoporosetherapie .....	6
<b>Tabelle 2:</b> Indikation für eine spezifische medikamentöse Osteoporosetherapie .....	6
<b>Tabelle 3:</b> Indikationen zur Anhebung der Therapiegrenze in Tabelle 2 .....	7
<b>Tabelle 4:</b> Einstellungen der $\mu$ -CT und der Schnittbildanalyse .....	22
<b>Tabelle 5:</b> Knochenstrukturparameter im $\mu$ -CT .....	26
<b>Tabelle 6:</b> Kortikale Knochenstrukturparameter .....	26
<b>Tabelle 7:</b> Trabekuläre Knochenstrukturparameter .....	27
<b>Tabelle 8:</b> Quantitative Analyse des trabekulären Knochens auf der operierten rechten Seite im Bereich des Schenkelhalses - Vergleich nach Art der Behandlung und Dauer der Beobachtungszeit .....	61
<b>Tabelle 9:</b> Quantitative Analyse des trabekulären Knochens auf der nicht-operierten linken Seite im Bereich des Schenkelhalses - Vergleich nach Art der Behandlung und Dauer der Beobachtungszeit .....	62
<b>Tabelle 10:</b> Vergleich der operierten rechten Seite und der nicht-operierten linken Seite im Bereich des Schenkelhalses (trabekulär) .....	63
<b>Tabelle 11:</b> Quantitative Analyse des trabekulären Knochens auf der operierten rechten Seite im Bereich der proximalen Metaphyse - Vergleich nach Art der Behandlung und Dauer der Beobachtungszeit .....	64
<b>Tabelle 12:</b> Quantitative Analyse des trabekulären Knochens auf der nicht-operierten linken Seite im Bereich der proximalen Metaphyse - Vergleich nach Art der Behandlung und Dauer der Beobachtungszeit .....	65
<b>Tabelle 13:</b> Vergleich der operierten rechten Seite und der nicht-operierten linken Seite im Bereich der proximalen Metaphyse (trabekulär) .....	66
<b>Tabelle 14:</b> Quantitative Analyse des trabekulären Knochens auf der operierten rechten Seite im Bereich des distalen Femurs - Vergleich nach Art der Behandlung und Dauer der Beobachtungszeit .....	67
<b>Tabelle 15:</b> Quantitative Analyse des trabekulären Knochens auf der nicht-operierten linken Seite im Bereich des distalen Femurs - Vergleich nach Art der Behandlung und Dauer der Beobachtungszeit .....	68
<b>Tabelle 16:</b> Vergleich der operierten rechten Seite und der nicht-operierten linken Seite im Bereich des distalen Femurs (trabekulär) .....	69
<b>Tabelle 17:</b> Quantitative Analyse des kortikalen Knochens auf der operierten rechten Seite im Bereich des Schenkelhalses - Vergleich nach Art der Behandlung und Dauer der Beobachtungszeit .....	70
<b>Tabelle 18:</b> Quantitative Analyse des kortikalen Knochens auf der nicht-operierten linken Seite im Bereich des Schenkelhalses - Vergleich nach Art der Behandlung und Dauer der Beobachtungszeit .....	71



<b>Tabelle 19:</b> Vergleich der operierten rechten Seite und der nicht-operierten linken Seite im Bereich des Schenkelhalses (kortikal) .....	72
<b>Tabelle 20:</b> Quantitative Analyse des kortikalen Knochens auf der operierten rechten Seite im Bereich der proximalen Metaphyse - Vergleich nach Art der Behandlung und Dauer der Beobachtungszeit.....	73
<b>Tabelle 21:</b> Quantitative Analyse des kortikalen Knochens auf der nicht-operierten linken Seite im Bereich der proximalen Metaphyse - Vergleich nach Art der Behandlung und Dauer der Beobachtungszeit.....	74
<b>Tabelle 22:</b> Vergleich der operierten rechten Seite und der nicht-operierten linken Seite im Bereich der proximalen Metaphyse (kortikal) .....	75
<b>Tabelle 23:</b> Quantitative Analyse des kortikalen Knochens auf der operierten rechten Seite im Bereich der Diaphyse - Vergleich nach Art der Behandlung und Dauer der Beobachtungszeit.....	76
<b>Tabelle 24:</b> Quantitative Analyse des kortikalen Knochens auf der nicht-operierten linken Seite im Bereich der Diaphyse - Vergleich nach Art der Behandlung und Dauer der Beobachtungszeit.....	77
<b>Tabelle 25:</b> Vergleich der operierten rechten Seite und der nicht-operierten linken Seite im Bereich der Diaphyse (kortikal) .....	78
<b>Tabelle 26:</b> Vergleich der unterschiedlichen Knochenregionen (kortikal) .....	79
<b>Tabelle 27:</b> Vergleich der unterschiedlichen Knochenregionen (trabekulär).....	80

# 1 Einleitung

## 1.1 Osteoporose-assoziierte Frakturen

### 1.1.1 Definition der Osteoporose und pathophysiologische Aspekte

Osteoporose ist eine bedeutende Volkskrankheit, von der in Deutschland circa 6,3 - 7,8 Millionen Menschen betroffen sind (1-3). Die Osteoporose stellt im höheren Lebensalter die häufigste Erkrankung des Knochens dar und wird aufgrund des demografischen Wandels weiter an Bedeutung gewinnen (4). Bei weiblichen Patienten über 75 Jahren liegt die Prävalenz der Osteoporose bei circa 59,2% (2).

Als systemische Skeletterkrankung geht die Osteoporose mit einer veränderten knöchernen Mikroarchitektur und erniedrigten Knochenmasse einher, was zu einer unzureichenden Knochenfestigkeit mit konsekutiv erhöhtem Frakturrisiko führt (3, 5). Gemäß der Definition der Weltgesundheitsorganisation (WHO) von 1994 liegt eine Osteoporose vor, wenn nach Ausschluss anderer Ursachen der Mineralgehalt des Knochens in einer Dualröntgenabsorptiometrie (DXA)-Knochendichtemessung an der Lendenwirbelsäule und / oder am proximalen Femur um  $\leq -2,5$  Standardabweichungen vom Mittelwert einer 20 - 29-jährigen Frau abweicht (6, 7). Häufig wird die Erkrankung erst durch eine Fraktur bei einem ansonsten inadäquaten Trauma („low energy“ Fraktur) festgestellt (3). Wenn zusätzlich zur nachgewiesenen verminderten Knochendichte eine osteoporose-assoziierte Fraktur diagnostiziert wird, handelt es sich um eine manifeste Osteoporose. Diese kann zu einer eingeschränkten Lebensqualität sowie Lebenserwartung führen und mit einem großen Verlust an Selbstständigkeit einhergehen (8).

Generell unterscheidet man zwischen primärer und sekundärer Osteoporose, wobei sich diese Einteilung nach der Ursache der Erkrankung richtet. In 95% der Fälle handelt es sich um eine primäre Osteoporose, die auf einen postmenopausalen

Östrogenmangel (Typ I postmenopausale Osteoporose) oder auf ein hohes Lebensalter (Typ II senile Osteoporose) zurückzuführen ist (9). Die idiopathische Osteoporose tritt nur selten und dann bevorzugt bei jungen Menschen auf (9, 10). In 5% der Fälle liegt eine sekundäre Osteoporose vor, die durch eine endokrine Erkrankung, wie z.B. einen Hypogonadismus, einen Hyperkortisolismus, eine Hyperthyreose, aber auch durch Immobilisation, iatrogen oder im Rahmen eines Malabsorptionssyndrom auftreten kann (9, 10).

Als multifaktorielle Erkrankung ist die Osteoporose in hohem Maße durch Umwelt und Lebensweise determiniert (11). So stellen gemäß der Leitlinie des Dachverbandes Osteologie (DVO) unter anderem Nikotinabusus, eine geringe Sonnenlichtexposition, Untergewicht und eine Sturzneigung Risikofaktoren für das Auftreten einer Osteoporose dar (12, 13).

Zusammenfassend ist die Osteoporose eine multikausale Erkrankung, bei der unterschiedliche pathogenetische Mechanismen zusammenwirken (14) und die sowohl exogene als auch genetische Ursachen haben kann (11): Jede Störung des Knochenumbaus kann zu einem Knochenmasseverlustsyndrom führen, wobei auf zellulärer Ebene Osteoblasten und Osteoklasten, aber auch Mastzellen und Adipozyten sowie molekulare Faktoren wie Hormone, Transkriptionsfaktoren und Wachstumsfaktoren beteiligt sind (14).

### **1.1.2 Die proximale Femurfraktur und Sekundärfrakturen bei Osteoporose**

Bis zu 27% der Patienten, bei denen eine Osteoporose diagnostiziert wurde, erlitten bereits eine Fraktur (8). Ohne eine weitere medikamentöse Therapie besteht bei Patienten mit multiplen Frakturen ein Risiko von bis zu 85% innerhalb eines Jahres eine weitere Fraktur zu erleiden (8). Die proximale Femurfraktur stellt eine der häufigsten osteoporose-assoziierten Frakturen dar und ist häufig Folge einer bis zum Frakturereignis unbekanntem oder nicht therapierten Osteoporose (15). Unter dem Begriff der proximalen Femurfraktur werden Hüftkopffrakturen, mediale und laterale Schenkelhalsfrakturen sowie per- und subtrochantäre Frakturen zusammengefasst (16). In Deutschland liegt die Inzidenz einer proximalen Femurfraktur bei 90/100.000 Einwohnern (16). Das durchschnittliche Alter der Patienten liegt bei rund 80 Jahren, wobei in über 70% der Fälle das weibliche Geschlecht betroffen ist (17).

Gemäß der DVO-Leitlinie sind Ursache der osteoporotischen Schenkelhalsfraktur Minimaltraumata wie z.B. Stürze aus dem Stand oder geringer Sitzhöhe (12, 18). Bei Patienten mit einer proximalen Schenkelhalsfraktur werden in Abhängigkeit vom Geschlecht Mortalitätsraten zwischen 20% und 40% im ersten Jahr nach Fraktur angegeben, während die Klinikletalität circa 6% beträgt (16). Die vor der Fraktur vorhandene lokomotorische Kompetenz wird bei der Mehrheit der Patienten mit einer Hüftfraktur nicht wieder erreicht, was mit einem Verlust von Selbstständigkeit und ggf. auch einer Pflegebedürftigkeit einhergehen kann (3).

Es ist nachgewiesen, dass für Patienten mit einer osteoporose-assoziierten Femurfraktur das Risiko einer sekundären Fraktur auf der kontralateralen Seite zwischen 2,3% und 10,6% beträgt (19, 20). Zudem ist die Mortalitätsrate von Personen, die eine sekundäre kontralaterale Fraktur erlitten haben, nach einem Jahr signifikant höher als bei Personen, die von einer einseitigen Hüftfraktur betroffen waren und wird in der Literatur mit einem Wert bis zu 36% angegeben (20). Sawahla et al.

untersuchten 293 Patienten, die sich eine sekundäre Hüftfraktur auf der kontralateralen Seite zugezogen hatten und stellten fest, dass sich 70% dieser sekundären Femurfrakturen innerhalb von drei Jahren nach der initialen Femurfraktur ereigneten und in 2/3 der Fälle an der zur ersten Fraktur korrespondierenden anatomischen Lokalisation auftraten (21). Ansätze der sekundären Frakturprävention sollten daher zum Ziel haben dieser Entwicklung entgegenzuwirken.

### **1.1.3 Konzepte der sekundären Frakturprävention**

Osteoporose-assoziierte Hüftfrakturen sind aufgrund der alternden Gesellschaft von zunehmender Bedeutung. Leider treten diese Frakturen oft erst in einem fortgeschrittenen Stadium und bei fehlender Therapie der Grunderkrankung auf. So erhalten in Deutschland nur circa 11% der Patienten, die unter Osteoporose leiden, eine leitlinienkonforme Therapie (8).

Bei der Prävention osteoporotischer Femurfrakturen unterscheidet man gemäß DVO-Leitlinie zwischen einer nicht-medikamentösen und einer medikamentösen Präventionsform (12). Die nicht-medikamentöse Form beinhaltet Basismaßnahmen wie Förderung der körperlichen Aktivität sowie Verbesserung der Muskelkraft und Koordination (22). Weiterhin sollte jährlich durch gezielte Anamnese das Sturz- und Frakturrisiko eingeschätzt, Sturzursachen identifiziert und beseitigt werden und eine Medikamentenüberprüfung mit Abwägen des Nutzen-Risikoverhältnisses durchgeführt werden. Zu den Basismaßnahmen gehören weiterhin die Betrachtung des Lebensstils und der Ernährung. Nikotinkonsum und Untergewicht sollten vermieden und auf eine regelmäßige Zufuhr von Kalzium, Vitamin B12, Folsäure und Vitamin D geachtet werden. Gegebenenfalls bedarf es einer entsprechenden Supplementation (12, 23).

Bei postmenopausalen Frauen und Männern ab dem 60. Lebensjahr sollte darüber hinaus eine Basisdiagnostik durchgeführt werden. Diese schließt eine ausführliche

Anamnese sowie die Einleitung weiterer diagnostischer Schritte wie dem Osteoporose-Basislabor, einer Röntgenuntersuchung und der Osteodensitometrie ein. Diese Befunde führen dann ggf. zum Beginn einer medikamentösen Therapie (12, 24). Zusätzlich sollte mit den Patienten ein Maßnahmenkatalog zur Prävention von Frakturen erstellt werden, der unter anderem Aspekte wie das Tragen von festem Schuhwerk, Beleuchtung der Wohnung bei Nacht und eine altersgerechte Wohnungseinrichtung enthalten kann (7, 12).

Zusammenfassend können das nicht-medikamentöse Präventionskonzept und die Basismaßnahmen als interdisziplinäres geriatrisches Präventionskonzept angesehen werden, das auch nach einem Frakturereignis zur Prävention für Sekundärfrakturen greifen sollte (16).

Die International Osteoporosis Foundation (IOF) sieht infolge der steigenden Zahl primärer und sekundärer osteoporose-assoziiierter Frakturen bei entsprechender Indikation die Notwendigkeit durch medikamentöse Intervention ein weiteres Absinken der Knochendichte zu vermeiden (25). So soll das Ungleichgewicht zwischen vermehrtem Knochenabbau und verringerter Knochenbildung möglichst ausgeglichen werden. Die Indikation zur medikamentösen Osteoporosetherapie ist gegeben, wenn ein hohes 10-Jahres-Frakturrisiko für Wirbelkörperfrakturen und Frakturen des proximalen Femurs besteht. Das Geschlecht sowie das Alter, bereits zugezogene osteoporotische Frakturen, die Knochendichte sowie weitere individuelle Risikofaktoren müssen dabei einbezogen werden (7, 12). Die unterschiedlichen Indikationen für eine medikamentöse Therapie der Osteoporose sind in Tab. 1 aufgeführt. In Tab. 2 sind basierend auf dem T-Score Konstellationen ausgeführt, bei denen im Abhängigkeit vom Patientenalter ein 10-Jahresfrakturrisiko von 30% angenommen werden kann. Verschiedene Risikofaktoren für das Auftreten einer

Fraktur können singulär oder in Kombination zur einer Anhebung der Therapiegrenze führen (7) (Tab. 3).

**Tabelle 1: Indikationen für eine medikamentöse Osteoporosetherapie**

<p>1. Niedrigtraumatische singuläre Wirbelkörperfraktur 2. oder 3. Grades, bzw. multiple Wirbelkörperfrakturen 1. bis 3. Grades, wenn andere Ursachen einer Fraktur nicht wahrscheinlicher sind bei einem DXA T-Score &lt;-2,0 an der LWS (mittlerer T-Score der messbaren Wirbel L1-4), dem Schenkelhals oder dem Gesamtfemur, individuell auch bei einem T-Score &gt; -2,0 (Verwendung geschlechtsspezifischer T-Scores)</p> <p>2. Niedrigtraumatische proximale Femurfraktur bei einem DXA T-Score &lt;- 2,0 an der LWS oder dem Schenkelhals oder dem Gesamtfemur, individuell auch bei einem T-Score &gt; -2,0 (Verwendung geschlechtsspezifischer T-Scores)</p> <p>Bei typischen osteoporotischen radiologischen und / oder klinischen Aspekten von Wirbelkörperfrakturen bzw. Frakturen des proximalen Femurs kann abhängig von der klinischen Gesamtsituation auf eine Knochendichtemessung verzichtet werden.</p> <p>3. Bestehende oder geplante Therapie mit oralen Glukokortikoiden <math>\geq</math> 7,5 mg Prednisolonäquivalent täglich für &gt; 3 Monate, wenn</p> <p>a. T-Score <math>\leq</math> -1,5 an der LWS oder dem Schenkelhals oder dem Gesamtfemur, individuell auch wenn T-Score &gt; -1,5.</p> <p>b. Niedrigtraumatische Wirbelkörperfrakturen oder multiple periphere Frakturen unabhängig vom T-Score (ein endogenes Cushing-Syndrom ist äquivalent zu bewerten)</p> <p>4. Hohes 10-Jahresfrakturrisiko (circa &gt; 30% für radiographische Wirbelkörperfrakturen und proximale Femurfrakturen auf der Grundlage von Tab. 2, wenn T-Score &lt;-2,0 an der LWS, dem Schenkelhals oder dem Gesamtfemur ist.</p>
---

Adaptiert nach DVO-Leitlinie Osteoporose 2014 (12) und Harbeck et al. (7)

**Tabelle 2: Indikation für eine spezifische medikamentöse Osteoporosetherapie**

Lebensalter (Jahre)		T-Score von Mittelwert L1-L4, Femurhals und Gesamtfemur				
Frau	Mann	-2,0 bis -2,5	-2,5 bis -3,0	-3,0 bis -3,5	-3,5 bis -4,0	<-4,0
50-60	60-70	Nein	Nein	Nein	Nein	Ja
60-65	70-75	Nein	Nein	Nein	Ja	Ja
65-70	75-80	Nein	Nein	Ja	Ja	Ja
70-75	80-85	Nein	Ja	Ja	Ja	Ja
>75	>85	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja

Adaptiert nach DVO-Leitlinie Osteoporose 2014 (12) und Harbeck et al. (7)

**Tabelle 3: Indikationen zur Anhebung der Therapiegrenze in Tabelle 2**

<p><b>Anhebung der Therapiegrenze in Tab. 2 um + 1,0</b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>- Glukokortikoide oral <math>\geq 2,5</math> und <math>&lt; 7,5</math> mg Prednisolonäquivalent täglich</li><li>- Diabetes mellitus Typ I</li><li>- <math>\geq 3</math> niedrigtraumatische Frakturen in den letzten 10 Jahren im Sinne einer Einzelfallentscheidung (Ausnahme Finger-, Zehen-, Schädel- und Knöchelfrakturen)</li></ul>
<p><b>Anhebung der Therapiegrenze in Tab.2 um + 0,5</b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>- Singuläre Wirbelkörperfraktur 1. Grades</li><li>- Nichtvertebrale Frakturen <math>&gt; 50.</math> Lebensjahr (Ausnahme Finger-, Zehen-, Schädel- und Knöchelfrakturen)</li><li>- Proximale Femurfraktur bei Mutter oder Vater</li><li>- Multiple intrinsische Stürze</li><li>- Immobilität</li><li>- Rauchen, chronisch-obstruktive Lungenerkrankung und/oder hohe Dosen inhalativer Glukokortikoide</li><li>- Rheumatoide Arthritis</li><li>- Spondylitis ankylosans</li><li>- Herzinsuffizienz</li><li>- Protonenpumpeninhibitoren bei chronischer Einnahme</li><li>- Zöliakie</li><li>- Primärer Hyperparathyreoidismus</li><li>- Hormonablative Therapie oder Hypogonadismus beim Mann</li><li>- Aromatasehemmer</li><li>- Wachstumshormonmangel</li><li>- Hyperthyreose oder subklinische Hypothyreose, sofern persistent</li><li>- Subklinischer Hyperkortisolismus</li><li>- Glitazone Epilepsie/Antiepileptika</li><li>- Depression/Antidepressiva</li></ul>

*Adaptiert nach DVO-Leitlinie Osteoporose 2014 (12) und Harbeck et al. (7)*

Je nach individuellem Patientenprofil wird bei Vorliegen eines der in Tab. 1 aufgeführten Kriterien ein geeignetes Medikament ausgewählt, wobei zwischen Medikamenten zur Hemmung der Osteoklasten (Knochenresorption) und zur Stimulation der Osteoblasten (Knochenbildung) unterschieden wird (7).

Zudem gilt nach einem Frakturereignis des proximalen Femurs die Einhaltung der o.g. Basismaßnahmen in Verbindung mit einer nicht-medikamentösen oder medikamentösen Therapie zur Prävention einer Sekundärfraktur. Schließlich ist das Vorliegen einer Fragilitätsfraktur der stärkste Risikofaktor für die Entstehung weiterer Frakturen (26).

Die primäre Fraktur sollte zügig operativ behandelt werden, sofern eine Operation innerhalb von 24 Stunden nach Frakturereignis nicht durch Multimorbidität und laufender Antikoagulation verhindert wird (17). Für ein gutes ‚Outcome‘, das auch die



Prävention von Sekundärfrakturen einschließt, sollten nach der initialen Hüftfraktur auch die typischen postoperativen Risiken wie Lungenembolie, Pneumonie, Katheter-assoziierte Harnwegsinfekte und eine tiefe Beinvenenthrombose durch eine rasche Mobilisation mit Vollbelastung reduziert werden (17). Anschließend sollten physio- und ergotherapeutische Maßnahmen mit Anleitung zur Selbsthilfe unter Einbindung des sozialen Umfeldes eine rasche Rückkehr in das häusliche Umfeld ermöglichen. Die Empfehlung einer Osteoporose-Therapie im Entlassungsbrief des Unfallchirurgen erhöht zudem die Therapieraten (27). Am effektivsten scheint jedoch die Initiierung der Osteoporosetherapie direkt im Krankenhaus, da es dadurch zur einer signifikanten Erhöhung der Complianceraten kommt (26).

Die Etablierung von „fracture liaison services“, bei denen geriatrische Patienten osteologisch mitbehandelt werden, hat eine Verbesserung der medikamentösen Osteoporosetherapie, der Lebensqualität und der Verhinderung bzw. Reduktion von sekundären Frakturen zum Ziel (26, 28).

Diese Ausführungen zeigen, dass es durchaus Möglichkeiten zur Frakturprophylaxe bei Osteoporose-Patienten gibt. Dennoch setzen diese Präventionsmaßnahmen eine strikte Einhaltung der medikamentösen / nicht-medikamentösen Therapien voraus, was gerade vor dem Hintergrund von Begleiterkrankungen wie Demenz bei den überwiegend geriatrischen Patienten leider oftmals nicht gewährleistet ist (29).

Der experimentelle Ansatz von Fliri et al. zielt daher auf die prophylaktische Stabilisierung der Gegenseite mit PMMA während der Behandlung der initialen osteoporosebedingten Fraktur des proximalen Femurs ab, da dadurch rasch eine Verstärkung der noch nicht-frakturierten Seite gegeben werden könnte (19). Oben genannte Probleme wie Non-Compliance könnten dadurch eventuell in den Hintergrund rücken. Eine Substanz, die biokompatibel ist und sich eventuell sogar osteoinduktiv präsentiert, würde jedoch gegebenenfalls ein höheres biologisches

Potential zur Prävention osteoporosebedingter sekundärer Frakturen aufweisen als PMMA.

## **1.2 Regenerative Therapieansätze**

### **1.2.1 Tissue Engineering und biokompatible thermosensitive Hydrogele als Trägersubstanzen**

Tissue Engineering zielt als interdisziplinäres Forschungsgebiet darauf ab durch die Kombination von Stammzellen mit einer geeigneten Trägersubstanz und Wachstums- bzw. Differenzierungsfaktoren Geweberegeneration und -bildung zu fördern und Gewebedefekte zu minimieren (30, 31). Ziel ist es, den funktionellen und physiologischen Zustand erneut bzw. annähernd wiederherzustellen. Das Trägermaterial dient dabei als Leitstruktur, um die bioaktiven Substanzen und Zellen am gewünschten Wirkungsort zu halten und die lokale Proliferation der Zellen zu ermöglichen (32, 33).

Für den Einsatz solcher Leitstrukturen im Rahmen des Tissue Engineering zur Behandlung von Knochendefekten gibt es zwei Ansätze:

- 1) Verwendung zellbesiedelter Gerüste („scaffolds“), die sowohl *in vitro* wie auch *in vivo* die Neubildung von Knochen unterstützen
- 2) Verwendung zellfreier Gerüste, die *in vivo* als Trägersubstanzen für einwachsende Zellen aus der Umgebung dienen (33, 34).

Die Materialien, die als Trägersubstanzen *in vivo* fungieren sollen, werden an ihrer Biokompatibilität, Osteokonduktivität, -genität und -induktivität gemessen. Während die Biokompatibilität Aussagen über die Verträglichkeit mit biologischen Materialien erlaubt, beschreibt die Osteokonduktivität die Fähigkeit als Leitstruktur für Zellen oder einwachsendes Gewebe zu fungieren. Osteogen sind Gewebe oder Zellen, die durch Aktivierung von Osteoblasten die Knochenbildung fördern. Osteoinduktive Substanzen

stimulieren die Osteogenese durch Aktivierung der Signalkaskaden, die zur Bildung von neuem Knochen führen. (34, 35).

Ideale Leitstrukturen sind immunologisch inert, wirken osteoinduktiv und können in ihrer Geometrie / Form individuell an den Wirkungsort angepasst werden. Gerade vor dem Hintergrund eines möglichen klinischen Einsatzes sollte die Reaktion auf mechanischer Kraft (im Sinne einer primären Stabilität) sowie die Auswirkung externer Einflüsse wie Sterilisation, Lagerbarkeit und kostengünstige Herstellung bedacht werden (34).

Einen bedeutenden Anteil der Trägersubstanzen stellen biokompatible, thermosensitive Hydrogele dar (36). Der Begriff „thermosensitiv“ bezeichnet die durch minimale Temperaturänderungen hervorgerufenen Veränderungen der chemischen, mechanischen oder physikalischen Eigenschaften eines Polymers. Der Vorteil an dieser Form von Hydrogelen ist, dass sie in gekühlter Form minimal-invasiv appliziert werden können, aber bei Ansteigen der umgebenden Temperatur (z.B. bei Applikation in den menschlichen Körper) aushärten (37).

Thermosensitive Hydrogele, die bis zu 99% aus flüssigen Bestandteilen sowie einem hydrophilen Blockcopolymer bestehen, können in positiv-sensitive Hydrogele mit einer „upper critical solution temperature“ und negativ-sensitive Hydrogele mit einer „lower critical solution temperature“ eingeteilt werden. Während positiv-sensitive Hydrogele beim Überschreiten des oberen Grenzwertes gelieren, verhalten sich die negativ-sensitiven Hydrogele in gegensätzlicher Art und Weise; sie härten bei Unterschreitung der unteren Temperaturgrenze aus (37).

### **1.2.2 Das BDI-Hydrogel**

Für den Einsatz als Trägermaterialien stellen thermosensitive Hydrogele einen vielversprechenden Ansatz dar: Im Hinblick auf eine potentielle spätere klinische Anwendung ist die Verwendung thermosensitiver Hydrogele durch das Umgehen von

offenen chirurgischen Eingriffen, z.B. zum Beheben eines knöchernen Defekts, attraktiv (38).

Unsere Arbeitsgruppe hat in Kooperation mit der PolyMaterials AG (Kaufbeuern, Deutschland) und der LivImplant GmbH (Starnberg, Deutschland) ein Hydrogel entwickelt, das bei Raumtemperatur flüssig ist und bei Körpertemperatur (37°) geliert. Das auf der Basis des Blockcopolymers Pluronic® P123 beruhende Butandiisocyanat-Gel (BDI-Gel) gehört zu den positiv-sensitiven Hydrogelen und ist ein ideales Trägermaterial für Stammzellen, aber auch für osteoinduktive Proteine wie den bone morphogenetic proteins (BMPs); es nimmt selbst keinen Einfluss auf die osteogene Differenzierung inkorporierter Zellen und kann im Organismus schnell und rückstandsfrei abgebaut werden (37). *In vivo*-Untersuchungen am Bohrlochdefektmodell im distalen Femur der athymen Ratte bestätigten die Biokompatibilität des BDI-Hydrogels. Das Gel zeigte zudem das erwartete thermosensitive Verhalten, indem es direkt nach Implantation in den Defekt durch Erwärmung gelierte (37).

Weiterhin zeigten die in unserer Arbeitsgruppe durchgeführten *in vitro*-Arbeiten, dass der Wachstumsfaktor BMP-7 kontinuierlich über einen Zeitraum von 38 Tagen aus dem BDI-Hydrogel freigesetzt wird (Dr. rer. nat. Ines Westphal, LMU München; unveröffentlichte Daten).

### **1.2.3 Wirkung von BMP-7**

Für eine Vielzahl von Wachstumsfaktoren konnte eine Beteiligung an der Knochenneubildung bzw. Frakturheilung nachgewiesen werden. In diesem Prozess spielen bone morphogenetic proteins (BMPs) eine tragende Rolle. Die Proteine gehören zur „transforming growth factor beta“ (TGF- $\beta$ )-Familie und wurden in den 1960er Jahren von Marshall Urist entdeckt (39). Urist beobachtete, dass die Implantation von entmineralisiertem Knochen zu einer ektopen Knochenneubildung

führen kann; er konnte anschließend ein Protein als ursächlichen Faktor dieses Prozesses identifizieren, das er als „bone morphogenetic protein“ bezeichnete (40). Inzwischen werden mehr als 20 verschiedene BMPs unterschieden (41), die anhand ihrer Aminosäuresequenz und ihrer Funktionen in vier Untergruppen kategorisiert werden (39). Die BMPs nehmen eine entscheidende Rolle während der Skelettogenese ein (42) und gelten als wichtige Regulatoren der Knochenbildung und -erneuerung, da sie mesenchymale Stammzellen (MSCs) zur Differenzierung in Zellen der osteoblastären Zellreihe stimulieren (43). Insbesondere BMP-2, BMP-4, BMP-6, BMP-7 und BMP-9 werden eine osteoinduktive Wirkung zugeschrieben (41).

Im Gegensatz zum nachgewiesenen Effekt dieser BMPs auf die Osteoblastogenese ist die Modulation der osteoklastären Differenzierung durch BMPs noch nicht gut erforscht (42). Einige klinische Studien zeigten eine erhöhte, nicht erwünschte Knochenresorption, sodass man auch von einem Einfluss auf die Osteoklastendifferenzierung und -aktivierung durch BMPs ausgehen kann (42). Während man bei Krankheiten, die mit einer vermehrten Knochenmasse einhergehen, eine Überaktivität des BMP-Signalwegs vermutet, konnte sowohl bei Patienten mit Osteoporose als auch in osteoporotischen Mausmodellen eine verminderte Bioverfügbarkeit von BMPs festgestellt werden (42). Diese Beobachtungen werden mit der bei Osteoporose typischen reduzierten Ausschüttung von BMP-induzierenden Hormonen wie dem Parathormon (PTH) oder Östrogen in Verbindung gebracht (42). Tsuji et al. zeigten im Mausmodell, dass ein Verlust von BMP-2 zu einem Phänotyp ähnlich dem der Osteoporose führt (42, 44). Ebenso bewirkt die Überexpression von BMP-Antagonisten wie Noggin oder Gremlin Osteopenien und spontanen Frakturen (42, 45). Interessanterweise konnte zudem in humanen Osteoporosepräparaten eine Hochregulation von BMP-Inhibitoren festgestellt werden (42).

#### **1.2.4 Klinische Einsatzgebiete der Bone Morphogenetic Proteins**

Für BMP-7 liegt eine Zulassung bei tibialen Non-union-Frakturen und posterolateralen lumbalen spinalen Fusionen vor, während für BMP-2 von der FDA eine Zulassung für spinale Cages und offene Tibiafrakturen sowie für Knochenrekonstruktionen im oromaxillofaszialen Bereich besteht (35, 46).

BMP-7 kann bei Rezidivpseudarthrosen im Bereich der Tibia verwendet werden (35). Im Rahmen des Diamant-Konzeptes erfolgt die klinische Anwendung mit autologen Stammzellen aus Spongiosaknochen oder mit RIA (Reamer-Irrigator-Aspirator) (35). Die Indikation zur Anwendung von BMP-2 und BMP-7 bei Pseudarthrosen ist gegeben, wenn Knochendefekte > 2 cm vorliegen, die Therapie mit autologem Knochenmaterial versagt sowie eine fulminante Weichteilschädigung besteht (35, 39). Aufgrund der kurzen Halbwertszeit von BMP-7 und BMP-2 müssen hohe Dosen (circa 40 mg) appliziert werden (35, 39), um eine therapeutische Dosis zu erzielen. Diese hohen Dosen können wiederum zu Nebenwirkungen führen (35). Darüber hinaus ist noch unklar, welcher Wachstumsfaktor in welcher Konzentration bei Knochendefekten verwendet werden sollte (35). Einige Studien zeigen, dass Schwellungen und Serombildungen zunehmen. Ebenso werden anaphylaktische Reaktionen, osteolytische Prozesse und ein erhöhtes Infektrisiko beschrieben (35, 39, 47-50). Diese Nebenwirkungen führen zu der Forderung nach Drug-delivery-Systemen, die kontinuierlich und kontrolliert geringe Mengen Wachstumsfaktoren abgeben, um die Knochenbildung zu stimulieren, so gegebenenfalls zu einer erhöhten biologischen Aktivität führen (35) und im osteoporotischen Knochen osteoinduktiv wirken.

## 2 Ziele der Arbeit

Aufgrund der demographischen Entwicklung unserer alternden Gesellschaft wird die Inzidenz Osteoporose-assoziiierter Frakturen zunehmen und die proximale Femurfraktur stellt eine der häufigsten Frakturtypen mit hohem Risikopotenzial in diesem Zusammenhang dar. Das Hauptziel der Osteoporosetherapie sollte die Sicherung einer hohen Lebensqualität sein. Dazu gehört auch die Prävention von Sekundärfrakturen der kontralateralen Seite. Medikamentöse Therapien in Kombination mit nicht-medikamentösen Therapien sind derzeit das Mittel der Wahl. Dennoch wären auch andere Präventionsmöglichkeiten denkbar, da systemische Therapieansätze zur Behandlung der Osteoporose bei multimorbiden oder geriatrischen Patienten aufgrund der Einnahme-Compliance sich oft problematisch darstellen. Eine prophylaktische Verstärkung der kontralateralen Femurseite während der Operation der initialen Fraktur könnte für betroffene Patienten von Nutzen sein. Nicht zuletzt könnten neuartige Maßnahmen zur Prävention von sekundären Frakturen eventuell zu einer Senkung der Kosten im Gesundheitswesen führen, die in den USA auf aktuell 8 Milliarden Dollar geschätzt werden (19).

Die Anwendung eines biokompatiblen, thermosensitiven Hydrogels könnte wesentliche Vorteile eines kontinuierlichen Releases von Wachstumsfaktoren mit sich bringen. Das Hydrogel passt sich ideal an physiologische Umstände an und ermöglicht in der Praxis eine einfache Handhabung, indem es minimal-invasiv appliziert werden kann. Nach bisherigen *in vivo*-Testungen entfaltet das Hydrogel selbst keine Eigenwirkung im Knochengewebe (37). Das als Wachstumsfaktor angewandte BMP-7 ist für den Einsatz im Menschen zugelassen und weist ein osteoinduktives Potential auf (35, 41).

Zur Abschätzung eines möglichen präventiven Potentials sollte daher in dem vorliegenden Versuch im Mausmodell untersucht werden, ob die Kombination des BDI-Hydrogels mit dem Wachstumsfaktor BMP-7 und eine Applikation *in vivo* möglich ist. Das Gel dient dabei als Trägermaterial und Speicher für das Wachstumsprotein. Da diese Kombination bisher noch nicht *in vivo* untersucht wurde, war es das primäre Ziel, die Biokompatibilität der Kombination sowie die Funktionalität des von uns gewählten Tiermodells zu überprüfen.

Folgende Fragestellungen sollten dabei beantwortet werden:

- 1) Ist das von uns gewählte Tiermodell geeignet, um das mit BMP-7 beladene BDI-Hydrogel zu testen?
- 2) Ist die Kombination von BMP-7 und dem BDI-Hydrogel biokompatibel?
- 3) Können durch das Modell schwere Nebenwirkungen, lokaler oder systemischer Art detektiert werden?
- 4) Zeigt sich in der gesunden Maus ein osteoinduktives Potential der Kombination von BMP-7 und BDI-Hydrogel bei intramedullärer Applikation?
- 5) Könnte ein biokompatibles Hydrogel beladen mit Wachstumsfaktoren wie BMP-7 in der Zukunft eine Option darstellen, um sekundäre osteoporotische Frakturen des proximalen Femurs - im Sinne einer prophylaktischen Verstärkung des Knochens - zu vermeiden?
- 6) Bedingungen, um Fragestellung 5) zu klären.



### **3 Material und Methoden**

Die in diesem Abschnitt aufgeführten Arbeiten wurden im ExperiMed Labor der Chirurgischen Klinik und Poliklinik der LMU München, im Forschungslabor der AG für Experimentelle Pädiatrie der Universitätsmedizin Rostock und am Institut für Experimentelle Chirurgie der Universitätsmedizin Rostock durchgeführt.

Grundchemikalien wurden von den Firmen Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland oder Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland bezogen und hatten in der Regel mindestens p.a.-Qualität. Die Lösungen wurden mit deionisiertem Wasser angesetzt (Ionenaustauscher Destillo 20).

#### **3.1 Die Präparation des BDI-Hydrogels und Versuchsdurchführung**

Der Tierversuch wurde unter dem Aktenzeichen 55.2-1-54-2532-149-13 von der zuständigen Aufsichtsbehörde (Regierung von Oberbayern) genehmigt.

##### *a) Präparation des BDI-Hydrogels:*

1 g des autoklavierten Polymers (Livlplant GmbH, Starnberg, Deutschland) wurde unter aseptischen Bedingungen in 9 ml Medium (Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland) drei Tage vor Versuchsbeginn aufgelöst, bei 4° C gelagert und bis zum Einsatz einmal pro Tag umgerührt (37). Am Versuchstag wurde das Hydrogel mit rhBMP-7 (Olympus Biotech, Mt Waverley, Victoria, Australia) beladen. Die Konzentration betrug 100 µg/ml rhBMP-7 und wurde unter Berücksichtigung der Ergebnisse von Zara et al. ausgewählt (51). Bis zur Applikation wurde das BDI-Hydrogel auf Eis gelagert.

##### *b) Durchführung des Tierversuchs:*

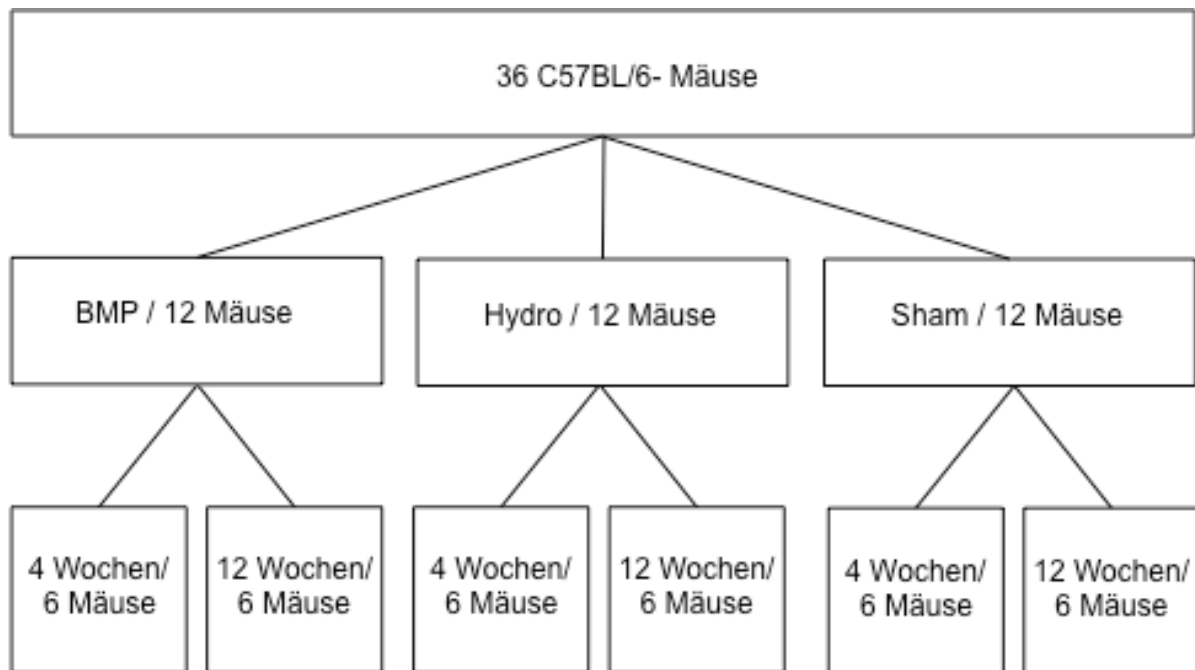
Für die *in vivo*-Testung wurden 36 ausgewachsene, männliche C57BL/6-Mäuse im Alter von 6 Monaten (26,4 g - 32,5 g) verwendet (Firma Charles River Laboratories, Sulzfeld, Deutschland) und in den Räumen der Zentralen Versuchstierhaltung des

Klinikums der Universität München, Campus Innenstadt (LMU) unter SPF I - Bedingungen (Temperatur 20-22°C, 12/12-Tag-Nacht-Rhythmus) gehalten. Alle Tiere hatten uneingeschränkten Zugang zu Futter (Alleinfutter für Zuchtmäuse, Ssniff, Soest, Deutschland) und Wasser, wobei die aufgenommene Futtermenge jeden Tag kontrolliert wurde. Die Trinkflaschen und Käfige wurden zweimal wöchentlich gereinigt bzw. gewechselt. Nach einer Akklimatisationszeit von 2 Wochen wurde mit dem Versuch begonnen.

Vor der Operation wurden die Versuchstiere in folgende Gruppen randomisiert:

- A) Tiere, denen 10 µl Hydrogel + BMP-7 (100 µg/ml) appliziert wurden (BMP-Gruppe; BMP)
- B) Tiere, denen 10 µl reines Hydrogel appliziert wurden (Hydrogel-Gruppe; Hydro)
- C) Tiere, denen intramedullär 10 µl steriles NaCl appliziert wurden (Sham-Gruppe; Sham)

Pro Gruppe (A-C) ergab sich damit eine Anzahl von 12 Tieren. Die verschiedenen Gruppen wurden entweder einer Versuchsdauer von 1.) 4 Wochen oder 2.) 12 Wochen zugeteilt, sodass sich insgesamt 6 Gruppen ergaben (Abb. 1). Bei allen Tieren wurde die rechte hintere Extremität operiert.



**Abbildung 1: Aufbau des Tierversuchs**

Im Rahmen des operativen Eingriffs wurde den Mäusen eine Identifizierungsnummer zugewiesen und nach Eintreten der Anästhesie eine Ohrmarkierung zur eindeutigen Identifizierung durchgeführt. Die Injektionsnarkotika, ein Gemisch aus Fentanyl (0,05 mg/kg KGW; Janssen GmbH, Neuss, Deutschland), Midazolam (5 mg/kg KGW; Roche, Reinach, Schweiz) und Medetomidin (0,5 mg/kg KGW; Orion Corporation, Espoo, Finnland) wurde den Tieren intraperitoneal appliziert. Nach dem Einschlafen wurden zunächst die Augen mit einer Augensalbe (Bepanthen Augen- und Nasensalbe, Bayer, Leverkusen, Deutschland) geschützt. Es folgte die einmalige Gabe von Clindamycin (45 mg/kg KGW; Ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland). Anschließend wurde die rechte hintere Extremität rasiert und ausgiebig desinfiziert. Das Tier wurde für die Dauer des Eingriffs auf einer Wärmeplatte (Beurer, Ulm, Deutschland) in Rückenlage positioniert, die Sauerstoffzufuhr erfolgte über einen vor der Schnauze fixierten Schlauch. Die Mäuse wurden steril abgedeckt. Nach ausreichender Anästhesietiefe wurde mit einem Skalpell (Aesculap AG, Tuttlingen, Deutschland) eine 5 mm Hautinzision anterolateral über dem distalen Femur sowie der

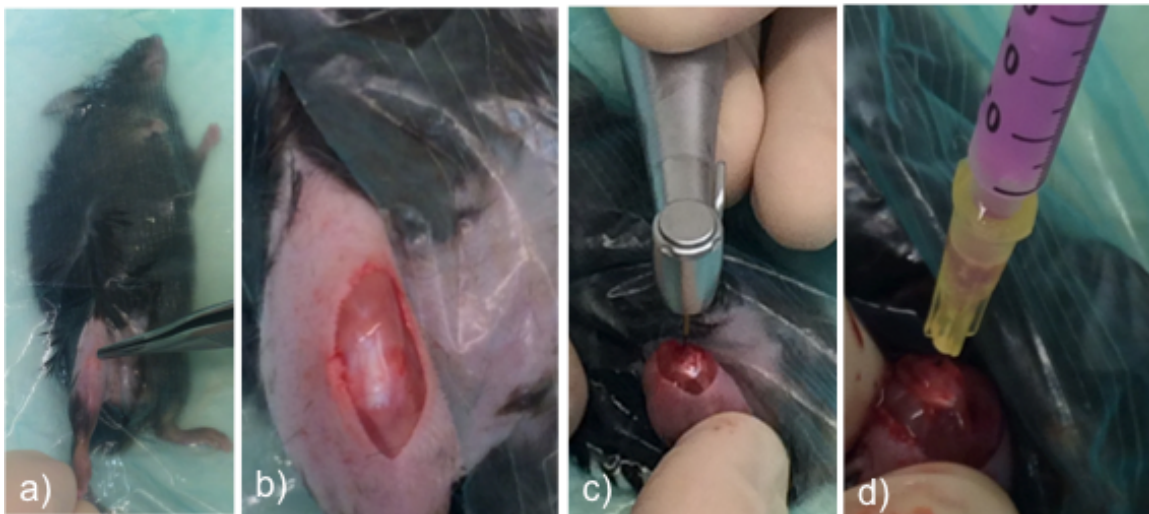
Kniegelenksregion durchgeführt. Die weiteren Schritte erfolgten nach der Empfehlung der intramedullären Injektion von Zilber et al. und sind in der Abb.2 dargestellt (52). Wir erweiterten und modifizierten dieses Modell: Nachdem die Patellarsehne durch die Hautinzision sichtbar gemacht worden war, folgte die Darstellung des lateralen Anteils des Femurschaftes ohne Durchtrennung von Sehnen oder Bändern. Die intramedulläre Injektion (Volumen: circa 10 µl (52)) erfolgte durch die Patellarsehne unter Benutzung einer 29 G – Nadel (Terumo Medical Corporation, Somerset, USA), nachdem mit einem Dentalbohrer (Winkelstück WS-56 E: W&H Group, Bürmoos Österreich; Pinlochbohrer: Komet Dental, Lemgo, Deutschland) durch die Patellarsehne sowie die Kortikalis zwischen den Kondylen des distalen Femurs ein entsprechendes Loch gebohrt worden war (52). Es folgte eine retrograde Injektion der Prüfsubstanz entsprechend der Gruppenzugehörigkeit, dabei wurde die 29 G-Nadel bis zum Bereich des proximalen Femurs vorgeschoben. Nach Rekonstruktion der tiefen Muskulatur wurde im Anschluss die Haut mit einer 4-0 Ethilon-Naht (Ethicon, Sommerville, USA) verschlossen. Um eine ausreichende Analgesie nach dem Aufwachen zu gewährleisten, wurde den Tieren noch in Narkose 0,1 mg/kg Buprenorphin (Reckitt Benckiser, Mannheim, Deutschland) subkutan injiziert. Diese Analgesie wurde bis zum 3. postoperativen Tag zweimal täglich wiederholt.

Die Antagonisierung der Narkose erfolgte durch die subkutane Injektion von 0,2 ml Kochsalzlösung (0,9% NaCl) mit Naloxon (1,2 mg/dl KGW; Inresa Arzneimittel GmbH, Freiburg im Breisgau, Deutschland), Flumazenil (0,5 mg/kg KGW; Roche, Reinach, Schweiz) und Atipamezol (2,5 mg/kg KGW; Pfizer, Deutschland, Berlin). Dies ermöglichte ein schonendes Aufwachen aus der Narkose. Bis zum Erwachen wurden die Mäuse unter einer Wärmelampe positioniert. Nach der Operation und am 1.-3. postoperativen Tag wurde den Mäusen zur Analgesie zusätzlich Metamizol-haltiges

Trinkwasser (20 Tropfen auf 500 ml Wasser; Ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland) angeboten, das täglich erneuert wurde.

5 und 2 Tage vor dem jeweils geplanten Versuchsende erfolgte die intraperitoneale Applikation von 100 µl Calceinlösung (5 mg/ml Calcein in 0,15 M NaCl/2% NaHCO<sup>3</sup>, Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland) vor dem Hintergrund einer folgenden Auswertung mittels Fluoreszenzmikroskopie.

Am Ende des Beobachtungszeitraums wurden die Versuchstiere mit Kohlendioxid euthanasiert und die beiden hinteren Extremitäten entnommen. Die Femora wurden von den Tibiae getrennt und von umliegendem Bindegewebe sowie Muskulatur freipräpariert. Die Femora wurden nach Entnahme in Formalin (10%, 24 h, 4°C; PathoMed Logistik GmbH, Viersen, Deutschland) fixiert, anschließend in 70% Ethanol (24 h, 4°C) und schließlich für die Langzeitkonservierung in 80% Ethanol überführt und in diesem Medium bis zur weiteren Analyse bei 4° C gelagert.



**Abbildung 2: Modifiziertes intramedulläres Injektionsmodell**

a) Operationssitus; b) Darstellung der Patellarsehne; c) Eröffnen der Kortikalis mit einem Dentalbohrer; d) Applikation des Augmentationsmaterials

### **3.2 Ex-vivo Analyse der behandelten und nativen Femora**

Die Längen der vollständig von Muskulatur und Bindegewebe freipräparierten Femora wurden mit einer Schieblehre gemessen (Caput femoris bis zur Fossa intercondylaris). Von jeder Maus wurde die Mikroarchitektur beider Femora mittels  $\mu$ -Computertomographie ( $\mu$ -CT) bestimmt, das nicht behandelte kontralaterale Femur diente dabei als Kontrolle. Aus jeder der sechs Gruppen wurden randomisiert jeweils zwei Femurpaare in Methylmethacrylat bzw. nach Entkalkung in Paraffin eingebettet.

#### **3.2.1 Röntgentomographische Analyse der Mikroarchitektur**

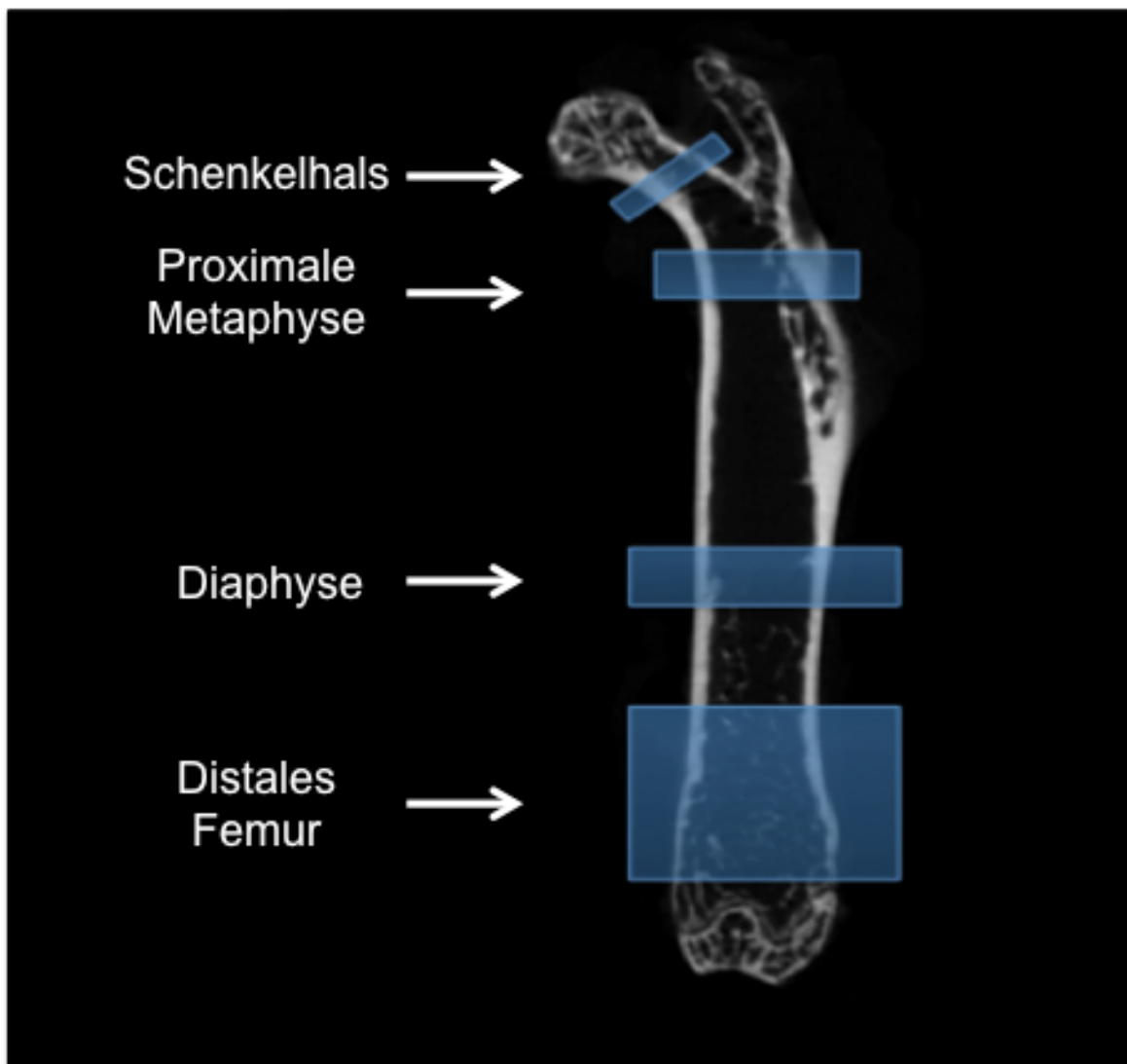
Vor der Analyse im  $\mu$ -CT wurden die Femora aus der Alkohollösung entnommen und zur Rehydratation über einen Zeitraum von 24 h in 0,9% Kochsalzlösung bei 4°C gelagert. Anschließend wurde der Knochen in Frischhaltefolie gewickelt und in einem Polypropylenröhrchen fixiert, um einem Austrocknen und Bewegungsartefakten entgegenzuwirken. Die Röhrchen wurden in Styroporformen auf dem Probenhalter positioniert und im  $\mu$ -CT (SkyScan 1076 micro-CT, Firma Bruker, Antwerpen, Belgien) (53, 54) untersucht. Die Einstellungen des Scanvorgangs und der danach folgenden Rekonstruktion mit quantitativen Analysen können Tab. 4 entnommen werden. Die Schnittbilder wurden mit der zum Gerät dazugehörigen Software (NRecon Version 1.6.6.0, Bruker, Antwerpen, Belgien) rekonstruiert und nach Definition des volume of interest (VOI) quantitativ analysiert (CTAn, Bruker, Antwerpen, Belgien). Zur Kalibrierung wurden zwei Proben mit bekannter Größe und Mineraldichte (Knochenphantome) unter den gleichen Bedingungen untersucht.

**Tabelle 4: Einstellungen der  $\mu$ -CT und der Schnittbildanalyse**

<b>Aufnahme</b>	
X-ray	48 kV/200 $\mu$ A
Filter	0.5 mm Al
pixel size	9 $\mu$ m
pixel matrix	4000 x 2672 pixel
rotation step	0.6°
frame averaging	3
<b>Rekonstruktion</b>	
defect pixel masking	20%
beam hardening	30%
misalignment compensation	calculated individually
<b>Analyse</b>	
tresholding of gray values	
cortical bone	100 – 255
trabecular bone	85 – 255
removal of white speckles	< 30 voxel

**Festlegung der volume of interests (VOIs):**

Für jeden Knochen wurden die zu analysierenden Bereiche (VOIs) definiert, die anhand anatomischer Landmarken festgelegt wurden und deren Auswertung nach einem einheitlichem Protokoll erfolgte (53). Im Folgenden sind die Größe (in „slices“) und die Landmarken der jeweiligen Region aufgeführt. Abb. 3 stellt eine schematische Übersicht der im  $\mu$ -CT untersuchten Knochenregionen dar.



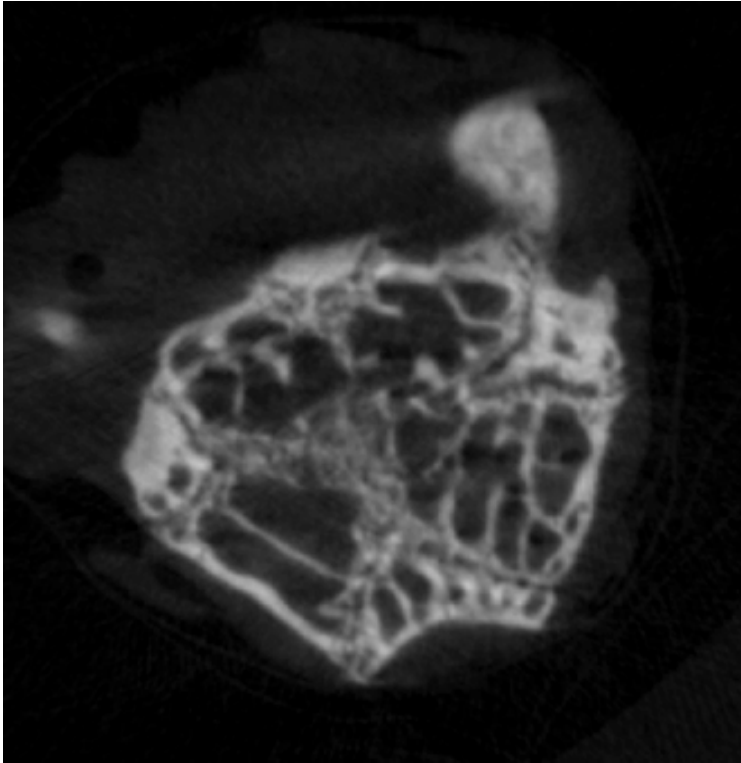
**Abbildung 3: Schematische Übersicht der untersuchten Femurregionen**

Während in den Regionen „Proximale Metaphyse“ und „Schenkelhals“ sowohl der kortikale als auch der trabekuläre Knochen betrachtet wurde, wurde die Auswertung im Bereich „Diaphyse“ auf den kortikalen Knochen beschränkt. In der Region „Distales Femur“ wurde lediglich der trabekuläre Knochen analysiert.

- Distales Femur: Die Referenzlinie stellte die distale Wachstumsfuge dar. Die nach der Rekonstruktion vorliegenden Transversalschnitte wurden ausgehend vom distalen Knochenende betrachtet und im trabekulären Knochen das erstmalige Auftreten einer knorpeligen Brücke, die den Beginn der Wachstumsfuge definiert, abgewartet (siehe Abb. 4). Ausgehend von dieser



Landmarke wurde ein Puffer („offset“) von 50 Einzelschnitten („slices“) nach proximal gewählt, bevor ab dem 51. Einzelschnitt (von der distalen Wachstumsfuge) eine Auswertung über 300 Einzelschnitte erfolgte (53).



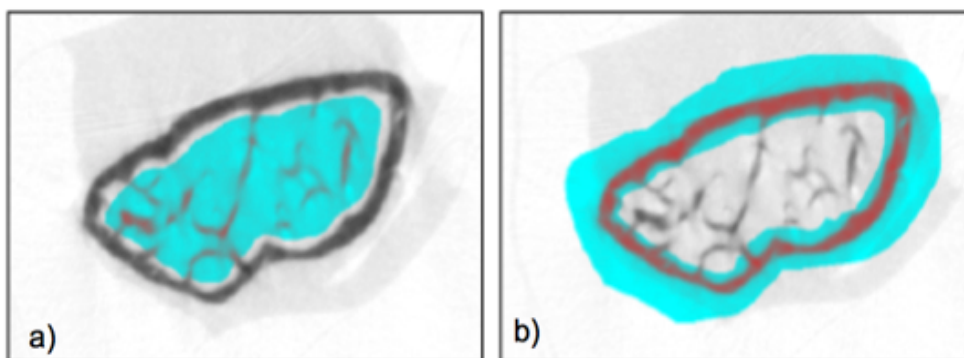
**Abbildung 4: Anatomische Landmarke im Bereich der distalen Wachstumsfuge**

Knorpelige Verbindung im Bereich des distalen Femurs als Landmarke für die Regionen „Distales Femur“ und „Diaphyse“

- Diaphyse: Die Referenzlinie stellte erneut die distale Wachstumsfuge dar. Es wurde ein „offset“ von 400 Einzelschnitten definiert; die Region „Diaphyse“ erstreckt sich über 100 Schnitte.
- Proximale Metaphyse: Diese Region beinhaltet 80 Schnitte. Das erste Schnittbild, das die Aufgabelung im Transversalschnitt in Trochanter major und Schenkelhals darstellte, war die Referenz. Ausgehend von dieser Gabelung wurde ein Puffer von 50 Einzelschnitten nach distal gewählt.

- Schenkelhals: Sobald das Caput femoris in der Transversalebene erstmalig ersichtlich wird und sich vom restlichen proximalen Femur aufspaltet, wurde ein „offset“ von 15 Schichten nach proximal definiert. Die folgenden 20 Einzelschnitte wurden ausgewertet.

Bei jedem Knochen wurde die Region of interest (ROI) manuell eingezeichnet. Für die Analyse des trabekulären Knochens wurde dafür polygonale ROIs gezeichnet, während der kortikale Knochen als elliptische ROI betrachtet wurde (Abb. 5). Die Größe und Form der polygonalen oder elliptischen ROIs wurden manuell alle 5-10 Transversalschnitte nachgezeichnet und dazwischen automatisch durch die Software angepasst.



**Abbildung 5: Regions of interest (ROI) im Bereich der Diaphyse**

a) Polygonale ROI im trabekulären Knochen; b) Elliptische ROI im kortikalen Knochen

Für jede Probe wurden für die jeweilige Region die in Tab. 5 aufgeführten Parameter ermittelt (53). Tab. 6 und Tab. 7 geben einen Überblick über die Bedeutung der unterschiedlichen Knochenstrukturparameter.

Um die Präzision der manuell definierten ROIs zu prüfen, wurden vier randomisiert ausgewählte Femora in den oben genannten Regionen jeweils dreimal unabhängig voneinander analysiert. Der Variationskoeffizient war für keinen Parameter größer als

10%. Mit der Software CT Volume Version 2.2.2.2 (Firma Bruker, Antwerpen, Belgien) wurden exemplarische dreidimensionale Rekonstruktionen der VOIs angefertigt.

**Tabelle 5: Knochenstrukturparameter im  $\mu$ -CT**

<b>Kortikaler Knochen</b>	
B.Ar/T.Ar, %	bone area / tissue area
CtTh, mm	cortical thickness
CtBMD, g/cm <sup>3</sup>	cortical bone mineral density
<b>Trabekulärer Knochen</b>	
BV/TV, %	bone volume fraction
TbN, 1/mm	trabecular number
TbTh, mm	trabecular thickness
TbSp, mm	trabecular separation
DA	degree of anisotropy
TbBMD, g/cm <sup>3</sup>	trabecular bone mineral density

**Tabelle 6: Kortikale Knochenstrukturparameter**

<b>Kortikale Knochenstrukturparameter</b>	<b>Bedeutung</b>
<b>B.Ar/T.Ar</b>	Ratio der Gesamtknochenfläche zur Gesamtquerschnittsfläche
<b>CtTh</b>	Kortikale Schichtdicke
<b>CtBMD</b>	Materiemenge pro Rauminhalt im Knochen

*Adaptiert nach Schröpfer (54)*

**Tabelle 7: Trabekuläre Knochenstrukturparameter**

<b>Trabekuläre Knochenstrukturparameter</b>	<b>Bedeutung</b>
<b>BV/TV</b>	Verhältnis von Knochenvolumen zum gemessenen Gewebe
<b>TbN</b>	Zahl der Trabekel
<b>TbTh</b>	Dicke der Trabekel
<b>TbSp</b>	Abstand zwischen den Trabekeln
<b>DA</b>	Trabekuläre Ausrichtung im Raum (0 entspricht völliger Isotropie; 1 entspricht völliger Anisotropie)
<b>TbBMD</b>	Maß für die Materiemenge pro Rauminhalt im Knochen

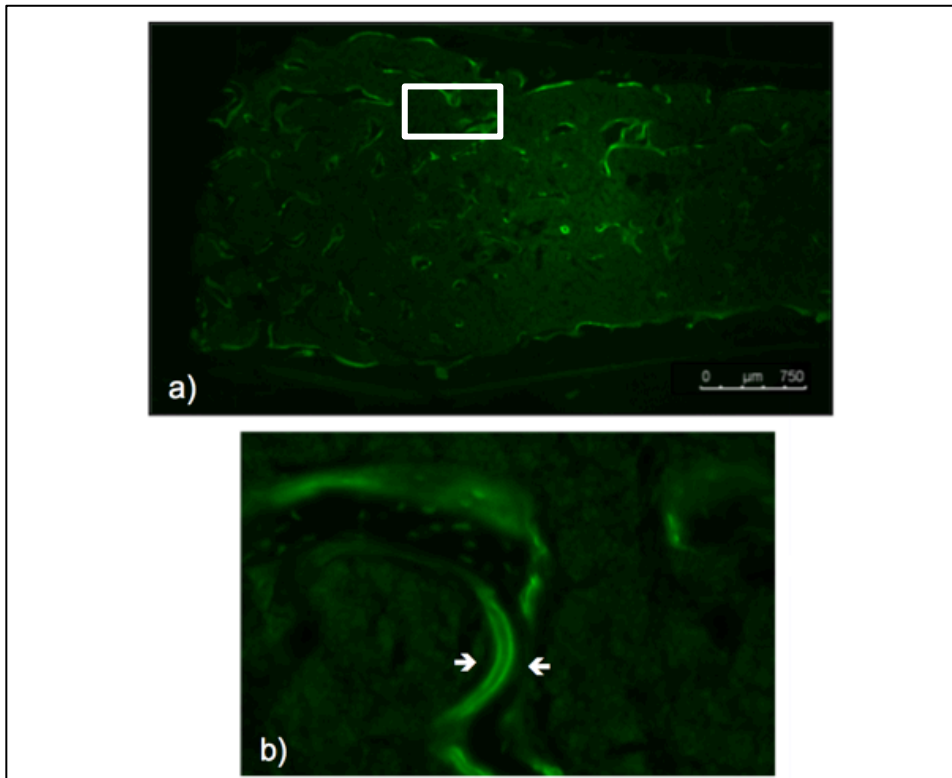
*Adaptiert nach Schröpfer (54)*

### **3.2.2 Präparataufbereitung und Bestimmung der Mineral apposition rate**

Die für die Fluoreszenzmikroskopie ausgewählten Femora wurden unter kontinuierlicher Wasserkühlung mit einer Kreissäge parallel zur Sagittalebene mittig gespalten. Dabei wurde ein Elektromotor (KaVo Werk Dentale Einrichtungen GmbH, Biberach, Deutschland) mit einem Diamantsägeblatt (Gebr. Brasseler GmbH & Co. KG, Lemgo, Deutschland) verwendet. Beide Knochenfragmente wurden in 70% Ethanol dehydratisiert und eines der Fragmente in Polymethylmethacrylat (Technovit 9100 neu®, Heraeus Kulzer GmbH & Co. KG, Wehrheim, Deutschland) eingebettet.

Die Herstellung der auf der Basis von stabilisiertem und entstabilisiertem Methylmethacrylat bestehenden Lösungen ist in Protokoll 1 (im Anhang, Seite 56) aufgeführt. Das Protokoll für die Kunststoffeinfettung (Protokoll 2) ist auf Seite 57 beschrieben (55).

Aus den ungefärbten Femoraschnitte wurden anschließend mit Laserschnitttechnik (LLS Rowiak, Hannover, Deutschland) 5 µm-Schnitte präpariert und die auf APES-beschichteten Objektträger (SuperFrost® Plus, Gerhard Menzel GmbH & Co. KG, Braunschweig, Deutschland) aufgezogene Schnitte mit Glycerin eingedeckt. Die Schnitte wurden an einem Fluoreszenzmikroskop (DMI 4000, Leica Microsystems, Wetzlar) mit digitalen Farb- und Schwarzweiß-Kameras (DFC 320 R2 und DFC 350 Fx) mittels einer geeigneten Software (LAS-Advanced Fluorescence Version 2.3.0) ausgewertet. Calceinbanden wurden durch Anregung mit blauem Licht (Anregungsfilter 355-425 nm) sichtbar gemacht (Sperrfilter 470 nm). Bei 200 x Vergrößerung wurden die Abstände (mid-to-mid) zwischen den Banden (interlabel-distances) in gleichmäßigen Abständen an sechs Positionen innerhalb von einem Gesichtsfeld gemessen, wobei zwei Gesichtsfelder (jeweils 2 Gesichtsfelder im kortikalen Knochen sowie im trabekulären Knochen) betrachtet wurden. Daraus wurde für jedes Präparat die Mineral apposition rate (MAR) als Quotient aus dem Mittelwert der Abstände der Banden und dem Zeitintervall der Calceingabe berechnet (Abb. 6) (55).



**Abbildung 6: Bestimmung der Mineral apposition rate (MAR)**

a) Übersichtsaufnahme, 12,5 x-Vergrößerung. Weißes Kästchen: Ausschnitt, in dem sich b) befindet b) Exemplarische Veranschaulichung zweier Calcein-Banden. Die Abstände zwischen zwei Banden wurden dabei mid-to-mid an sechs unterschiedlichen Positionen gemessen.

### **3.2.3 Immunhistochemische Untersuchungen zur BMP-7-Expression im mineralisierten Knochen**

Für den immunhistochemischen Nachweis von BMP-7 im Femur dienten ebenfalls die in Methymethacrylat eingebetteten und auf APES-beschichteten Objektträgern aufgezugene Dünnschnitte. Das Protokoll (Protokoll 3) ist auf Seite 57 beschrieben.

### **3.2.4 Histologische Färbungen**

Für die Masson-Goldner-Trichrom- und die Von-Kossa-Hämatoxylin-Eosin-Färbung wurde zunächst die Dekalzifizierung der ausgewählten Knochen bei 4°C über einen Zeitraum von 2 Wochen (Usedecalc®; Medite, Burgdorf, Deutschland) unter täglichem Wechsel der dekalzifizierenden Lösung durchgeführt. Anschließend erfolgte die Einbettung in Paraffin.

Mit einem Rotationsmikrotom wurden Längsschnitte der eingebetteten Femora (5 µm) angefertigt und auf Objektträger (SuperFrost® Plus, Gerhard Menzel GmbH & Co. KG, Brunschweig, Deutschland) aufgezogen.

#### **3.2.4.1 Masson-Goldner-Trichom-Färbung**

Diese Färbung wird zur Darstellung von mineralisiertem Knochen (hellgrün), Osteoid (rot-orange), Knorpel (violett), kollagenem Bindegewebe (blass-grün), Zellkernen (schwarz-blau) und Zytoplasma (rot) verwendet und beruht auf den im Protokoll 4 (Seite 59) beschriebenen Lösungen (55, 56).

#### **3.2.4.2 Von-Kossa-Hämatoxylin-Eosin-Färbung**

Nicht-mineralisiertes Osteoid und Kollagen stellen sich in dieser Färbung hellrot-rosa dar, während sich Zellen violett präsentieren (55, 56). Das Protokoll zu dieser Färbung findet sich auf Seite 60 (Protokoll 5).

### 3.3 Statistische Auswertung

Alle statistischen Berechnungen wurden mit der SPSS Software Version 23.0 (SPSS Inc, Chicago, Illinois, USA) ausgeführt. Die in der deskriptiven Statistik aufgeführten Werte stellen den Median und Spannweite (Minimum und Maximum) bzw. Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung dar. Die Überprüfung der Daten auf Normalverteilung wurde mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test durchgeführt. Bei Normalverteilung erfolgte der Gruppenvergleich mit einfaktorieller Varianzanalyse (1-way-ANOVA). Bei fehlender Normalverteilung wurde der Mann-Whitney-U-Test verwendet. Bei mehr als zwei Gruppen wurde bei fehlender Normalverteilung der Kruskal-Wallis-Test angewendet. Sowohl bei der einfaktoriellen Varianzanalyse als auch bei Verwendung des Mann-Whitney-U-Tests/Kruskal-Wallis-Test wurden ggf. post-hoc-Analysen durchgeführt, um statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen zu lokalisieren. Ein p-Wert  $<0,05$  wurde als statistisch signifikant angesehen.

Bei insgesamt 714 Vergleichen wurde zur Vermeidung der Alphafehler-Kumulierung eine Bonferroni-Korrektur durchgeführt (57). Das adjustierte Signifikanzniveau  $p^*$  betrug 0,00007 und wurde gemäß der Formel  $p^* = \alpha / n$  ( $\alpha$ =Signifikanzniveau von 0,05;  $n$ =Anzahl der durchgeführten Tests) berechnet.



## 4 Ergebnisse

### 4.1 Allgemeine Beobachtungen

Bei allen Versuchstieren verlief die Operation komplikationslos. Während des ersten und zweiten postoperativen Tages verhielten sich die Tiere etwas ruhiger als präoperativ. Allerdings waren die Futter- und Wasseraufnahme unbeeinträchtigt und wir verzeichneten bei allen Mäusen einen guten Allgemein- und Ernährungszustand. Die Operationswunde präsentierte sich allzeit reizlos, trocken und ohne lokale Infektionszeichen. Die mittlere Femurlänge am Versuchsende betrug in der 4 Wochen-Gruppe  $16,00 \pm 0,41$  mm rechts und  $16,02 \pm 0,42$  mm links, in der 12 Wochen-Gruppe  $16,16 \pm 0,59$  mm rechts und  $16,17 \pm 0,42$  mm links.

### 4.2 Die Knochenmikroarchitektur im $\mu$ -CT

Im Folgenden ist unter 4.2.1 und 4.2.2 der trabekuläre und kortikale Knochen quantitativ analysiert und nach den unterschiedlichen Knochenregionen (1. Schenkelhals, 2. Proximale Metaphyse, 3. Diaphyse, 4. Distales Femur) sortiert. In jeder Region wurden **A)** zunächst die Knochenstrukturparameter der operierten rechten Seite zwischen den Gruppen (Sham, Hydrogel, BMP) und in Relation zur Versuchsdauer miteinander verglichen. Ebenso wurden unter **A)** die Ergebnisse der 4 Wochen-Gruppe pro Behandlungsgruppe und pro Lokalisation mit der 12 Wochen-Gruppe verglichen. Anschließend folgte unter **B)** der Gruppenvergleich und der Vergleich der beiden Versuchsendpunkte auf der nicht-operierten linken Seite. Unter **C)** wurde pro Parameter die rechte Seite mit der linken Seite in Abhängigkeit von der Versuchsdauer verglichen. Alle Parameter sind in Median und Range (Minimum-Maximum) angegeben.

## 4.2.1 Quantitative Analyse des trabekulären Knochens

### 1. Schenkelhals

- A) Auf der operierten rechten Seite konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede weder zwischen den Gruppen noch zwischen den verschiedene Versuchsdauern verzeichnet werden. Der Parameter DA war zu beiden Zeitpunkten (4 Wochen / 12 Wochen) aus technischen Gründen nicht auswertbar. Die absoluten Werte sind in Tab. 8 (im Anhang, S. 61) abgebildet.
- B) Auf der nicht-operierten linken Seite konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede weder zwischen den Gruppen noch zwischen den verschiedene Versuchsdauern detektiert werden. Der Parameter DA war zu beiden Zeitpunkten (4 Wochen / 12 Wochen) aus technischen Gründen nicht auswertbar. Die absoluten Werte sind in Tab. 9 (im Anhang, S. 62) dargestellt.
- C) Der Parameter TbSp in der 4 Wochen-Gruppe zeigte sich auf der nicht-operierten linken Seite in der Sham-Gruppe signifikant erhöht im Vergleich zur operierten rechten Seite. In der 12 Wochen-Gruppe zeigt sich TbTh links im Vergleich zu rechts in der Hydrogel-Gruppe signifikant erniedrigt. DA war zu beiden Zeitpunkten aus technischen Gründen nicht auswertbar. Die absoluten Werte sind in Tab. 10 (im Anhang, S. 63) dargestellt.

### 2. Proximale Metaphyse

- A) Auf der operierten rechten Seite konnte bezüglich der Parameter BV/TV und TbBMD nach 12 Wochen ein Maximum in der Hydrogel-Gruppe erzielt werden, während die BMP-Gruppe nach 12 Wochen die höchsten Werte bezüglich DA erzielte. Im zeitlichen Verlauf kam es zu einer Abnahme der BV/TV in der Sham-Gruppe, während die BMP-Gruppe nach 12 Wochen einen signifikant höheren

Wert bezüglich DA erzielte als nach 4 Wochen. Die absoluten Werte sind in Tab. 11 (im Anhang, S. 64) dargestellt.

- B) Auf der nicht-operierten linken Seite erzielte der Parameter TbTh in der Hydrogel-Gruppe in der 12 Wochen-Gruppe einen signifikant erhöhten Wert im Vergleich zur Sham-Gruppe, befand sich jedoch auf dem gleichen Niveau wie die BMP-Gruppe. Zwischen den beiden Versuchsdauern konnten keine Unterschiede detektiert werden. Die absoluten Werte sind in Tab. 12 (im Anhang, S. 65) dargestellt.
- C) Im Seitenvergleich zeigte die 4 Wochen-Gruppe in der Sham-Behandlung einen signifikant erhöhten TbTh-Wert auf der operierten rechten Seite im Vergleich zur kontralateralen Seite. In der Hydrogel-Gruppe wiesen BV/TV, TbN und TbBMD nach 4 Wochen statistisch signifikant niedrigere Werte auf der operierten rechten Seite auf als auf der nicht-operierten linken Seite. In der 12 Wochen-Gruppe zeigte sich die Hydrogel-Gruppe bezüglich TbTh signifikant erhöht auf der nicht-operierten linken Seite. In der BMP-Gruppe nach 12 Wochen war DA rechts signifikant erhöht, während TbBMD rechts signifikant im Vergleich zur Gegenseite erniedrigt war. Die absoluten Werte sind in Tab. 13 (im Anhang, S. 66) dargestellt.

### 3. Distales Femur

- A) Auf der operierten rechten Seite bestand nach 4 Wochen im Vergleich zur BMP-Gruppe eine statistisch signifikante Überlegenheit der Hydrogel-Gruppe bezüglich der Parameter TbN und BV/TV. In der Sham-Gruppe entwickelten TbTh und TbSp höhere Werte im zeitlichen Verlauf. Die absoluten Werte sind in Tab. 14 (im Anhang, S. 67) dargestellt.
- B) Auf der nicht operierten linken Seite konnten in der BMP-Gruppe bezüglich der Parameter BV/TV und TbTh signifikant höhere Werte in der 12 Wochen-Gruppe als in der 4 Wochen-Gruppe erzielt werden. Zwischen den verschiedenen Gruppen

konnten keine Unterschiede detektiert werden. Die absoluten Werte sind in Tab. 15 (im Anhang, S. 68) dargestellt.

C) Im Seitenvergleich zeigte sich DA nach 4 Wochen in der Sham-Gruppe signifikant auf der linken Seite erhöht im Vergleich zur operierten Seite. Ansonsten wies die BMP-Gruppe links nach 12 Wochen bezüglich der Parameter BV/TV, TbN und TbBMD signifikant höhere Werte als die rechte Seite auf, während TbSp rechts im Vergleich zur Gegenseite signifikant erhöht war. Die absoluten Werte sind in Tab. 16 (im Anhang, S. 69) dargestellt.

## 4.2.2 Quantitative Analyse des kortikalen Knochens

### 1. Schenkelhals

- A) Auf der operierten rechten Seite zeigte der Parameter CtBMD zum Zeitpunkt 4 Wochen den signifikant höchsten Wert in der Sham-Gruppe. Des Weiteren zeigte der Parameter CtBMD in der Hydrogel-Gruppe eine signifikante Zunahme zwischen 4 und 12 Wochen. Der Parameter CtTh war aus technischen Gründen in der 12 Wochen-Gruppe nicht auswertbar. Die absoluten Werte sind in Tab. 17 (im Anhang, S. 70) dargestellt.
- B) Auf der nicht-operierten linken Seite zeigten sich keine Unterschiede zwischen den Gruppen. Der Parameter CtBMD zeigte eine signifikante Zunahme zwischen 4 und 12 Wochen in der Sham-Gruppe. Der Parameter CtTh war aus technischen Gründen in der 12 Wochen-Gruppe nicht auswertbar. Die absoluten Werte sind in Tab. 18 (im Anhang, S. 71) dargestellt.
- C) Im Seitenvergleich konnten bezüglich des Parameters CtBMD in der Sham-Gruppe und des Parameters B.ar/T.ar in der Hydrogel-Gruppe in der 4 Wochen-Gruppe signifikant erniedrigte Werte auf der linken als auf der rechten Seite verzeichnet werden. In der 12 Wochen-Gruppe zeigte sich der Parameter CtBMD in der Sham-Gruppe auf der linken Seite im Vergleich zu rechts signifikant erhöht. Die absoluten Werte können der Tab. 19 (im Anhang, S. 72) entnommen werden.

### 2. Proximale Metaphyse

- A) Auf der operierten rechten Seite kam es im zeitlichen Verlauf zu einer Zunahme der CtBMD in der Hydrogel- und BMP-Gruppe. In der 4 Wochen-Gruppe zeigte sich ein signifikant höherer Wert der CtBMD in der Sham-Gruppe im Vergleich zur Hydrogel-Gruppe. Nach 12 Wochen konnte bezüglich CtBMD und B.ar/T.ar ein Maximum in der Hydrogel-Gruppe erreicht werden. Der Parameter CtTh war in der

12 Wochen-Gruppe aus technischen Gründen nicht auswertbar. Die absoluten Werte können der Tab. 20 (im Anhang, S. 73) entnommen werden.

- B) Auf der nicht-operierten linken Seite konnten keine Unterschiede zwischen den Gruppen verzeichnet werden. In der BMP- und in der Hydrogelgruppe ist ein Anstieg der CtBMD im zeitlichen Verlauf zu erkennen. Der Parameter CtTh war in der 12 Wochen-Gruppe aus technischen Gründen nicht auswertbar. Die absoluten Werte können der Tab. 21 (im Anhang, S. 74) entnommen werden.
- C) In der Hydrogel-Gruppe erzielte B.ar/T.ar nach 4 Wochen auf der rechten Seite einen signifikant erhöhten Wert im Vergleich zu Gegenseite. In der Sham-Gruppe war CtBMD nach 4 Wochen ebenso rechts im Vergleich zu links signifikant erhöht. In der 12 Wochen-Gruppe wies die rechte Seite bei B.ar/T.ar einen signifikant höheren Wert auf als die linke Seite. In der BMP-Gruppe war CtBMD links signifikant höher nach 12 Wochen als rechts. Die absoluten Werte können der Tab. 22 (im Anhang, S. 75) entnommen werden.

### 3. Diaphyse

- A) Auf der operierten rechten Seite erzielte die BMP-Gruppe nach 12 Wochen einen signifikant höheren Wert bei B.ar/T.ar als die Sham- und die Hydrogel-Gruppe. Bezüglich des Parameters CtBMD erreichte die Hydrogel-Gruppe im Vergleich zu der Sham-Gruppe einen signifikant höheren Wert in der 12 Wochen-Gruppe. Während B.ar/T.ar im zeitlichen Verlauf in der Sham-Gruppe abnahm, kam es zu einem signifikanten Anstieg im zeitlichen Verlauf bezüglich CtBMD in der Hydrogel-Gruppe. Die absoluten Werte können der Tab. 23 (im Anhang, S. 76) entnommen werden.
- B) Auf der nicht-operierten linken Seite erreichte der Parameter CtBMD sowohl in der Hydrogel-Gruppe wie auch in der BMP-Gruppe höhere Werte im zeitlichen Verlauf.

Ein Unterschied zwischen den verschiedenen Gruppen konnte nicht detektiert werden. Die absoluten Werte können der Tab. 24 (im Anhang, S. 77) entnommen werden.

C) In der 12 Wochen-Gruppe zeigte sowohl die Sham- als auch die BMP-Gruppe bezüglich CtBMD links signifikant höhere Werte als rechts. Die absoluten Werte können der Tab. 25 (im Anhang, S. 78) entnommen werden.

### **4.3 Vergleich der unterschiedlichen Knochenregionen im $\mu$ -CT**

Die Tab. 26 und Tab. 27 (im Anhang, S. 79-80) stellen signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen Knochenarealen - geordnet nach den Knochenstrukturparametern, den Behandlungsgruppen und den zwei Versuchszeiträumen auf der operierten rechten Seite dar, wobei alle Parameter in Median und Range (Minimum/Maximum) angegeben sind. Die Abb. 7 zeigt exemplarisch anhand der Sham-Gruppe der operierten rechten Seite zum Zeitpunkt vier Wochen und anhand des Parameters CtTh die signifikanten Unterschiede der Knochenmikroarchitektur zwischen den untersuchten Knochenregionen pro Parameter und pro Untersuchungszeitraum (Median (range): Schenkelhals 0,103 mm (0,098-0,106 mm), proximale Metaphyse 0,117 mm (0,115-0,125 mm), Diaphyse 0,144 mm (0,129-0,158 mm);  $p=0,0421$ ; die Vergleich der Werte der drei Regionen untereinander (Schenkelhals vs. proximale Metaphyse, Schenkelhals vs. Diaphyse und proximale Metaphyse vs. Diaphyse) zeigten jeweils ein statistisch signifikanten Unterschied (jeweils  $p < 0,05$ ; ohne Anwendung einer Alpha-Korrektur). Vergleichbare Beobachtungen konnten bezüglich anderer Knochenstrukturparameter in allen drei Behandlungsgruppen gemacht werden (siehe Tab. 26 und Tab. 27).

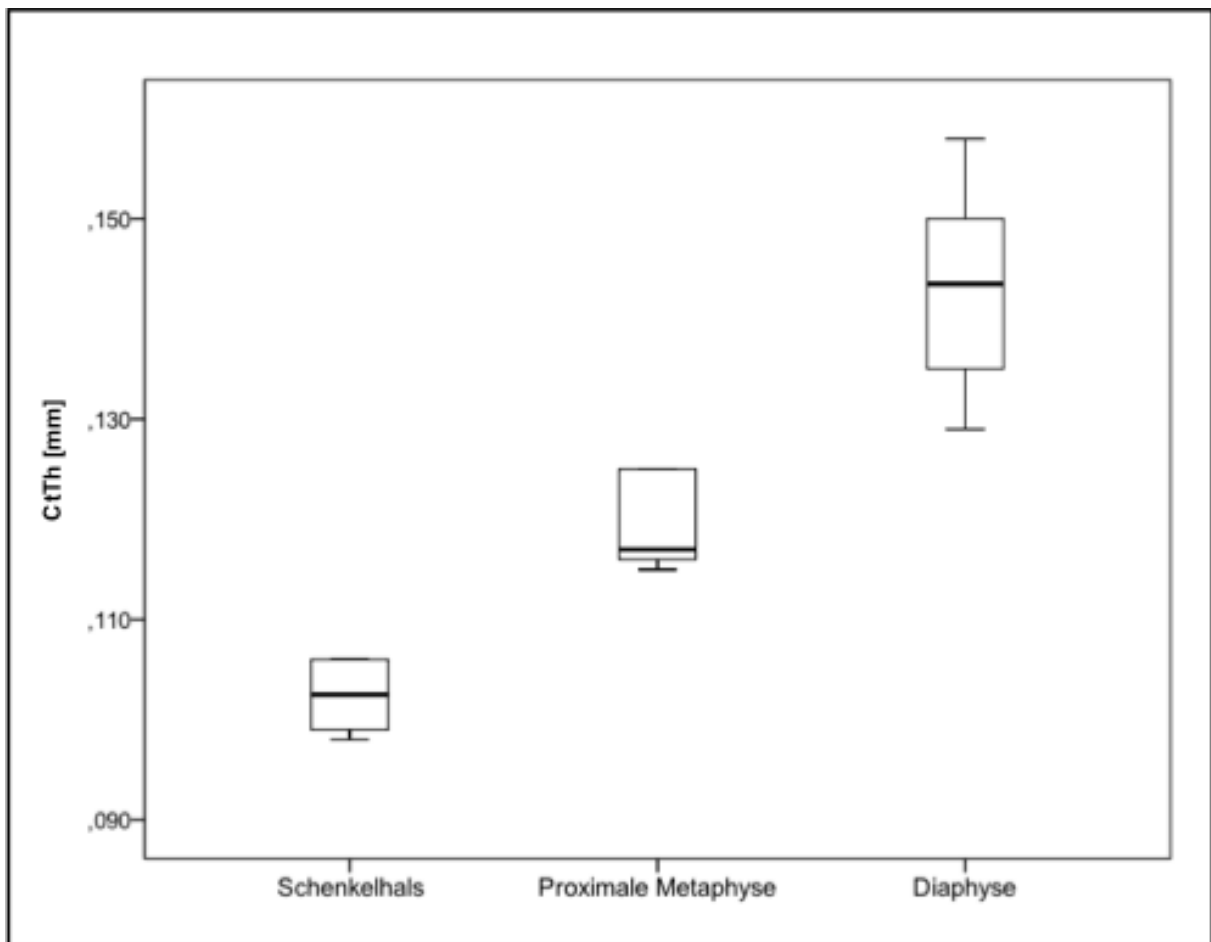


Abbildung 7: Vergleich der unterschiedlichen Knochenregionen



#### **4.4 Ergebnisse der histologischen und immunhistochemischen Analysen**

##### **1) Mineral apposition rate (MAR)**

Bezüglich der MAR konnten weder im trabekulären noch im kortikalen Knochen signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen, dem Behandlungszeitraum oder den operierten und den nicht-operierten Femora gezeigt werden.

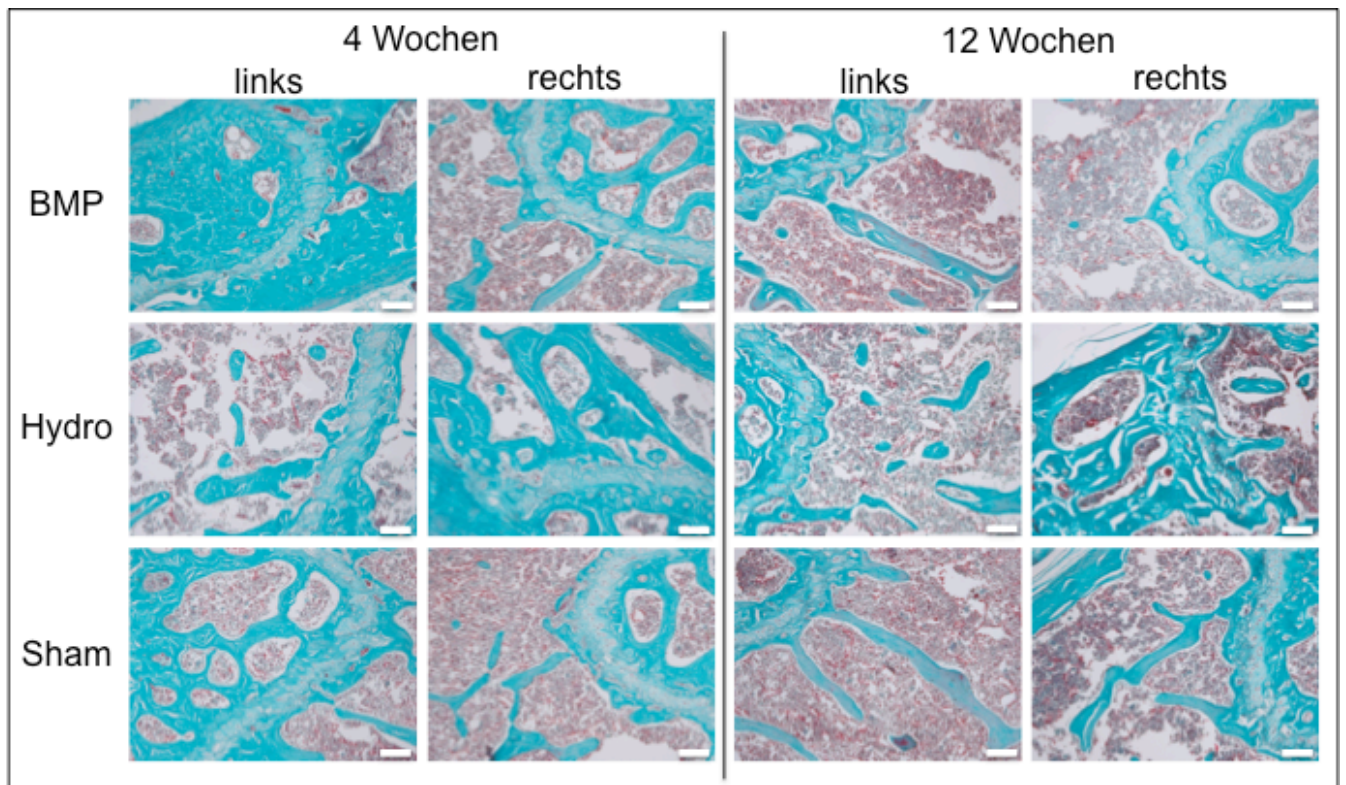
##### **2) Masson-Goldner- und Von-Kossa-Hämatoxylin-Eosin-Färbung**

Auch die lichtmikroskopische Auswertung wurde in den vier Regionen (Distales Femur, Diaphyse, proximale Metaphyse, Schenkelhals) durchgeführt. Hierbei wurde das Augenmerk auf lokale Zeichen einer Entzündung, auf Knochenneubildung, auf Nekroseareale und Unterschiede zwischen operierter und nicht-operierter Seite gerichtet. Hierfür wurden alle ausgewählten Schnitten unter aufsteigenden Vergrößerungen untersucht und fotografisch dokumentiert.

##### Feststellungen:

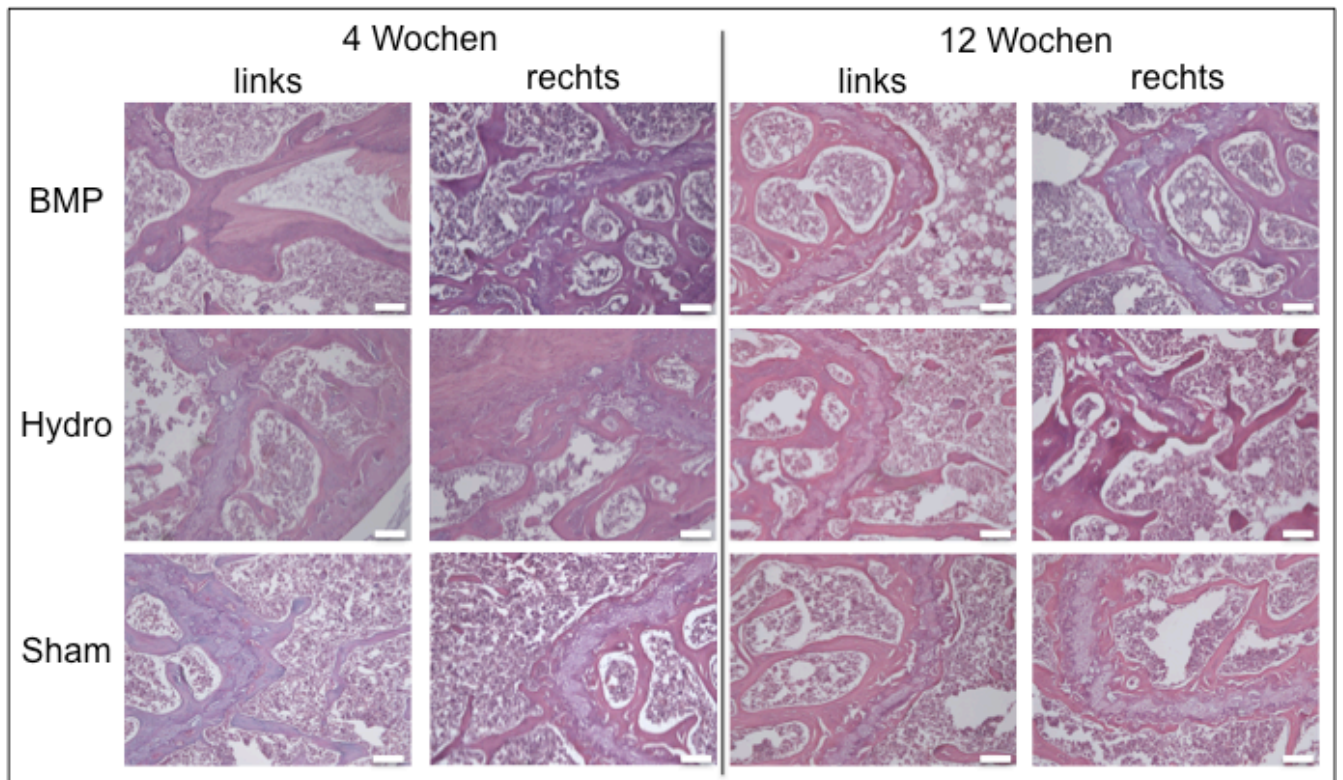
- 1) In keinem der Präparate konnte ein Bohrlochkanal oder ein Defektareal als Folge der interkondylären Kanülierung detektiert werden.
- 2) In keinem der Präparate fanden sich Hinweise auf eine Nekrose, unabhängig von Gruppenzugehörigkeit und Beobachtungszeitraum.
- 3) In keiner Versuchsgruppe konnte neu gebildetes Osteoid oder eine Neubildung von Knochen- oder Knorpelgewebe in den untersuchten Regionen nachgewiesen werden. Ebenso konnte kein Knorpelschaden festgestellt werden.
- 4) Lokale Entzündungszeichen im Sinne einer größeren Ansammlung von Granulozyten oder umschriebene Entzündungsherden konnten in keinem der untersuchten Präparate identifiziert werden.

Zusammenfassend waren lichtmikroskopisch keine relevanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Gruppen oder interindividuell feststellbar. Exemplarisch zeigen die Abb. 8 und Abb. 9 die sechs unterschiedlichen Gruppen in der Region „Distales Femur“ auf Höhe der distalen Wachstumsfuge.



**Abbildung 8: Masson-Goldner-Trichom-Färbung**

Darstellung der sechs unterschiedlichen Gruppen in der Region „Distales Femur“ auf Höhe der distalen Wachstumsfuge. Der weiße Streifen jeweils rechts unten entspricht 100 µm.

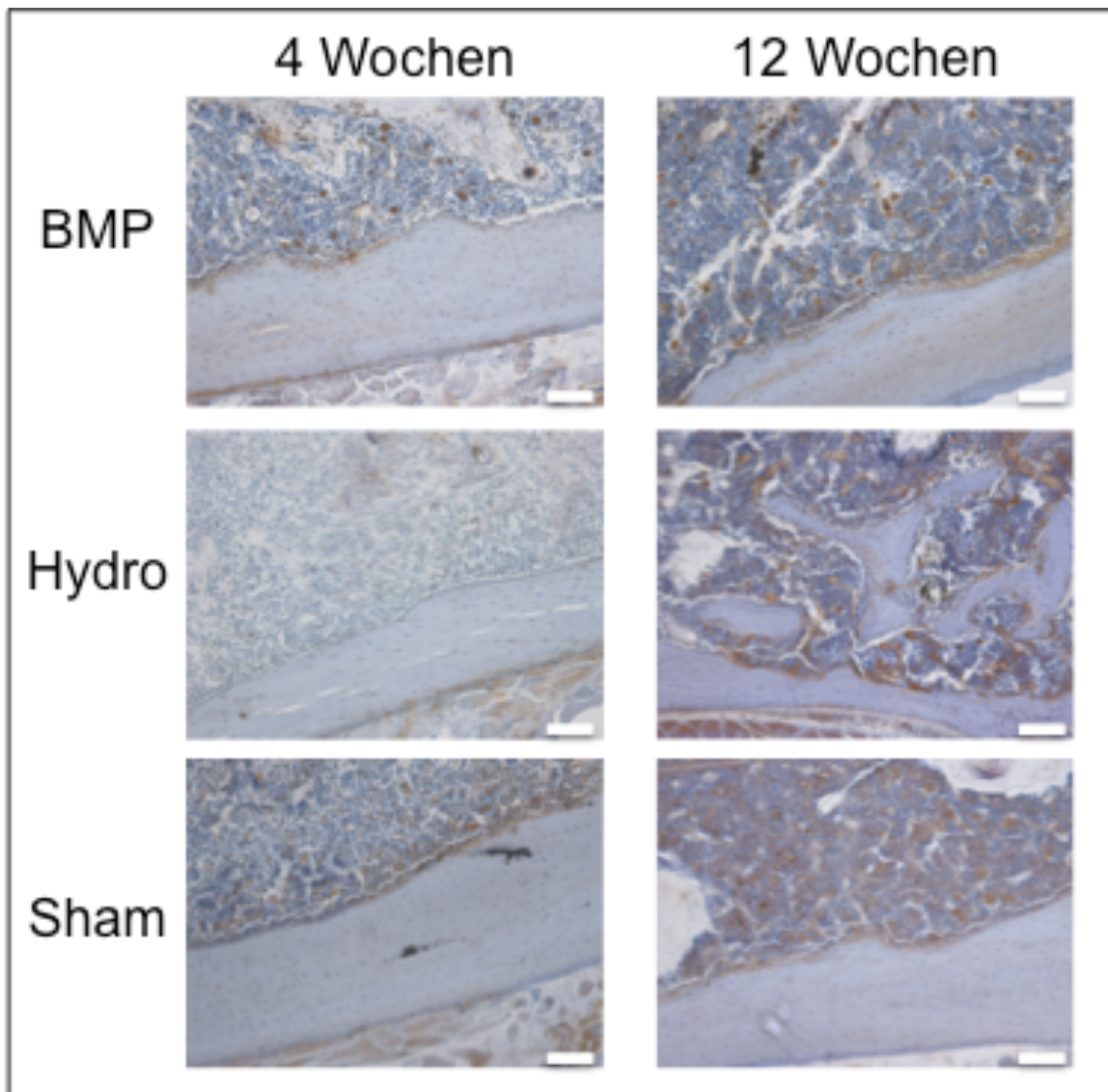


**Abbildung 9: Hämatoxylin-Eosin-Färbung**

Darstellung der sechs unterschiedlichen Gruppen in der Region „Distales Femur“ auf Höhe der distalen Wachstumsfuge. Der weiße Streifen jeweils rechts unten entspricht 100 µm.

### 3) Immunhistochemischer Nachweis von BMP-7

BMP-7 konnte in allen osteogenen Zellen im epi-, meta-, und diaphysären Bereich nachgewiesen werden. Dabei zeigte sich keine erhöhte Expression von BMP-7 in der BMP-7-Gruppe im Vergleich zu der Sham- oder Hydrogel-Gruppe. Aus diesem Grund beschränkt sich die Darstellung der Immunhistochemie in Abb. 10 auf exemplarische Beispiele.



**Abbildung 10: Immunhistochemischer Nachweis von BMP-7**

Darstellung der unterschiedlichen Gruppen. Der weiße Streifen jeweils rechts unten entspricht 100 µm.

## **5 Diskussion**

Primäres Ziel der vorliegenden Studie war die Etablierung eines *in vivo*-Modells, um zukünftig die Eignung eines Wachstumsfaktor-beladenen Hydrogels zur Augmentation des proximalen Femurs zu evaluieren. Klinisch könnte eine prophylaktische Augmentation der kontralateralen Seite während der operativen Versorgung einer proximalen Femurfraktur Anwendung finden, da Patienten nach stattgehabter Osteoporose-assoziiertes Hüftfraktur ein hohes Risiko für eine Fraktur der Gegenseite haben. In der vorliegenden Studie wurde die lokale intramedulläre Augmentation eines mit dem Wachstumsfaktor BMP-7 beladenen BDI-Hydrogels getestet.

### **5.1 Diskussion der Methodik**

#### **5.1.1 Das Tiermodell und die Wahl der Versuchsendpunkte**

Um die Biokompatibilität sowie die Funktionalität des operativen Zugangs zu charakterisieren, sind standardisierte Bedingungen notwendig, sodass für dieses Versuchsvorhaben ein etabliertes Tiermodell verwendet wurde. Zudem unterliegen die Mechanismen der Regulation und Steuerung des Knochens komplexen biologischen Abläufen, welche die Einbeziehung eines Gesamtorganismus erforderlich machen.

Großtiere wie Schweine oder Hunde haben zwar den Vorteil, dass für den Menschen entwickelte Operationsmethoden relativ leicht zu übertragen sind, andererseits sind diese Tiere jedoch nicht nur in der Anschaffung, sondern auch in der Haltung wesentlich teurer als Mäuse oder Ratten (58). Ein Nachteil von Mäusen ist die geringe Körpergröße, die größere Anforderungen an den Operateur mit sich bringt. Zudem besteht der Lamellenknochen ausschließlich aus primären Osteonen und ist nicht, anders als bei größeren Säugetieren, in Haverssystemen organisiert (58, 59).

In dieser Arbeit wurde mit C57BL/6-Mäusen gearbeitet, eines der am häufigsten zur Untersuchung des Knochenmetabolismus verwendeten Mausstamms, wodurch eine



gute Evaluation der Ergebnisse mit anderen Studien ermöglicht werden kann (Fragestellung 1) (60). In dieser Machbarkeitsstudie wurden ausschließlich männliche Tiere im Alter von 6 Monaten untersucht, um eventuelle hormonelle Einflüsse zu reduzieren. Sollte es bei diesen ausgewachsenen, aber noch jungen Versuchstieren durch die Behandlung zu einer Stimulation der Knochenbildung kommen, wäre ein derartiger Effekt bei älteren bzw. Tieren mit zugrundeliegender Osteoporose ebenso wahrscheinlich. Gemäß Halloran et al. sind C57BL/6-Mäuse sehr gut geeignet, um altersbedingten Knochenverlust zu untersuchen (Fragestellung 1) (61). Halloran et al. beschrieben, dass es bei männlichen C57BL/6-Mäusen mit zunehmenden Alter zu einer verminderten BMD, BV/TV, TbN, DA, CtTh und CtBMD kommt. Während sich die TbTh im Mausmodell ab einem Alter von 5 ½ Monaten konstant verhält, zeigt sich die TbSp ab einem Alter von 1 ½ Monaten im Vergleich zum Ausgangswert erhöht (61). Perkins et al. beschrieben, dass die kortikale Dicke bei C57BL/6-Mäusen zwischen 6 und 24 Monaten gegenüber der Ausgangsdicke um 14% abnimmt (62). Nach einer ersten Testung im Kadavermodell wurde in der vorliegenden Studie die intramedulläre retrograde Femur-Injektion nach Zilber et al. verwendet (52). Dieser Ansatz zeichnet sich durch eine geringe Invasivität aus, da ausschließlich im Bereich zwischen den Kondylen ein kortikaler Defekt gesetzt wird, um eine 29 G-Nadel bis zum Schenkelhals innerhalb des intramedullären Raumes vorzuschieben und die Testsubstanz zu applizieren. Im Kadavermodell zeigte sich eine homogene Verteilung des Hydrogels im gesamten Femur (Fragestellung 1).

Fulminante Nebenwirkungen wie lokale oder systemische Infektzeichen (Ausbildung von Knochenzysten, Weichteilschwellungen etc. (63)) können in diesem Tiermodell detektiert werden, bevor in weiteren Studien die therapeutischen Effekte an osteoporotischen Mäusen überprüft werden (Fragestellungen 1-3).

*In vitro*-Versuche zeigten die konstante Freisetzung von BMP-7 aus dem BDI-Hydrogel

über einen Zeitraum von 38 Tagen (Dr. rer. nat. Ines Westphal, LMU München; unveröffentlichte Daten). Die Beobachtungsintervalle von 4 und 12 Wochen sollten einen Inflamationszeitraum abdecken sowie eine potentielle prolongierte Wirkung darüber hinaus *in vivo* aufzeigen im Sinne einer Erfassung von akuten wie auch Langzeiteffekten.

### **5.1.2 Die Wahl der BMP-7-Konzentration im BDI-Hydrogel**

Da bei zu hohen Dosen von BMPs im Tiermodell eine Ausbildung von Knochenzysten, inflammatorische Reaktionen wie Weichteilschwellungen und ein kanzerogenes Potential beschrieben wurden (51, 64), wählten wir in Analogie zu publizierten Daten eine Konzentration von 100 µg rhBMP-7/ml BDI-Hydrogel (51).

Bei gleicher relativer Aktivität von BMP-2 und BMP-7 bei höheren Dosierungen (65), konnten Zara et al. zeigen, dass in der Ratte BMP-2-Konzentrationen zwischen 5 und 10 µg/ml nicht ausreichend wirksam sind, während ab einer Konzentration von 30 µg/ml eine osteoinduktive Wirkung ohne Nebenwirkungen festgestellt werden konnte. Dosierungen ab 150 µg/ml zeigten zwar eine gute Wirksamkeit, jedoch konnten die oben aufgeführten Nebenwirkungen beobachtet werden (51).

In der Literatur wird zudem eine Aktivierung von Osteoklasten durch hohe Konzentrationen von BMP-7 beschrieben (42, 66, 67), sodass auch diese Beeinflussung bei der Wahl der BMP-7-Konzentration im BDI-Hydrogel zu beachten ist.

Bisher wurde die Freisetzung von BMP-7 aus dem BDI-Hydrogel von uns nur *in vitro* nachgewiesen, jedoch beschrieben sowohl Samorezov et al. (68) als auch Azagarzamy et al. (69) reduzierte Freisetzungen von Wachstumsfaktoren aus Hydrogelen. Daher sollte in Folgestudien die *in vivo*-Freisetzung quantitativ bestimmt werden.

### 5.1.3 Die Untersuchungstechniken

Die dreidimensionale Analyse der Knochenmikroarchitektur erfolgte durch hochauflösende  $\mu$ -CT-Analyse. Durch Orientierung an anatomischen Landmarken wurde eine standardisierte Auswertung der Knochen sichergestellt.

Mit den aktuell erhältlichen  $\mu$ -CT Scannern können Auflösungen erzielt werden, die ausreichend sind, um Trabekel der Maus zu untersuchen, die eine Dicke von circa 20-30  $\mu\text{m}$  haben (54, 70). Damit ist das  $\mu$ -CT der histologischen Analyse, die notwendigerweise auf zwei Dimensionen beschränkt ist, im Rahmen der Knochenmikrostrukturanalyse deutlich überlegen. Darüber hinaus ermöglicht das  $\mu$ -CT die schnelle Auswertung größerer Volumina (54).

Trotz dieser Vorteile sind die Ergebnisse verschiedener Arbeitsgruppen nicht immer vergleichbar (54, 71): Ursache hierfür sind neben der Auflösung unter anderem die Einstellung des Schwellenwertes (threshold), d.h. des Grenzwertes für die Transformation des Rohbildes in ein Binärbild (schwarz-weiß), in dem die Zielstrukturen gegen den Hintergrund bzw. nicht-interessierende Strukturen abgegrenzt sind (54). Hildebrand et al. beschrieben einen Zusammenhang zwischen dem relativen Knochenvolumen (BV/TV) und der Höhe des Schwellenwertes: Eine Schwellenwertänderung um 10% führte zu einer Veränderung des relativen Knochenvolumens um 5% (54, 72).

Es wird zwischen einem globalen und einem lokalen Schwellenwertvorgehen unterschieden. Während beim globalen Vorgehen ein Schwellenwert für das gesamte Bild festgelegt wird und Helligkeitsschwankungen innerhalb des Bildes nicht zum Tragen kommen, liegen dem lokalen Verfahren Graustufenschwankungen innerhalb der Aufnahme zugrunde (54). Aufgrund des guten Kontrastes zwischen Knochen und umgebenden Gewebe und um die Vergleichbarkeit zwischen verschiedenen Scans zu



gewährleisten (54), wurde in dieser Arbeit ein unterer Schwellenwert von 85 für den trabekulären und 100 für den kortikalen Knochen gewählt (54).

Da in der  $\mu$ -CT-Analyse zelluläre Vorgänge nicht dargestellt werden können, haben wir zusätzliche Untersuchungen an Ultradünnschnitten durchgeführt, um die zelluläre Morphologie im mineralisierten sowie demineralisierten Knochen auch im Hinblick auf inflammatorische Geschehen zu beschreiben.

## **5.2 Bewertung der allgemeinen Beobachtungen**

Kein Tier musste verfrüht aus dem Versuch genommen werden, lokale oder systemische Nebenwirkungen konnten nicht beobachtet werden, was gemäß den Forderungen von Caló et al. für eine Biokompatibilität der Kombination aus BDI-Hydrogel und BMP-7 spricht (73) (Fragestellung 2).

## **5.3 Diskussion der histomorphometrischen und immunhistochemischen Ergebnisse**

In den histologischen Färbungen (HE, MG) konnten weder Unterschiede zwischen den Gruppen noch zwischen operierten und nicht-operierten Femora auf zellulärer Ebene festgestellt werden. Ebenso zeigten sich in der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung keine signifikanten Unterschiede. Diese Beobachtungen unterstützen die Hypothese, dass eine ausreichende Biokompatibilität vorliegt: Schwere Nebenwirkungen wären mit hoher Wahrscheinlichkeit offenkundig geworden (74) (Fragestellungen 2 und 3).

## **5.4 Diskussion der $\mu$ -CT-Untersuchungen**

Um die Ergebnisse der  $\mu$ -CT einzuordnen und zu standardisieren, wurden in einigen Studien die Ergebnisse der  $\mu$ -CT-Analyse mit konventionellen histomorphometrischen Methoden verglichen (54, 71, 75, 76): In diesen Arbeiten wurde offenkundig, dass die  $\mu$ -CT-Analysen eine starke Korrelation zu den zweidimensionalen histomorphometrischen Analysen haben.

Gemäß dieser Korrelation verhalten sich die Ergebnisse der vorliegenden  $\mu$ -CT-Auswertung. Zwar können unabhängig von den betrachteten Knochenregionen vereinzelt signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen Gruppen beobachtet werden, bei Korrektur für multiples Testen stellten sich diese jedoch als nicht signifikant dar (Fragestellung 4).

#### **5.4.1 Unterschiede zwischen den verschiedenen Behandlungen**

Folgende Hypothese wurden vor Auswertung der  $\mu$ -CT-Daten aufgestellt:

Hinweisend für ein osteogenes Potential von BMP-7 und BDI-Hydrogel wäre eine Zunahme (BV/TV, TbN, TbTh, DA, BMD, B.ar/T.ar, CtTh, CtBMD) bzw. eine Abnahme (TbSp) der Werte der Knochenstrukturparameter auf der mit BMP-7 behandelten Seite relativ zur unbehandelten und / oder zur Behandlung mit BDI-Hydrogel bzw. NaCl. Bei Vorliegen der richtigen Konzentration von BMP-7, der Wahl eines geeigneten Modells und einer adäquaten Freisetzung von BMP-7 könnte eine osteoinduktive Wirkung unter der Annahme einer lokalen Wirksamkeit beobachtet werden.

Wie bereits unter 5.4 aufgeführt, zeigt der Blick auf einzelne Parameter nur wenige signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen Behandlungen, die nach Durchführung einer Alpha-Korrektur als nicht mehr signifikant angesehen werden können, sodass ein relevanter Unterschied als nicht wahrscheinlich gilt (Fragestellung 4).

Dies kann folgenden Ursachen haben:

- 1) Wahl einer zu niedrigen BMP-7-Konzentration im BDI-Hydrogel
- 2) Wahl einer zu hohen BMP-7-Konzentration im BDI-Hydrogel
- 3) Mangelnde Freisetzung von BMP-7 aus dem BDI-Hydrogel
- 4) Vorzeitiges Abfluten von BMP-7 durch prolongierte Festigung des BDI-Hydrogels in der proximalen Metaphyse
- 5) Wahl eines ungeeigneten Tiermodells

## 6) Wahl von inadäquaten Versuchsendpunkten

Zu den Punkten 1), 2) und 3): Wie unter 5.1.2 aufgeführt, wurde die Dosierung von BMP-7 gemäß Zara et al. ausgewählt (51). Dennoch bleibt zu diskutieren, ob die bisher in der Literatur angegebenen Konzentrationen von BMP-7 auch auf unser BDI-Hydrogel zu übertragen sind. Gemäß Paul et al. kann eine zu niedrige Konzentration zudem zu einem verzögerten „release“ von BMPs aus Hydrogelen führen (77).

Zu Punkt 4): Volkmer et al. konnten ein unmittelbares Aushärten des BDI-Hydrogels bei Körpertemperatur nachweisen (78); tritt dieser Prozess jedoch nicht ein, kommt es gegebenenfalls zu einem Abfluten von BMP-7, das ohnehin eine kurze Halbwertszeit *in vivo* aufweist (41).

Zu Punkt 5): Die häufigste *in vivo*-Verwendung findet BMP-7 im Rahmen von Pseudarthrosemodellen (79). Jedoch wurde die Wirksamkeit von BMP-7 von Zara et al. ebenso in minimal-invasiven Modellen beschrieben (51), sodass wir das wenig invasive Injektionsmodell nach Zilber et al. verwendeten (52). Da unser primäres Ziel war, ein geeignetes Modell zu etablieren und die Biokompatibilität nachzuweisen, entschieden wir uns für die Verwendung von C57BL/6-Mäusen. Gegebenenfalls kann in diesen gesunden Mäusen jedoch möglicherweise kein osteoinduktives Potential von BMP-7 nachgewiesen werden, da durch den kortikalen Bohrlochdefekt und den Vorschub der 29-Nadel die Homöostase des Knochens eventuell nicht bzw. nur gering verändert wurde. Gegebenenfalls waren die von uns gewählten Mäuse zu jung und es würden im Falle eines osteoporotischen Knochenmetabolismus verstärkt osteoinduktive Wirkungen verzeichnet werden (Fragestellung 1). Weitere Versuche müssen diese Vermutung klären (siehe 5.5).

Zu Punkt 6): *In vitro* konnte eine konstante Freisetzung von BMP-7 aus dem Hydrogel über 28 Tage nachgewiesen werden. Ein Verpassen des „peaks“ der BMP-7-Freisetzung *in vivo* wäre jedoch auch mit den vorliegenden Ergebnissen vereinbar.

#### **5.4.2 Einfluss der Zeit**

Halloran et al. beschrieben eine Veränderung der Knochenstrukturparameter beim Alterungsprozess der C57BL/6-Maus (61). Während die Parameter BV/TV und B.ar/T.ar im zeitlichen Verlauf abnahmen und TbSp zunahm und diese damit den Beobachtungen von Halloran et al. entsprechen, konnte unabhängig von der Gruppenzugehörigkeit in einigen Fällen eine Zunahme von DA, TbTh und CtBMD im zeitlichen Verlauf verzeichnet werden. Bei der Mehrheit konnte jedoch zwischen den beiden Beobachtungszeiträumen (4 Wochen / 12 Wochen) keine signifikanten Unterschiede beobachtet werden.

#### **5.4.3 Vergleich der unterschiedlichen Knochenregionen**

In unserem Versuch konnten die Beobachtungen von Bagi et al. bestätigt werden, dass sich die Knochenmikroarchitektur signifikant zwischen den unterschiedlichen Knochenregionen jedes Individuums unterscheidet (siehe 4.3) (80). Zusammenfassend zeigen diese Beobachtungen, dass eine Knochenregion nicht repräsentativ für die Mikroarchitektur des gesamten Knochens betrachtet werden kann.

#### **5.5 Klinische Relevanz und Ausblick**

Unter Osteoporose ist eine Krankheit des hohen Alters zu verstehen, die aufgrund des demographischen Wandels von zunehmender Bedeutung sein wird (81). Es gibt bereits viele Möglichkeiten der Osteoporoseprophylaxe und -therapie und zur Vermeidung initialer sowie sekundärer osteoporotischer Frakturen. Ein neuer Ansatz würde jedoch die minimal-invasive prophylaktische Augmentation des osteoporotischen Femurs bei Fraktur des kontralateralen proximalen

Oberschenkelknochens darstellen. Obwohl diese Augmentation einen zusätzlichen, wenn auch minimal-invasiven, operativen Eingriff darstellt, könnte damit die Notwendigkeit einer langjährigen Medikation minimiert werden (82). Ein osteoinduktives, biokompatibles Material würde in diesem Kontext ein geeignetes Augmentationsmaterial darstellen. Da die Kombination von BMP-7 und BDI-Hydrogel bisher noch nicht *in vivo* erprobt wurde, ist diese Arbeit der erste Schritt – im Sinne einer Pilotstudie - zur Überprüfung der Biokompatibilität und Etablierung eines geeigneten Tiermodells. Obwohl der Versuch vor dem Hintergrund einer möglichen Behandlung von Patienten mit Osteoporose steht, werden weitere Schritte notwendig sein, um einer potentiellen klinischen Anwendung näherzukommen. Kritisch muss an dieser Stelle hinterfragt werden, ob in gesunden Mäusen wie hier verwendet, ein signifikanter osteoinduktiver Effekt erwarten werden kann. Sowohl der kortikale wie auch der trabekuläre Knochen wurde gemäß dem Modell von Zilber et al. (52) affektiert, jedoch wurde hiermit die Knochenhomöostase möglicherweise nicht bzw. nur in geringem Maße beeinflusst. Zu diskutieren bleibt, ob mit einem größerer Defekt im Sinne eines „critical-size“-Modells die Wirkung von BDI-Hydrogel und BMP-7 auf die geschaffene Pseudarthrose überprüft worden wäre.

Um den Fragestellungen 5) und 6) hinsichtlich der nun anstehenden nächsten Schritte näherzukommen, ist in jedem Fall ein Übergang zu einem Osteoporose- Mausmodell unabdingbar, nachdem Nagetiere auf Faktoren, die Osteoporose auslösen, vergleichbar wie der menschliche Organismus reagieren (54, 83). Anschließend kann eine Übertragbarkeit vom Osteoporose-Tiermodell auf den Menschen überlegt werden.

Vor dem Übergang in ein osteoporotisches Mausmodell wäre es jedoch sinnvoll sowohl *in vivo* wie auch *in vitro* unterschiedliche Konzentrationen von BMP-7 im BDI-Hydrogel miteinander zu vergleichen. In Folgeversuchen sollte darüber hinaus in

regelmäßigen Abständen die BMP-7-Konzentration im Urin und im Serum bestimmt werden. Um in weiteren Versuchen eine *in-situ*-Visualisierung des Hydrogels zu ermöglichen, wäre eine Beimengung von röntgenpositiven Materialien gegebenenfalls sinnvoll; um zwischen endo- und exogenem BMP-7 zu unterscheiden wäre ein GFP-I-Labeling oder ein His-Tagging von BMP-7 zu überdenken. Diese Markierung wäre auch sinnvoll, um ein potentiell verfrühtes Abfluten von BMP-7 oder eine fehlende bzw. mangelnde Freisetzung aus dem Gel festzustellen.

Um eine bessere Unterscheidbarkeit der fluoreszierenden Banden in der Fluoreszenzmikroskopie zu gewährleisten, könnte man bei Folgeversuchen mit zwei oder mehr unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen arbeiten (Calcein grün-gelb/Tetracyclin orange-gelb).

*In vitro*-Versuche zur Freisetzung von unterschiedlichen BMP-7-Konzentrationen aus dem BDI-Hydrogel würden zusätzliche Informationen zu dem Paul et. al. bereits beschriebenen dosisabhängigen BMP-7-release ermöglichen (77).

Durch die Wahl der Untersuchungszeiträume (4 Wochen / 12 Wochen) kann ein „BMP-7-peak“ vor oder nach diesen Versuchsendpunkten nicht überprüft werden. Nachfolgende Versuche könnten dies durch die Festlegung mehrerer Versuchsendpunkte aufzeigen.

Ein weiterer Ausblick stellt die Beladung des BDI-Hydrogels mit anderen osteoinduktiven Substanzen dar, wobei Anti-Sclerostin-Antikörper geeignete Osteoinduktiva darstellen könnten (84, 85).

## 6 Zusammenfassung

Aufgrund unserer alternden Gesellschaft wird die Inzidenz Osteoporose-assoziiertes Frakturen ansteigen. Die proximale Femurfraktur stellt eine der häufigsten und prognostisch schwerwiegendsten Manifestationen der Osteoporose dar und geht mit einer steigenden Inzidenz einher. Patienten mit einer osteoporotischen Fraktur des proximalen Femurs haben zudem ein hohes Risiko für eine sekundäre Fraktur auf der kontralateralen Seite.

Es ist bekannt, dass der Wachstumsfaktor BMP-7 die Knochenbildung stimuliert. Die lokale prophylaktische Augmentation des proximalen Femurs mit BMP-7-beladenem thermosensitiven BDI-Hydrogel könnte geeignet sein, das Risiko von Osteoporose-assoziierten Sekundärfrakturen zu senken. In der vorliegenden Studie wurde an adulten, männlichen C57BL/6 Mäusen (n=36) untersucht, ob ein intramedullär im Femur appliziertes thermoresponsives BDI-Hydrogel sowie die Kombination aus dem BDI-Hydrogel und BMP-7 biokompatibel ist und das von uns verwendete Modell geeignet ist, um diese Frage zu klären (Gruppe A: 10 µl BDI-Hydrogel + BMP 7, Gruppe B: 10 µl Hydrogel, Gruppe C: 10 µl NaCl). Zudem sollte überprüft werden, ob bereits in dieser Pilotstudie ein osteoinduktives Potential der Kombination aus BDI-Hydrogel und BMP-7 gezeigt werden kann.

Mittels µ-CT-Analyse sowie immunhistochemischen und histomorphometrischen Ergebnissen wurden die augmentierten Knochen sowie die kontralateralen Femora nach 4 bzw. 12 Wochen untersucht.

Wir konnten zeigen, dass die intramedulläre Applikation von BDI-Hydrogel von den Mäusen gut vertragen wurde. Dies gilt auch für das BMP-7-beladene Hydrogel. Eine Osteoinduktivität von BMP-7 und BDI-Hydrogel konnte in diesem Versuch nicht

detektiert werden. Hier sind Folgeversuche notwendig, um die Basis für die Translation in die Klinik zu schaffen.



## 7 Anhang

### Protokoll 1: Herstellung der Gebrauchslösungen für die Kunststoffeinbettung der Femora

#### Entstabilisierung des Methylmethacrylats

- Chromatographiesäule mit 50 g Aluminiumoxid gefüllt und langsamer Durchlauf von stabilisiertem Methylmethacrylat

#### Präinfiltrationslösung 1

- 100 ml stabilisiertes Methylmethacrylat und 100 ml Xylol (Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland)

#### Präinfiltrationslösung 2

- 200 ml stabilisiertes Methylmethacrylat und 0,67 g Dibenzoylperoxid (Härter 1)

#### Präinfiltrationslösung 3

- 200 ml entstabilisiertes Methylmethacrylat und 1 g Dibenzoylperoxid (Härter 1)

#### Infiltrationslösung

- 200 ml entstabilisiertes Methylmethacrylat, 16 g Polymethylmethacrylat und 0,8 g Dibenzoylperoxid (Härter 1)

#### Polymerisationsansatz: Lösung A + Lösung B (1:10)

- Lösung A: 200 ml entstabilisiertes Methylmethacrylat, 32 g Polymethylmethacrylat und 2 g Dibenzoylperoxid (Härter 1)
- Lösung B; 20 ml entstabilisiertes Methylmethacrylat, 16 g Tetramethylanilin (Härter 2) und 0,8 ml 1-Decanthiol (Regler)

## **Protokoll 2: Die Kunststoffeinfbettung der Femora**

1. Dehydratation der Tibiafragmente in aufsteigender Alkoholreihe (Ethanol 70%; 80%, 90%, 96%, 100%) je 8 h, 4°C
2. Entfettung in Xylol, 2 x 8 h, 4°C
3. Präinfiltration 1, 12 h, 4°C
4. Präinfiltration 2, 12 h, 4°C
5. Präinfiltration 3, 12 h, 4°C
6. Infiltration, 4 d, 4°C
7. Positionierung der Femorafragmente in den Einbettformen (Heraeus Kulzer GmbH & Co. KG, Wehrheim Deutschland), Übergießen mit Monomergemisch
8. Evakuierung in Exsikkator, 15 min
9. Aushärten, 6-10 d, -7°C

## **Protokoll 3: Immunhistochemischer Nachweis von BMP-7**

Folgende Puffer, Seren und Waschlösungen wurden vor dem jeweiligen Gebrauch angesetzt:

Tris buffered saline (TBS, 5x Stammlösung):

- 0,1 M Tris - (hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS) + 1,5 M NaCl; mit HCl auf pH 7,5 eingestellt

Tris-hydrochlorid-Puffer

- 0,1 M Tris-hydrochlorid + Aq. dest.; mit HCl auf pH 3,7 eingestellt

Blockierserum

- 50 µl Pferdeserum + 10 ml 0,1 M Tris-hydrochlorid-Puffer

Entwicklungspuffer

- 4 ml TBS (5x) + 16 ml Aq. dest. + 10 mg DAB + 6,4 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30%

## Ansatz für die Avidin-Biotin-Komplex-Reaktion (ABC-Reagenz)

- 4 Tr. Lösung A (Avidin-Lösung) aus dem Vectastain ® Elite ABC Kit (Vector Laboratories Inc., Burlingame, USA)
- + 4 Tr. Lösung B (biotinylierte Peroxidase) aus dem Vectastain ® Elite ABC Kit
- + 10 ml 0,1 M Tris-hydrochlorid-Puffer

## Protokoll für den immunhistochemischen Nachweis von BMP-7:

1. Shandon™ Xylolersatz für 24 h
2. Spülen in Aq. dest., 5 min
3. 2 M HCl, 60 min, 37°C
4. Spülen in Aq. dest., 5 min
5. Spülen in 0,1 M Tris-hydrochlorid-Puffer (pH 3,7), 5 min
6. Trypsin (0,5 mg/ml) in 0,1 M CaCl<sub>2</sub>, 30 min, 37°C
7. Spülen mit 0,1 M Tris-hydrochlorid-Puffer (pH 3,7), 5 min
8. Hemmen der endogenen Peroxidase mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10%, 30 min
9. Spülen in Aq. dest., 5 min
10. Blockieren unspezifischer Reaktionen mit Blockierserum, 75 min
11. Primärantikörper BMP-7 (polyklonaler rabbit-anti-BMP-7-Antikörper, in Blockierserum 1:200 verdünnt, 4°C, über Nacht (Abcam, Cambridge, UK)
12. Spülen mit 0,1 M Tris-hydrochlorid-Puffer (pH 3,7), 5 min
13. Zweitantikörper (Biotin-konjugierter Ziege-anti-rabbit-Antikörper), 30 min bei Raumtemperatur
14. Spülen mit 0,1 M Tris-hydrochlorid-Puffer (pH 3,7), 5 min
15. ABC-Reagenz, 30 min bei Raumtemperatur
16. Spülen in 0,1 M TBS-Puffer (pH 7,5), 5 min
17. Entwicklungspuffer, 3 min

18. Spülen in 0,1 M TBS-Puffer (pH 7,5), 5 min
19. Gegenfärbung mit Mayers Hämalan, 30 s
20. Bläuen unter fließendem Leitungswasser, 10 min
21. Eindecken mit Aquatex ®

#### **Protokoll 4: Die Masson-Goldner-Trichrom-Färbung:**

Diese Färbung beruht auf der Anwendung disperser Farbstoffe (55):

Ponceau-Säurefuchsin-Azophloxin (250 ml Ansatz)

- 25 ml Masson-Lösung
- 5 ml Azophloxin-Lösung (0,5 g Azophloxin + 200 ml Aq. dest.+ 2 ml Essigsäure 25%)
- 220 ml Essigsäure 0,2%

Molybdatophosphorsäure/Orange G

- 6 g Molybdatophosphorsäure + 100 ml Aq. dest.
- 4 g Orange G + 100 ml Aq. dest.

Lichtgrün-Färbelösung

- 0,25 g Lichtgrün + 250 ml Essigsäure 0,2%

Masson-Lösung: Lösung A+ Lösung B (1:3)

- Lösung A: 1 g Säurefuchsin + 100 ml Aq. dest. + 1 ml Essigsäure 25%
- Lösung B: 2 g Ponceau Xylidin + 200 ml Aq. dest. + 2 ml Essigsäure 25%

#### Protokoll für die Masson-Goldner-Trichrom-Färbung:

1. Weigert Eisenhämatoxylin, 10 min
2. Bläuen unter fließendem Leitungswasser, 6 min
3. Spülen in Aq. dest., 10 s
4. Ponceau-Säurefuchsin-Azophloxin, 45 min

5. Spülen in Essigsäure 1%, 2x 30 s
6. Molybdätophosphorsäure/Orange G, 7 min
7. Spülen in Essigsäure 1%, 2 x 30 s
8. Lichtgrün, 40 min
9. Spülen in Essigsäure 1%, 2x 30 s
10. Spülen in Aq. dest., 10 s
11. Aufsteigende Alkoholreihe (Ethanol 70%, 80%, 90%, 96%, 100%), je 2 min
12. Xylol, 2h
13. Eindecken mit DPX ®

#### **Protokoll 5: Die Van-Kossa-Hämatoxylin-Eosin-Färbung:**

##### 1. Silberfärbung:

- 1.1 0,3 M Silbernitrat-Lösung, 60 min
- 1.2 Spülen in Aq. dest., 3x 30 s
- 1.3 0,2 M Natriumthiosulfat-Lösung, 5 min
- 1.4 Spülen unter fließendem Leitungswasser
- 1.5 Spülen in Aq. dest, 30 s

##### 2. Gegenfärbung (Hämatoxylin-Eosin, HE):

- 2.1 Mayers Hämalaun, 6 min
- 2.2 Bläuen unter fließendem Leitungswasser, 10 min
- 2.3 Eosin G-Lösung 0,1%, 3 min
- 2.4 Spülen in Aq. dest., 30 s
- 2.5 Aufsteigende Alkoholreihe (Ethanol 70 %, 80%, 90%, 96%, 100%) je 20 s
- 2.6 Trocknen der Präparate zwischen Filterpapier
- 2.7 Xylol, 1 h
- 2.8 Eindecken mit Entellan ®

**Tabelle 8: Quantitative Analyse des trabekulären Knochens auf der operierten rechten Seite im Bereich des Schenkelhalses - Vergleich nach Art der Behandlung und Dauer der Beobachtungszeit**

	BV/TV				TbN				TbTh			
	Sham	Hydro	BMP	p-Wert	Sham	Hydro	BMP	p-Wert	Sham	Hydro	BMP	p-Wert
<b>4 Wochen</b>	6,083 (4,088- 15,370)	4,510 (2,337- 13,640)	6,564 (1,827- 11,400)	n.s.	1,066 (0,696- 2,858)	0,870 (0,115- 1,981)	1,192 (0,352- 1,667)	n.s.	0,057 (0,052- 0,079)	0,057 (0,021- 0,069)	0,053 (0,042- 0,085)	n.s.
<b>12 Wochen</b>	8,509 (3,633- 15,970)	6,519 (0,620- 14,480)	12,530 (1,134- 13,320)	n.s.	1,163 (0,625- 2,294)	0,884 (0,172- 2,181)	1,710 (0,287- 1,767)	n.s.	0,07 (0,057- 0,075)	0,068 (0,036- 0,08)	0,071 (0,040- 0,077)	n.s.
<b>p-Wert</b>	n.s.	n.s.	n.s.		n.s.	n.s.	n.s.		n.s.	n.s.	n.s.	
	TbSp				DA				TbBMD			
	Sham	Hydro	BMP	p-Wert	Sham	Hydro	BMP	p-Wert	Sham	Hydro	BMP	p-Wert
<b>4 Wochen</b>	0,169 (0,147- 0,193)	0,1895 (0,167- 0,211)	0,169 (0,137- 0,195)	n.s.	n.a.				0,268 (0,166- 0,282)	0,209 (0,138- 0,241)	0,196 (0,167- 0,277)	n.s.
<b>12 Wochen</b>	0,168 (0,132- 0,193)	0,185 (0,169- 0,202)	0,179 (0,157- 0,202)	n.s.					0,232 (0,156- 0,297)	0,2425 (0,198- 0,274)	0,266 (0,168- 0,301)	n.s.
<b>p-Wert</b>	n.s.	n.s.	n.s.						n.s.	n.s.	n.s.	

**Tabelle 9: Quantitative Analyse des trabekulären Knochens auf der nicht-operierten linken Seite im Bereich des Schenkelhalses - Vergleich nach Art der Behandlung und Dauer der Beobachtungszeit**

	BV/TV				TbN				TbTh			
	Sham	Hydro	BMP	p-Wert	Sham	Hydro	BMP	p-Wert	Sham	Hydro	BMP	p-Wert
<b>4 Wochen</b>	7,026 (2,473-14,120)	7,403 (3,265-13,46)	6,626 (1,434-20,13)	n.s.	1,256 (0,526-1,954)	1,201 (0,686-1,898)	1,056 (0,256-2,780)	n.s.	0,065 (0,047-0,09)	0,071 (0,047-0,079)	0,063 (0,043-0,08)	n.s.
<b>12 Wochen</b>	6,500 (0,1470-11,020)	4,455 (0,062-12,38)	9,806 (1,881-24,17)	n.s.	1,175 (0,064-1,646)	0,849 (0,03-1,633)	1,059 (0,405-2,913)	n.s.	0,064 (0,021-0,075)	0,053 (0,021-0,076)	0,076 (0,047-0,092)	n.s.
<b>p-Wert</b>	n.s.	n.s.	n.s.		n.s.	n.s.	n.s.		n.s.	n.s.	n.s.	
	TbSp				DA				TbBMD			
	Sham	Hydro	BMP	p-Wert	Sham	Hydro	BMP	p-Wert	Sham	Hydro	BMP	p-Wert
<b>4 Wochen</b>	0,192 (0,169-0,203)	0,175 (0,158-0,191)	0,189 (0,152-0,191)	n.s.	n.a.				0,236 (0,160-0,270)	0,213 (0,176-0,279)	0,188 (0,172-0,293)	n.s.
<b>12 Wochen</b>	0,185 (0,161-0,188)	0,185 (0,174-0,199)	0,181 (0,167-0,189)	n.s.					0,22 (0,154-0,285)	0,232 (0,176-0,298)	0,237 (0,200-0,368)	n.s.
<b>p-Wert</b>	n.s.	n.s.	n.s.						n.s.	n.s.	n.s.	

**Tabelle 10: Vergleich der operierten rechten Seite und der nicht-operierten linken Seite im Bereich des Schenkelhalses (trabekulär)**

		Sham			Hydro			BMP		
		rechts	links	p-Wert	rechts	links	p-Wert	rechts	links	p-Wert
<b>4 Wochen</b>	<b>BV/TV</b>	6,083 (4,088- 15,370)	7,026 (2,473- 14,12)	n.s.	4,510 (2,337- 13,640)	7,403 (3,265- 13,46)	n.s.	6,564 (1,827- 11,400)	6,626 (1,434- 20,130)	n.s.
	<b>TbN</b>	1,066 (0,696- 2,858)	1,256 (0,5260- 1,954)	n.s.	0,870 (0,115- 1,981)	1,201 (0,686- 1,898)	n.s.	1,192 (0,352- 1,667)	1,056 (0,256- 2,780)	n.s.
	<b>TbTh</b>	0,057 (0,052- 0,079)	0,065 (0,047- 0,09)	n.s.	0,057 (0,021- 0,069)	0,071 (0,047- 0,079)	n.s.	0,053 (0,042- 0,085)	0,063 (0,043- 0,080)	n.s.
	<b>TbSp</b>	0,169 (0,147- 0,193)	0,192 (0,1690- 0,2030)	0,043	0,1895 (0,167- 0,211)	0,175 (0,158- 0,191)	n.s.	0,169 (0,137- 0,195)	0,189 (0,152- 0,191)	n.s.
	<b>TbBMD</b>	0,268 (0,166- 0,282)	0,236 (0,1600- 0,2700)	n.s.	0,209 (0,138- 0,241)	0,213 (0,176- 0,279)	n.s.	0,196 (0,167- 0,277)	0,188 (0,172- 0,293)	n.s.
<b>12 Wochen</b>	<b>BV/TV</b>	8,509 (3,633- 15,970)	6,500 (0,1470- 11,02)	n.s.	6,519 (0,620- 14,480)	4,455 (0,062- 12,38)	n.s.	12,530 (1,134- 13,320)	9,806 (1,881- 24,17)	n.s.
	<b>TbN</b>	1,163 (0,625- 2,294)	1,175 (0,0640- 1,646)	n.s.	0,884 (0,172- 2,181)	0,849 (0,030- 1,633)	n.s.	1,710 (0,287- 1,767)	1,059 (0,405- 2,913)	n.s.
	<b>TbTh</b>	0,070 (0,057- 0,075)	0,064 (0,021- 0,0750)	n.s.	0,068 (0,036- 0,08)	0,0523 (0,021- 0,076)	0,028	0,071 (0,040- 0,077)	0,076 (0,047- 0,092)	n.s.
	<b>TbSp</b>	0,168 (0,132- 0,193)	0,185 (0,161- 0,1880)	n.s.	0,185 (0,169- 0,202)	0,185 (0,174- 0,199)	n.s.	0,179 (0,157- 0,202)	0,181 (0,167- 0,189)	n.s.
	<b>TbBMD</b>	0,232 (0,156- 0,297)	0,22 (0,154- 0,2850)	n.s.	0,243 (0,198- 0,274)	0,232 (0,176- 0,298)	n.s.	0,266 (0,168- 0,301)	0,237 (0,200- 0,368)	n.s.



**Tabelle 11: Quantitative Analyse des trabekulären Knochens auf der operierten rechten Seite im Bereich der proximalen Metaphyse - Vergleich nach Art der Behandlung und Dauer der Beobachtungszeit**

	BV/TV				TbN				TbTh			
	Sham	Hydro	BMP	p-Wert	Sham	Hydro	BMP	p-Wert	Sham	Hydro	BMP	p-Wert
<b>4 Wochen</b>	13,760 (12,050- 16,480)	13,300 (7,858- 16,490)	13,530 (8,339- 18,250)	n.s.	1,470 (1,369- 1,769)	1,391 (0,912- 1,623)	1,442 (0,967- 2,013)	n.s.	0,091 (0,083- 0,1)	0,098 (0,009- 0,108)	0,091 (0,086- 0,100)	n.s.
<b>12 Wochen</b>	10,790 (10,310- 13,630)*	15,160 (13,080- 20,070)*	13,350 (10,700- 17,910)	0,036	1,338 (1,046- 1,522)	1,621 (1,427- 1,964)	1,330 (0,93- 1,819)	n.s.	0,090 (0,077- 0,099)	0,095 (0,084- 0,102)	0,096 (0,091- 0,115)	n.s.
<b>p-Wert</b>	0,03	n.s.	n.s.		n.s.	n.s.	n.s.		n.s.	n.s.	n.s.	
	TbSp				DA				TbBMD			
	Sham	Hydro	BMP	p-Wert	Sham	Hydro	BMP	p-Wert	Sham	Hydro	BMP	p-Wert
<b>4 Wochen</b>	0,429 (0,387- 0,462)	0,475 (0,432- 0,482)	0,442 (0,394- 0,495)	n.s.	1,600 (1,431- 2,107)	1,566 (1,351- 2,166)	1,372 (1,24- 2,093)	n.s.	0,2275 (0,219- 0,252)	0,218 (0,176- 0,260)	0,224 (0,160- 0,238)	n.s.
<b>12 Wochen</b>	0,478 (0,432- 0,513)	0,445 (0,378- 0,493)	0,483 (0,422- 0,512)	n.s.	1,804 (1,558- 2,063)	1,494 (1,383- 1,669)*	1,97 (1,665- 2,444)*	0,002	0,199 (0,194- 0,23)*	0,249 (0,222- 0,284)*	0,220 (0,199- 0,261)	0,014
<b>p-Wert</b>	n.s.	n.s.	n.s.		n.s.	n.s.	0,026		n.s.	n.s.	n.s.	

\* Post-hoc  $p < 0.05$

**Tabelle 12: Quantitative Analyse des trabekulären Knochens auf der nicht-operierten linken Seite im Bereich der proximalen Metaphyse - Vergleich nach Art der Behandlung und Dauer der Beobachtungszeit**

	BV/TV				TbN				TbTh			
	Sham	Hydro	BMP	p-Wert	Sham	Hydro	BMP	p-Wert	Sham	Hydro	BMP	p-Wert
<b>4 Wochen</b>	12,950 (11,160- 21,140)	16,670 (10,890- 18,560)	13,490 (11,370- 19,790)	n.s.	1,514 (1,259- 1,935)	1,688 (1,359- 1,808)	1,361 (1,158- 1,984)	n.s.	0,089 (0,082- 0,109)	0,099 (0,08- 0,104)	0,097 (0,09- 0,127)	n.s.
<b>12 Wochen</b>	14,46 (8,916- 17,000)	17,290 (13,230- 24,240)	15,430 (12,360- 29,450)	n.s.	1,485 (0,955- 1,976)	1,532 (1,436- 1,993)	1,499 (1,188- 2,609)	n.s.	0,093 (0,086- 0,102)*	0,104 (0,092- 0,122)*	0,104 (0,101- 0,113)	0,029
<b>p-Wert</b>	n.s.	n.s.	n.s.		n.s.	n.s.	n.s.		n.s.	n.s.	n.s.	
	TbSp				DA				TbBMD			
	Sham	Hydro	BMP	p-Wert	Sham	Hydro	BMP	p-Wert	Sham	Hydro	BMP	p-Wert
<b>4 Wochen</b>	0,401 (0,372- 0,486)	0,448 (0,372- 0,477)	0,455 (0,415- 0,489)	n.s.	1,613 (1,488- 1,706)	1,525 (1,227- 2,113)	1,542 (1,351- 2,437)	n.s.	0,23 (0,205- 0,283)	0,254 (0,194- 0,268)	0,237 (0,207- 0,285)	n.s.
<b>12 Wochen</b>	0,426 (0,391- 0,517)	0,456 (0,397- 0,511)	0,443 (0,386- 0,514)	n.s.	1,713 (1,491- 2,558)	1,595 (1,258- 1,874)	1,497 (1,39- 1,854)	n.s.	0,239 (0,181- 0,272)	0,259 (0,237- 0,34)	0,256 (0,214- 0,362)	n.s.
<b>p-Wert</b>	n.s.	n.s.	n.s.		n.s.	n.s.	n.s.		n.s.	n.s.	n.s.	

\* Post-hoc p<0.05

**Tabelle 13: Vergleich der operierten rechten Seite und der nicht-operierten linken Seite im Bereich der proximalen Metaphyse (trabekulär)**

		Sham			Hydro			BMP		
		rechts	links	p-Wert	rechts	links	p-Wert	rechts	links	p-Wert
<b>4 Wochen</b>	<b>BV/TV</b>	13,760 (12,050- 16,480)	12,950 (11,16- 21,14)	n.s.	13,300 (7,858- 16,49)	16,670 (10,890- 18,560)	0,046	13,530 (8,339- 18,25)	13,490 (11,370- 19,790)	n.s.
	<b>TbN</b>	1,470 (1,369- 1,769)	1,514 (1,259- 1,935)	n.s.	1,391 (0,912- 1,623)	1,688 (1,359- 1,808)	0,028	1,442 (0,967- 2,013)	1,361 (1,158- 1,984)	n.s.
	<b>TbTh</b>	0,091 (0,083- 0,100)	0,089 (0,082- 0,109)	0,028	0,098 (0,009- 0,108)	0,099 (0,08- 0,104)	n.s.	0,091 (0,086- 0,100)	0,097 (0,090- 0,127)	n.s.
	<b>TbSp</b>	0,429 (0,387- 0,462)	0,401 (0,372- 0,486)	n.s.	0,475 (0,432- 0,482)	0,448 (0,372- 0,477)	n.s.	0,442 (0,394- 0,495)	0,455 (0,415- 0,489)	n.s.
	<b>DA</b>	1,600 (1,431- 2,107)	1,613 (1,488- 1,706)	n.s.	1,566 (1,351- 2,166)	1,525 (1,227- 2,113)	n.s.	1,372 (1,240- 2,093)	1,542 (1,351- 2,437)	n.s.
	<b>TbBMD</b>	0,228 (0,219- 0,252)	0,230 (0,205- 0,283)	n.s.	0,218 (0,176- 0,26)	0,254 (0,194- 0,268)	0,046	0,224 (0,16- 0,238)	0,2365 (0,207- 0,285)	n.s.
<b>12 Wochen</b>	<b>BV/TV</b>	10,790 (10,310- 13,630)	14,46 (8,916- 17,00)	n.s.	15,16 (13,080- 20,070)	17,29 (13,230- 24,240)	n.s.	13,35 (10,70- 17,91)	15,43 (12,36- 29,45)	n.s.
	<b>TbN</b>	1,338 (1,046- 1,522)	1,485 (0,955- 1,976)	n.s.	1,621 (1,427- 1,964)	1,532 (1,436- 1,993)	n.s.	1,330 (0,93- 1,819)	1,499 (1,188- 2,609)	n.s.
	<b>TbTh</b>	0,090 (0,077- 0,099)	0,093* (0,086- 0,102)	n.s.	0,095 (0,084- 0,102)	0,104 (0,092- 0,122)	0,028	0,096 (0,091- 0,115)	0,104 (0,101- 0,113)	n.s.
	<b>TbSp</b>	0,478 (0,432- 0,513)	0,4255 (0,391- 0,517)	n.s.	0,445 (0,378- 0,493)	0,456 (0,397- 0,511)	n.s.	0,483 (0,422- 0,512)	0,443 (0,386- 0,514)	n.s.
	<b>DA</b>	1,804 (1,558- 2,063)	1,713 (1,491- 2,558)	n.s.	1,494 (1,383- 1,669)	1,595 (1,258- 1,874)	n.s.	1,97 (1,665- 2,444)	1,497 (1,390- 1,854)	0,046
	<b>TbBMD</b>	0,199 (0,194- 0,230)	0,239 (0,181- 0,272)	n.s.	0,249 (0,222- 0,284)	0,259 (0,237- 0,340)	n.s.	0,2200 (0,199- 0,261)	0,256 (0,214- 0,362)	0,046

**Tabelle 14: Quantitative Analyse des trabekulären Knochens auf der operierten rechten Seite im Bereich des distalen Femurs - Vergleich nach Art der Behandlung und Dauer der Beobachtungszeit**

	BV/TV				TbN				TbTh			
	Sham	Hydro	BMP	p-Wert	Sham	Hydro	BMP	p-Wert	Sham	Hydro	BMP	p-Wert
<b>4 Wochen</b>	7,292 (4,629- 8,790)	8,512 (6,120- 10,600)*	5,236 (4,013- 6,650)*	0,016	1,020 (0,670- 1,186)	1,067 (0,840- 1,246)*	0,726 (0,560- 0,9320)*	0,022	0,072 (0,069- 0,074)	0,079 (0,066- 0,098)	0,071 (0,065- 0,072)	n.s.
<b>12 Wochen</b>	7,791 (5,336- 10,330)	8,173 (4,033- 10,050)	6,730 (5,651- 11,720)	n.s.	0,9380 (0,621- 1,290)	1,004 (0,559- 1,240)	0,8960 (0,817- 1,474)	n.s.	0,0865 (0,077- 0,089)	0,079 (0,072- 0,09)	0,076 (0,069- 0,087)	n.s.
<b>p-Wert</b>	n.s.	n.s.	n.s.		n.s.	n.s.	n.s.		0,002	n.s.	n.s.	
	TbSp				DA				TbBMD			
	Sham	Hydro	BMP	p-Wert	Sham	Hydro	BMP	p-Wert	Sham	Hydro	BMP	p-Wert
<b>4 Wochen</b>	0,337 (0,306- 0,391)	0,388 (0,331- 0,5160)	0,377 (0,352- 0,441)	n.s.	1,541 (1,470- 2,112)	1,675 (1,192- 3,063)	1,778 (1,366- 1,895)	n.s.	0,177 (0,158- 0,205)	0,173 (0,161- 0,205)	0,156 (0,133- 0,181)	n.s.
<b>12 Wochen</b>	0,3925 (0,356- 0,480)	0,406 (0,322- 0,497)	0,3585 (0,338- 0,470)	n.s.	1,502 (1,493- 2,065)	1,702 (1,442- 1,905)	1,836 (1,478- 2,362)	n.s.	0,1765 (0,148- 0,194)	0,18 (0,149- 0,215)	0,171 (0,159- 0,205)	n.s.
<b>p-Wert</b>	0,015	n.s.	n.s.		n.s.	n.s.	n.s.		n.s.	n.s.	n.s.	

\* Post-hoc  $p < 0.05$

**Tabelle 15: Quantitative Analyse des trabekulären Knochens auf der nicht-operierten linken Seite im Bereich des distalen Femurs - Vergleich nach Art der Behandlung und Dauer der Beobachtungszeit**

	BV/TV				TbN				TbTh			
	Sham	Hydro	BMP	p-Wert	Sham	Hydro	BMP	p-Wert	Sham	Hydro	BMP	p-Wert
<b>4 Wochen</b>	7,353 (5,256- 10,480)	7,418 (4,741- 10,300)	5,31 (2,673- 11,790)	n.s.	1,044 (0,775- 1,396)	0,984 (0,698- 1,210)	0,788 (0,443- 1,508)	n.s.	0,069 (0,063- 0,083)	0,073 (0,066- 0,085)	0,068 (0,060- 0,078)	n.s.
<b>12 Wochen</b>	7,579 (5,746- 11,590)	8,625 (6,587- 11,800)	8,871 (6,121- 13,450)	n.s.	0,94 (0,644- 1,418)	0,970 (0,885- 1,341)	1,141 (0,867- 1,623)	n.s.	0,081 (0,079- 0,089)	0,083 (0,074- 0,097)	0,077 (0,071- 0,085)	n.s.
<b>p-Wert</b>	n.s.	n.s.	0,041		n.s.	n.s.	n.s.		n.s.	n.s.	0,041	
	TbSp				DA				TbBMD			
	Sham	Hydro	BMP	p-Wert	Sham	Hydro	BMP	p-Wert	Sham	Hydro	BMP	p-Wert
<b>4 Wochen</b>	0,332 (0,307- 0,410)	0,393 (0,327- 0,548)	0,358 (0,310- 0,412)	n.s.	1,920 (1,682- 2,097)	1,957 (1,814- 2,468)	1,858 (1,582- 2,671)	n.s.	0,178 (0,1610- 0,204)	0,1805 (0,141- 0,204)	0,172 (0,134- 0,220)	n.s.
<b>12 Wochen</b>	0,341 (0,329- 0,516)	0,356 (0,334- 0,466)	0,315 (0,291- 0,403)	n.s.	1,930 (1,609- 2,324)	2,229 (1,383- 2,921)	1,830 (1,386- 2,213)	n.s.	0,184 (0,161- 0,216)	0,199 (0,153- 0,233)	0,202 (0,160- 0,230)	n.s.
<b>p-Wert</b>	n.s.	n.s.	n.s.		n.s.	n.s.	n.s.		n.s.	n.s.	n.s.	

**Tabelle 16: Vergleich der operierten rechten Seite und der nicht-operierten linken Seite im Bereich des distalen Femurs (trabekulär)**

		Sham			Hydro			BMP			
		rechts	links	p-Wert	rechts	links	p-Wert	rechts	links	p-Wert	
<b>4</b>	<b>Wochen</b>	<b>BV/TV</b>	7,292 (4,629-8,790)	7,353 (5,256-10,480)	n.s.	8,512 (6,120-10,600)	7,418 (4,741-10,300)	n.s.	5,236 (4,013-6,650)	5,31 (2,673-11,790)	n.s.
		<b>TbN</b>	1,020 (0,670-1,186)	1,044 (0,775-1,396)	n.s.	1,067 (0,840-1,246)	0,984 (0,698-1,210)	n.s.	0,7260* (0,560-0,932)	0,788 (0,443-1,508)	n.s.
		<b>TbTh</b>	0,072 (0,069-0,074)	0,069 (0,063-0,083)	n.s.	0,0790 (0,066-0,098)	0,073 (0,066-0,085)	n.s.	0,0710 (0,065-0,072)	0,068 (0,060-0,0780)	n.s.
		<b>TbSp</b>	0,337 (0,306-0,391)	0,332 (0,307-0,41)	n.s.	0,3880 (0,331-0,516)	0,393 (0,327-0,548)	n.s.	0,377 (0,352-0,441)	0,358 (0,310-0,412)	n.s.
		<b>DA</b>	1,541 (1,470-2,112)	1,920 (1,682-2,097)	0,046	1,675 (1,192-3,063)	1,957 (1,814-2,468)	n.s.	1,778 (1,366-1,895)	1,858 (1,582-2,671)	n.s.
		<b>TbBMD</b>	0,177 (0,158-0,205)	0,178 (0,161-0,204)	n.s.	0,173 (0,161-0,205)	0,181 (0,141-0,204)	n.s.	0,156 (0,133-0,181)	0,172 (0,134-0,22)	n.s.
		<b>BV/TV</b>	7,791 (5,336-10,33)	7,579 (5,746-11,59)	n.s.	8,173 (4,033-10,05)	8,625 (6,587-11,8)	n.s.	6,730 (5,651-11,72)	8,871 (6,121-13,45)	0,046
		<b>TbN</b>	0,938 (0,621-1,290)	0,94 (0,644-1,418)	n.s.	1,004 (0,559-1,240)	0,97 (0,885-1,341)	n.s.	0,8960 (0,817-1,474)	1,141 (0,867-1,623)	0,028
		<b>TbTh</b>	0,087 (0,077-0,089)	0,081 (0,079-0,089)	n.s.	0,0795 (0,072-0,09)	0,083 (0,074-0,097)	n.s.	0,0755 (0,069-0,087)	0,077 (0,071-0,085)	n.s.
		<b>TbSp</b>	0,393 (0,356-0,480)	0,341 (0,329-0,516)	n.s.	0,4060 (0,322-0,4970)	0,3555 (0,334-0,466)	n.s.	0,359 (0,338-0,470)	0,315 (0,291-0,403)	0,028
		<b>DA</b>	1,502 (1,493-2,065)	1,93 (1,609-2,324)	n.s.	1,702 (1,442-1,905)	2,229 (1,383-2,921)	n.s.	1,836 (1,478-2,362)	1,830 (1,386-2,213)	n.s.
		<b>TbBMD</b>	0,177 (0,148-0,194)	0,184 (0,161-0,216)	n.s.	0,180 (0,149-0,215)	0,199 (0,153-0,233)	n.s.	0,171 (0,159-0,205)	0,202 (0,16-0,23)	0,043

**Tabelle 17: Quantitative Analyse des kortikalen Knochens auf der operierten rechten Seite im Bereich des Schenkelhalses - Vergleich nach Art der Behandlung und Dauer der Beobachtungszeit**

	B.ar/T.ar				CtTh				CtBMD			
	Sham	Hydro	BMP	p-Wert	Sham	Hydro	BMP	p-Wert	Sham	Hydro	BMP	p-Wert
<b>4 Wochen</b>	61,790 (48,350- 67,100)	54,890 (49,460- 56,750)	52,050 (42,200- 57,050)	n.s.	0,1025 (0,098- 0,106)	0,097 (0,090- 0,105)	0,1005 (0,094- 0,104)	n.s.	1,094 (1,049- 1,147) <sup>°*</sup>	1,032 (0,976- 1,055) <sup>*</sup>	1,003 (0,961- 1,082) <sup>°</sup>	0,006
<b>12 Wochen</b>	51,83 (49,220- 65,280)	54,860 (47,140- 58,72)	50,510 (43,000- 54,600)	n.s.	n.a.				1,080 (1,022- 1,107)	1,107 (1,000- 1,148)	1,079 (1,027- 1,100)	n.s.
<b>p-Wert</b>	n.s.	n.s.	n.s.						n.s.	0,041	n.s.	

\* Post-hoc p<0.05; ° Post-hoc p<0.05

**Tabelle 18: Quantitative Analyse des kortikalen Knochens auf der nicht-operierten linken Seite im Bereich des Schenkelhalses - Vergleich nach Art der Behandlung und Dauer der Beobachtungszeit**

	B.ar/T.ar				CtTh				CtBMD			
	Sham	Hydro	BMP	p-Wert	Sham	Hydro	BMP	p-Wert	Sham	Hydro	BMP	p-Wert
<b>4 Wochen</b>	63,720 (42,910-66,440)	48,750 (42,640-49,710)	49,840 (42,910-66,44)	n.s.	0,101 (0,082-0,112)	0,099 (0,095-0,108)	0,102 (0,099-0,107)	n.s.	1,044 (0,990-1,083)	1,014 (0,580-1,043)	1,034 (1,008-1,081)	n.s.
<b>12 Wochen</b>	53,160 (45,520-62,780)	47,750 (38,700-59,380)	48,140 (41,330-52,060)	n.s.	n.a.			-	1,132 (1,079-1,147)	1,116 (0,991-1,178)	1,127 (1,066-1,138)	n.s.
<b>p-Wert</b>	n.s.	n.s.	n.s.		-	-	-		0,009	n.s.	n.s.	



**Tabelle 19: Vergleich der operierten rechten Seite und der nicht-operierten linken Seite im Bereich des Schenkelhalses (kortikal)**

		Sham			Hydro			BMP		
		rechts	links	p-Wert	rechts	links	p-Wert	rechts	links	p-Wert
<b>4 Wochen</b>	<b>B.ar/T.ar</b>	61,790 (48,350- 67,100)	63,720 (42,910- 66,440)	n.s.	54,890 (49,460- 56,750)	48,750 (42,640- 49,710)	0,043	52,050 (42,200- 57,050)	49,840 (42,910- 66,440)	n.s.
	<b>CtTh</b>	0,103 (0,098- 0,106)	0,101 (0,082- 0,112)	n.s.	0,097 (0,090- 0,105)	0,099 (0,095- 0,108)	n.s.	0,101 (0,094- 0,104)	0,102 (0,099- 0,107)	n.s.
	<b>CTBMD</b>	1,094 (1,049- 1,147)	1,044 (0,99- 1,083)	0,028	1,032 (0,976- 1,055)	1,014 (0,580- 1,043)	n.s.	1,003 (0,961- 1,082)	1,034 (1,008- 1,081)	n.s.
<b>12 Wochen</b>	<b>B.ar/T.ar</b>	51,830 (49,220- 65,280)	53,160 (45,520- 62,780)	n.s.	54,86 (47,140- 58,720)	47,750 (38,70- 59,38)	0,046	50,510 (43,00- 54,60)	48,140 (41,330- 52,060)	n.s.
	<b>CTBMD</b>	1,080 (1,022- 1,107)	1,132 (1,079- 1,147)	0,043	1,107 (1,000- 1,148)	1,116 (0,991- 1,178)	n.s.	1,079 (1,027- 1,100)	1,127 (1,066- 1,138)	n.s.

**Tabelle 20: Quantitative Analyse des kortikalen Knochens auf der operierten rechten Seite im Bereich der proximalen Metaphyse - Vergleich nach Art der Behandlung und Dauer der Beobachtungszeit**

	B.ar/T.ar				CtTh				CtBMD			
	Sham	Hydro	BMP	p-Wert	Sham	Hydro	BMP	p-Wert	Sham	Hydro	BMP	p-Wert
<b>4 Wochen</b>	44,350 (38,52-46,94)	42,780 (38,570-45,000)	42,070 (35,860-44,390)	n.s.	0,117 (0,115-0,125)	0,118 (0,103-0,123)	0,116 (0,107-0,118)	n.s.	1,081 (1,045-1,104)*	1,051 (1,004-1,082)*	1,043 (1,039-1,070)	0,023
<b>12 Wochen</b>	43,970 (37,910-46,030)	45,240 (43,160-48,260)*	40,780 (34,110-43,450)*	0,012	n.a.				1,073 (1,052-1,120)°	1,124 (1,083-1,146)*°	1,077 (1,046-1,082)*	0,01
<b>p-Wert</b>	n.s.	n.s.	n.s.						n.s.	0,002	0,030	

\* Post-hoc  $p < 0.05$ ; ° Post-hoc  $p < 0.05$

**Tabelle 21: Quantitative Analyse des kortikalen Knochens auf der nicht-operierten linken Seite im Bereich der proximalen Metaphyse - Vergleich nach Art der Behandlung und Dauer der Beobachtungszeit**

	B.ar/T.ar				CtTh				CtBMD			
	Sham	Hydro	BMP	p-Wert	Sham	Hydro	BMP	p-Wert	Sham	Hydro	BMP	p-Wert
<b>4 Wochen</b>	42,140 (34,02-46)	39,650 (37,050-41,15)	42,74 (40,300-44,46)	n.s.	0,117 (0,112-0,122)	0,115 (0,113-0,12)	0,1165 (0,114-0,125)	n.s.	1,052 (1,004-1,093)	1,041 (1,037-1,056)	1,052 (1,025-1,109)	n.s.
<b>12 Wochen</b>	40,780 (40,060-44,300)	41,27 (35,610-44,120)	41,210 (38,700-46,830)	n.s.	n.a.				1,101 (1,041-1,155)	1,100 (1,049-1,132)	1,108 (1,088-1,131)	n.s.
<b>p-Wert</b>	n.s.	n.s.	n.s.						n.s.	0,004	0,026	

**Tabelle 22: Vergleich der operierten rechten Seite und der nicht-operierten linken Seite im Bereich der proximalen Metaphyse (kortikal)**

		Sham			Hydro			BMP		
		rechts	links	p-Wert	rechts	links	p-Wert	rechts	links	p-Wert
<b>4 Wochen</b>	<b>B.ar/T.ar</b>	44,35 (38,52- 46,940)	42,14 (34,02- 46,000)	n.s.	42,78 (38,57- 45)	39,65 (37,05- 41,15)	0,046	42,07 (35,860- 44,390)	42,74 (40,300- 44,460)	n.s.
	<b>CtTh</b>	0,117 (0,115- 0,125)	0,1165 (0,112- 0,1220)	n.s.	0,1175 (0,103- 0,123)	0,115 (0,113- 0,120)	n.s.	0,1155 (0,107- 0,118)	0,117 (0,114- 0,125)	n.s.
	<b>CtBMD</b>	1,085 (1,045- 1,104)	1,052 (1,004- 1,093)	0,028	1,052 (1,004- 1,082)	1,041 (1,037- 1,056)	n.s.	1,043 (1,039- 1,070)	1,052 (1,025- 1,109)	n.s.
<b>12 Wochen</b>	<b>B.ar/T.ar</b>	43,97 (37,910- 46,030)	40,78 (40,060- 44,300)	n.s.	45,24 (43,160- 48,260)	41,27 (35,610- 44,120)	0,028	40,78 (34,11- 43,45)	41,21 (38,700- 46,830)	n.s.
	<b>CTBMD</b>	1,073 (1,052- 1,120)	1,101 (1,041- 1,155)	n.s.	1,124 (1,083- 1,146)	1,100 (1,049- 1,132)	n.s.	1,077 (1,046- 1,082)	1,108 (1,088- 1,131)	0,028

**Tabelle 23: Quantitative Analyse des kortikalen Knochens auf der operierten rechten Seite im Bereich der Diaphyse - Vergleich nach Art der Behandlung und Dauer der Beobachtungszeit**

	B.ar/T.ar				CtTh				CtBMD			
	Sham	Hydro	BMP	p-Wert	Sham	Hydro	BMP	p-Wert	Sham	Hydro	BMP	p-Wert
<b>4 Wochen</b>	37,700 (31,430-42,810)	36,220 (32,880-39,250)	33,920 (28,220-37,210)	n.s.	0,144 (0,129-0,158)	0,142 (0,133-0,151)	0,144 (0,137-0,16)	n.s.	1,097 (1,069-1,154)	1,061 (0,981-1,098)	1,067 (0,999-1,113)	n.s.
<b>12 Wochen</b>	31,260 (27,420-36,860)*	33,430 (31,240-35,600)	37,840 (32,600-39,800)*	0,007	0,145 (0,137-0,149)	0,145 (0,136-0,159)	0,148 (0,143-0,151)	n.s.	1,104 (1,071-1,137)*	1,135 (1,123-1,14)*°	1,102 (1,089-1,109)°	0,004
<b>p-Wert</b>	0,026	n.s.	n.s.		n.s.	n.s.	n.s.		n.s.	0,004	n.s.	

\* Post-hoc  $p < 0.05$ ; ° Post-hoc  $p < 0.05$

**Tabelle 24: Quantitative Analyse des kortikalen Knochens auf der nicht-operierten linken Seite im Bereich der Diaphyse - Vergleich nach Art der Behandlung und Dauer der Beobachtungszeit**

	B.ar/T.ar				CtTh				CtBMD			
	Sham	Hydro	BMP	p-Wert	Sham	Hydro	BMP	p-Wert	Sham	Hydro	BMP	p-Wert
<b>4 Wochen</b>	37,250 (36,670-38,340)	35,060 (33,250-37,820)	36,790 (32,020-40,770)	n.s.	0,142 (0,132-0,148)	0,144 (0,135-0,157)	0,146 (0,144-0,151)	n.s.	1,092 (1,048-1,110)	1,074 (1,059-1,083)	1,088 (1,064-1,129)	n.s.
<b>12 Wochen</b>	32,370 (30,830-44,240)	34,510 (29,560-40,620)	37,430 (30,920-40,430)	n.s.	0,147 (0,144-0,161)	0,146 (0,129-0,161)	0,147 (0,135-0,150)	n.s.	1,137 (1,082-1,156)	1,125 (1,086-1,182)	1,146 (1,086-1,166)	n.s.
	n.s.	n.s.	n.s.		n.s.	n.s.	n.s.		n.s.	0,002	0,015	

**Tabelle 25: Vergleich der operierten rechten Seite und der nicht-operierten linken Seite im Bereich der Diaphyse (kortikal)**

		Sham			Hydro			BMP		
		rechts	links	p-Wert	rechts	links	p-Wert	rechts	links	p-Wert
<b>4 Wochen</b>	<b>B.ar/T.ar</b>	37,700 (31,430- 42,810)	37,250 (36,670- 38,34)	n.s.	36,220 (32,88- 39,25)	35,060 (33,250- 37,820)	n.s.	33,920 (28,220- 37,210)	36,790 (32,020- 40,770)	n.s.
	<b>CtTh</b>	0,144 (0,129- 0,158)	0,142 (0,132- 0,148)	n.s.	0,142 (0,133- 0,151)	0,144 (0,135- 0,157)	n.s.	0,144 (0,137- 0,16)	0,146 (0,144- 0,151)	n.s.
	<b>CTBMD</b>	1,097 (1,069- 1,154)	1,092 (1,048- 1,110)	n.s.	1,061 (0,981- 1,098)	1,074 (1,059- 1,083)	n.s.	1,067 (0,999- 1,113)	1,088 (1,064- 1,129)	n.s.
<b>12 Wochen</b>	<b>B.ar/T.ar</b>	31,260 (27,420- 36,860)	32,370 (30,830- 44,240)	n.s.	33,430 (31,240- 35,600)	34,510 (29,560- 40,620)	n.s.	37,840 (32,600- 39,8)	37,430 (30,920- 40,430)	n.s.
	<b>CtTh</b>	0,145 (0,137- 0,149)	0,147 (0,144- 0,161)	n.s.	0,145 (0,136- 0,159)	0,146 (0,129- 0,161)	n.s.	0,1475 (0,143- 0,151)	0,147 (0,135- 0,150)	n.s.
	<b>CtBMD</b>	1,104 (1,071- 1,137)	1,137 (1,082- 1,156)	0,043	1,135 (1,123- 1,140)	1,125 (1,086- 1,182)	n.s.	1,102 (1,089- 1,109)	1,146 (1,086- 1,166)	0,046

**Tabelle 26: Vergleich der unterschiedlichen Knochenregionen (kortikal)**

4 Wochen	CtTh			CtBMD			B.ar/T.ar		
	DIA	PM	SH	DIA	PM	SH	DIA	PM	SH
BMP	0,144 (0,137- 0,160)*	0,116 (0,107- 0,118)	0,1005 (0,094- 0,104)*	1,067 (0,999- 1,113)	1,043 (1,039- 1,070)	1,003 (0,961- 1,082)	33,92 (28,22- 37,21)*	42,07 (35,86- 44,39)	52,05 (42,20- 57,05)*
Hydro	0,142 (0,133- 0,151)*	0,118 (0,103- 0,123)	0,097 (0,090- 0,105)*	1,061 (0,981- 1,098)	1,052 (1,004- 1,082)	1,032 (0,967- 1,055)	36,22 (32,88- 39,25)*	42,78 (38,57- 45,00)	54,89 (49,56- 56,75)*
Sham	0,1435 (0,129- 0,158)*+	0,117 (0,115- 0,125)°+	0,1025 (0,098- 0,106)*°	1,097 (1,069- 1,154)	1,085 (1,045- 1,104)	1,094 (1,049- 1,147)	37,7 (31,43- 42,81)*	44,35 (38,52- 46,94)	61,79 (48,35- 67,10)*
12 Wochen	CtTh			CtBMD			B.ar/T.ar		
	DIA	PM	SH	DIA	PM	SH	DIA	PM	SH
BMP	0,248 (0,143- 0,151)	n.a.		1,102 (1,089- 1,109)*	1,077 (1,046- 1,082)*	1,079 (1,027- 1,100)	37,84 (32,60 - 39,80)*	40,78 (34,11- 43,45)	50,51 (43,00 - 54,60)*
Hydro	0,145 (0,136- 0,159)			1,135 (1,123- 1,140)	1,124 (1,083- 1,146)	1,107 (1,000- 1,148)	33,43 (31,24- 35,60)*	45,24 (43,16- 48,26)	54,86 (47,15- 58,72)*
Sham	0,145 (0,137- 0,149)			1,104 (1,071- 1,137)	1,073 (1,083- 1,120)	1,080 (1,022- 1,107)	31,26 (27,42- 36,86)*	43,97 (37,91- 46,03)	51,83 (49,22- 65,28)*

\* Post-hoc p<0.05; ° Post-hoc p<0.05; + Post-hoc p<0.05



**Tabelle 27: Vergleich der unterschiedlichen Knochenregionen (trabekulär)**

4 Wochen	BV/TV			TbTh			TbN			TbSp			DA		BMD		
	DF	PM	SH	DF	PM	SH	DF	PM	SH	DF	PM	SH	DF	PM	DF	PM	SH
<b>BMP</b>	5,236 (4,013- 6,650)*	13,53 (8,339- 18,250)*	6,564 (1,827- 11,4)	0,071 (0,065- 0,072)	0,091 (0,086- 0,1)	0,053 (0,042- 0,085)	0,726 (0,560- 0,932)*	1,442 (0,967- 2,013)*	1,192 (0,352- 1,667)	0,377 (0,352- 0,441)	0,422 (0,394- 0,495)	0,169 (0,137- 0,195)	1,778 (1,366- 1,895)	1,372 (1,240- 2,093)	0,156 (0,133- 1,181)*	0,224 (0,16- 0,238)*	0,196 (0,167- 0,277)
<b>Hydro</b>	8,512 (6,120- 10,600)	13,300 (7,858- 16,490)	4,510 (2,337- 13,64)	0,079 (0,066- 0,098)	0,098 (0,086- 0,108)	0,057 (0,021- 0,069)	1,067 (0,840- 1,246)	1,391 (0,912- 1,623)	0,870 (0,115- 1,981)	0,388 (0,331- 0,516)*	0,475 (0,432- 0,482)	0,189 (0,167- 0,211)*	1,675 (1,192- 3,063)	1,566 (1,351- 2,166)	0,173 (0,161- 0,205)*	0,218 (0,176- 0,260)*	0,209 (0,138- 0,241)
<b>Sham</b>	7,292 (4,629- 8,790)*	13,76 (12,050- 16,480)*	6,083 (4,088- 15,370)	0,0715 (0,069- 0,074)*	0,091 (0,083- 0,1)*	0,057 (0,052- 0,079)	1,02 (0,67- 1,186)*	1,47 (1,369- 1,769)*	1,066 (0,696- 2,858)	0,337 (0,306- 0,391)	0,429 (0,387- 0,462)	0,169 (0,147- 0,193)	1,541 (1,470- 2,112)	1,600 (1,431- 2,107)	0,177 (0,158- 0,205)*°	0,228 (0,219- 0,252)*	0,268 (0,166- 0,282)°
12 Wochen	BV/TV			TbTh			TbN			TbSp			DA		BMD		
	DF	PM	SH	DF	PM	SH	DF	PM	SH	DF	PM	SH	DF	PM	DF	PM	SH
<b>BMP</b>	6,73 (5,651- 11,720)	13,35 (10,7- 17,910)*	12,530 (1,134- 13,320)	0,0755 (0,069- 0,087)*	0,096 (0,091- 0,115)*	0,071 (0,04- 0,077)	0,896 (0,817- 1,474)	1,330 (0,930- 1,819)	1,710 (0,287- 1,767)	0,359 (0,33- 0,47)	0,483 (0,422- 0,512)	0,179 (0,147- 0,202)	1,836 (1,478- 2,362)	1,97 (1,665- 2,444)	0,171 (0,159- 0,205)*	0,22 (0,199- 0,261)	0,266 (0,168- 0,301)*
<b>Hydro</b>	8,173 (4,033- 10,050)*	15,16 (13,080- 20,070)*	6,519 (0,620- 14,480)	0,08 (0,072- 0,09)	0,095 (0,084- 0,102)	0,068 (0,036- 0,08)	1,004 (0,559- 1,240)*	1,621 (1,427- 1,964)*	0,884 (0,172- 2,181)	0,406 (0,32- 0,49)*	0,445 (0,378- 0,493)	0,185 (0,169- 0,202)*	1,702 (1,442- 1,905)	1,494 (1,383- 1,669)	0,18 (0,149- 0,215)*°	0,249 (0,222- 0,284)*	0,243 (0,198- 0,274)°
<b>Sham</b>	7,791 (5,336- 10,330)	10,79 (10,31- 13,63)	8,509 (3,633- 15,970)	0,0865 (0,077- 0,089)*	0,09 (0,077- 0,099)	0,07 (0,057- 0,075)*	0,938 (0,621- 1,290)	1,338 (1,046- 1,522)	1,163 (0,625- 2,294)	0,393 (0,35- 0,48)*°	0,478 (0,432- 0,513)*+	0,168 (0,132- 0,193)*+	1,503 (1,493- 2,065)	1,804 (1,558- 2,063)	0,177 (0,148- 0,194)*	0,199 (0,194- 0,23)	0,232 (0,156- 0,297)*

\* Post-hoc p<0.05; ° Post-hoc p<0.05; + Post-hoc p<0.05

## 8 Literatur

1. Hadji P, Klein S, Gothe H, Häussler B, Kless T, Schmidt T, et al. Epidemiologie der Osteoporose - Bone Evaluation Study. Dtsch Arztebl International. 2013;110(4):52-7.
2. Häussler B, Gothe H, Göl D, Glaeske G, Pientka L, Felsenberg D. Epidemiology, treatment and costs of osteoporosis in Germany—the BoneEVA Study. Osteoporosis International. 2007;18(1):77-84.
3. Schieker M, Mutschler W. Osteoporose in der stationären Versorgung chirurgischer Patienten. Chirurgie Basisweiterbildung: Springer; 2013. p. 817-21.
4. Richards JB, Zheng H-F, Spector TD. Genetics of osteoporosis from genome-wide association studies: advances and challenges. Nature reviews Genetics. 2012;13(8):576.
5. Kanis JA, Melton LJ, Christiansen C, Johnston CC, Khaltav N. The diagnosis of osteoporosis. Journal of bone and mineral research. 1994;9(8):1137-41.
6. WHO. Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis: report of a WHO study group [meeting held in Rome from 22 to 25 June 1992]. 1994.
7. Harbeck B, Lehnert H. Individualized treatment of osteoporosis. Der Internist. 2016;57(7):638-45.
8. Neuerburg C, Schmidmaier R, Schilling S, Kammerlander C, Böcker W, Mutschler W, et al. Identifikation, Diagnostik und leitliniengerechte Osteoporosetherapie (DVO) unfallchirurgischer Patienten. Der Unfallchirurg. 2015;118(11):913-24.
9. Herold G. Innere Medizin 2014: Herold, Gerd, Eigenverlag; 2013.
10. Mirza F, Canalis E. Management of endocrine disease: secondary osteoporosis: pathophysiology and management. European Journal of Endocrinology. 2015;173(3):R131-R51.
11. Jakob F. Pathophysiologie der primären Osteoporose. Aktuelle Rheumatologie. 2001;26(03):86-94.
12. DVO. Leitlinie 2014 zur Prophylaxe, Diagnostik und Therapie der Osteoporose bei Männern ab dem 60. Lebensjahr und postmenopausalen Frauen. 2014.

13. Curtis EM, Moon RJ, Harvey NC, Cooper C. The impact of fragility fracture and approaches to osteoporosis risk assessment worldwide. *Bone*. 2017;104:29-38.
14. Priemel M, Münch C, Beil F, Ritzel H, Amling M. Pathophysiologie und Pathomorphologie der Osteoporose. *Der Radiologe*. 2006;46(10):831-8.
15. Peters KM. Osteoporose. *Orthopädie und Unfallchirurgie up2date*. 2013;8(05):403-15.
16. Langer S, Klier T, Lorenz M, Bühren V, von Rüden C. Operatives Management proximaler Femurfrakturen. *OUP*. 2016;11:622-6.
17. Klopfer T, Hemmann P, Ziegler P, Stöckle U, Bahrs C. Proximale Femurfraktur und Insuffizienzfrakturen im Alter. *Trauma und Berufskrankheit*. 2017;19(1):27-36.
18. Morrison A, Fan T, Sen SS, Weisenfluh L. Epidemiology of falls and osteoporotic fractures: a systematic review. *ClinicoEconomics and outcomes research: CEOR*. 2013;5:9.
19. Fliri L, Sermon A, Wähnert D, Schmoelz W, Blauth M, Windolf M. Limited V-shaped cement augmentation of the proximal femur to prevent secondary hip fractures. *Journal of biomaterials applications*. 2013;28(1):136-43.
20. Drew S, Judge A, May C, Farmer A, Cooper C, Javaid MK, et al. Implementation of secondary fracture prevention services after hip fracture: a qualitative study using extended Normalization Process Theory. *Implementation Science*. 2015;10(1):57.
21. Sawalha S, Parker M. Characteristics and outcome in patients sustaining a second contralateral fracture of the hip. *J Bone Joint Surg Br*. 2012;94(1):102-6.
22. Kemmler W, Bebenek M, Kohl M, von Stengel S. Exercise and fractures in postmenopausal women. Final results of the controlled Erlangen Fitness and Osteoporosis Prevention Study (EFOPS). *Osteoporosis international*. 2015;26(10):2491-9.
23. Avenell A, Mak J, O'Connell D. Vitamin D and vitamin D analogues for preventing fractures in post-menopausal women and older men. *The Cochrane Library*. 2014.
24. Kanis J, Cooper C, Rizzoli R, Abrahamsen B, Al-Daghri N, Brandi M, et al. Identification and management of patients at increased risk of osteoporotic fracture: outcomes of an ESCEO expert consensus meeting. *Osteoporosis International*. 2017;28(7):2023-34.

25. Bonnaire F, Straßberger C, Kieb M, Bula P. Osteoporotic fractures of the proximal femur. What's new? *Der Chirurg; Zeitschrift für alle Gebiete der operativen Medizin*. 2012;83(10):882-91.
26. Neuerburg C, Gosch M, Blauth M, Böcker W, Kammerlander C. Augmentationstechnik am proximalen Femur. *Der Unfallchirurg*. 2015;118(9):755-64.
27. Edwards BJ, Koval K, Bunta AD, Genuario K, Hahr A, Andruszyn L, et al. Addressing secondary prevention of osteoporosis in fracture care: follow-up to "own the bone". *JBJS*. 2011;93(15):e87.
28. Javaid M, Kyer C, Mitchell P, Chana J, Moss C, Edwards M, et al. Effective secondary fracture prevention: implementation of a global benchmarking of clinical quality using the IOF Capture the Fracture® Best Practice Framework tool. *Osteoporosis International*. 2015;26(11):2573-8.
29. Gold DT. Patients Who Do Not Take Their Osteoporosis Medications: Can We Help Them Become Compliant? *The Duration and Safety of Osteoporosis Treatment*: Springer; 2016. p. 239-53.
30. Lanza R, Langer R, Vacanti JP. *Principles of tissue engineering*: Academic press; 2011.
31. Chen Q, Liang S, Thouas GA. Elastomeric biomaterials for tissue engineering. *Progress in polymer science*. 2013;38(3):584-671.
32. Bonassar LJ, Vacanti CA. Tissue engineering: the first decade and beyond. *Journal of Cellular Biochemistry*. 1998;72(S30–31):297-303.
33. Köklü U. Tissue Engineering dentaler Stammzellen in einem PEGylierten Fibrin Hydrogel, Dissertation, Universität Regensburg. 2014.
34. Lenze U. Histologische Beurteilung der in vivo Knochenneubildung besiedelter Konstrukte nach osteogener Stimulation und Beimpfung mit vaskulärem endothelialelem Wachstumsfaktor (VEGF) im Mausmodell, Dissertation, LMU München. 2012.
35. Biberthaler P, van Griensven M. *Knochendefekte und Pseudarthrosen*: Springer; 2016.
36. Fu S, Ni P, Wang B, Chu B, Zheng L, Luo F, et al. Injectable and thermo-sensitive PEG-PCL-PEG copolymer/collagen/n-HA hydrogel composite for guided bone regeneration. *Biomaterials*. 2012;33(19):4801-9.

37. Volkmer E, Leicht U, Moritz M, Schwarz C, Wiese H, Milz S, et al. Poloxamer-based hydrogels hardening at body core temperature as carriers for cell based therapies: in vitro and in vivo analysis. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 2013;24(9):2223-34.
38. Moll U. Optimierung von thermosensitiven Hydrogelen auf Basis von Pluronic P123 als Trägermaterialien für BMP2-überexprimierende Stammzellen, Dissertation, LMU München. 2014.
39. Carreira A, Lojudice F, Halcsik E, Navarro R, Sogayar M, Granjeiro J. Bone morphogenetic proteins: facts, challenges, and future perspectives. *Journal of dental research*. 2014;93(4):335-45.
40. Urist MR. Bone: formation by autoinduction. *Science*. 1965;150(3698):893-9.
41. Brigaud I, Agniel R, Leroy-Dudal J, Kellouche S, Ponche A, Bouceba T, et al. Synergistic effects of BMP-2, BMP-6 or BMP-7 with human plasma fibronectin onto hydroxyapatite coatings: A comparative study. *Acta Biomaterialia*. 2017;55:481-92.
42. Sánchez-Duffhues G, Hiepen C, Knaus P, ten Dijke P. Bone morphogenetic protein signaling in bone homeostasis. *Bone*. 2015;80:43-59.
43. Mantripragada VP, Jayasuriya AC. Injectable chitosan microparticles incorporating bone morphogenetic protein-7 for bone tissue regeneration. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2014;102(12):4276-89.
44. Tsuji K, Bandyopadhyay A, Harfe BD, Cox K, Kakar S, Gerstenfeld L, et al. BMP2 activity, although dispensable for bone formation, is required for the initiation of fracture healing. *Nature genetics*. 2006;38(12):1424.
45. Bandyopadhyay A, Yadav PS, Prashar P. BMP signaling in development and diseases: a pharmacological perspective. *Biochemical pharmacology*. 2013;85(7):857-64.
46. Moghaddam A, Zietzschmann S, Bruckner T, Schmidmaier G. Treatment of atrophic tibia non-unions according to 'diamond concept': results of one-and two-step treatment. *Injury*. 2015;46:S39-S50.
47. DeVine JG, Dettori JR, France JC, Brodt E, McGuire RA. The use of rhBMP in spine surgery: is there a cancer risk? *Evidence-based spine-care journal*. 2012;3(02):035-41.

48. Leknes KN, Yang J, Qahash M, Polimeni G, Susin C, Wikesjö UM. Alveolar ridge augmentation using implants coated with recombinant human bone morphogenetic protein-2: radiographic observations. *Clinical oral implants research*. 2008;19(10):1027-33.
49. Coe JD. Are We at the End of the Bone Morphogenetic Protein Era?: Commentary on an article by Diyar Delawi, MD, PhD, et al.:“OP-1 Compared with Iliac Crest Autograft in Instrumented Posterolateral Fusion. A Randomized, Multicenter Non-Inferiority Trial”. *JBJS*. 2016;98(6):e23.
50. James AW, LaChaud G, Shen J, Asatrian G, Nguyen V, Zhang X, et al. A review of the clinical side effects of bone morphogenetic protein-2. *Tissue Engineering Part B: Reviews*. 2016;22(4):284-97.
51. Zara JN, Siu RK, Zhang X, Shen J, Ngo R, Lee M, et al. High doses of bone morphogenetic protein 2 induce structurally abnormal bone and inflammation in vivo. *Tissue Engineering Part A*. 2011;17(9-10):1389-99.
52. Zilber S, Epstein NJ, Lee SW, Larsen M, Ma T, Smith RL, et al. Mouse femoral intramedullary injection model: technique and microCT scan validation. *Journal of biomedical materials research Part B, Applied biomaterials*. 2008;84(1):286-90.
53. Behrendt AK, Kuhla A, Osterberg A, Polley C, Herlyn P, Fischer DC, et al. Dietary Restriction-Induced Alterations in Bone Phenotype: Effects of Lifelong Versus Short-Term Caloric Restriction on Femoral and Vertebral Bone in C57BL/6 Mice. *Journal of Bone and Mineral Research*. 2016;31(4):852-63.
54. Schröpfer K. Regenerative Eigenschaften von Laufbandtraining auf die Knochenstruktur der kastrierten Ratte, Dissertation, Universität Rostock. 2014.
55. Schmitz K. Zeit-und Dosis-abhängige Wirkungen von Calcitriol auf die renale Osteodystrophie: Untersuchungen an der subtotal nephrektomierten Ratte, Dissertation, Universität Rostock. 2013.
56. Bancroft JD, Gamble M. *Theory and Practice of Histological Techniques*: Churchill Livingstone; 2008.
57. Kowalski A, Enck P. Statistische Methoden bei Mehrfachtestung–die Bonferroni-Korrektur. *PPmP-Psychotherapie· Psychosomatik· Medizinische Psychologie*. 2010;60(07):286-7.

58. Histing T, Garcia P, Holstein J, Klein M, Matthys R, Nuetzi R, et al. Small animal bone healing models: standards, tips, and pitfalls results of a consensus meeting. *Bone*. 2011;49(4):591-9.
59. Nunamaker D. Experimental models of fracture repair. *Clinical orthopaedics and related research*. 1998;355:S56-S65.
60. Simon MM, Greenaway S, White JK, Fuchs H, Gailus-Durner V, Wells S, et al. A comparative phenotypic and genomic analysis of C57BL/6J and C57BL/6N mouse strains. *Genome biology*. 2013;14(7):R82.
61. Halloran BP, Ferguson VL, Simske SJ, Burghardt A, Venton LL, Majumdar S. Changes in bone structure and mass with advancing age in the male C57BL/6J mouse. *Journal of Bone and Mineral Research*. 2002;17(6):1044-50.
62. Perkins S, Gibbons R, Kling S, Kahn A. Age-related bone loss in mice is associated with an increased osteoclast progenitor pool. *Bone*. 1994;15(1):65-72.
63. Nguyen V, Meyers CA, Yan N, Agarwal S, Levi B, James AW. BMP-2-induced bone formation and neural inflammation. *Journal of Orthopaedics*. 2017;14(2):252-6.
64. Lee KB, Taghavi CE, Murray SS, Song KJ, Keorochana G, Wang JC. BMP induced inflammation: A comparison of rhBMP-7 and rhBMP-2. *Journal of Orthopaedic Research*. 2012;30(12):1985-94.
65. Klätte-Schulz F, Pauly S, Scheibel M, Greiner S, Gerhardt C, Hartwig J, et al. Characteristics and stimulation potential with BMP-2 and BMP-7 of tenocyte-like cells isolated from the rotator cuff of female donors. *PloS one*. 2013;8(6):e67209.
66. Bosemark P, Perdikouri C, Pelkonen M, Isaksson H, Tägil M. The masquelet induced membrane technique with BMP and a synthetic scaffold can heal a rat femoral critical size defect. *Journal of Orthopaedic Research*. 2015;33(4):488-95.
67. Vaidya R, Weir R, Sethi A, Meisterling S, Hakeos W, Wybo C. Interbody fusion with allograft and rhBMP-2 leads to consistent fusion but early subsidence. *Bone & Joint Journal*. 2007;89(3):342-5.
68. Samorezov JE, Headley EB, Everett CR, Alsberg E. Sustained presentation of BMP-2 enhances osteogenic differentiation of human adipose-derived stem cells in gelatin hydrogels. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2016;104(6):1387-97.

69. Azagarsamy MA, Anseth KS. Light wavelengths to regulate the release of multiple growth factors. Society For Biomaterials. 2014.
70. Martín-Badosa E, Amblard D, Nuzzo S, Elmoutaouakkil A, Vico L, Peyrin F. Excised bone structures in mice: imaging at three-dimensional synchrotron radiation micro CT. *Radiology*. 2003;229(3):921-8.
71. Chappard D, Retailleau-Gaborit N, Legrand E, Baslé MF, Audran M. Comparison insight bone measurements by histomorphometry and  $\mu$ CT. *Journal of Bone and Mineral Research*. 2005;20(7):1177-84.
72. Hildebrand T, Rüegsegger P. A new method for the model-independent assessment of thickness in three-dimensional images. *Journal of microscopy*. 1997;185(1):67-75.
73. Caló E, Khutoryanskiy VV. Biomedical applications of hydrogels: A review of patents and commercial products. *European Polymer Journal*. 2015;65:252-67.
74. Rottensteiner U, Sarker B, Heusinger D, Dafinova D, Rath SN, Beier JP, et al. In vitro and in vivo biocompatibility of alginate dialdehyde/gelatin hydrogels with and without nanoscaled bioactive glass for bone tissue engineering applications. *Materials*. 2014;7(3):1957-74.
75. Müller R, Van Campenhout H, Van Damme B, Van der Perre G, Dequeker J, Hildebrand T, et al. Morphometric analysis of human bone biopsies: a quantitative structural comparison of histological sections and micro-computed tomography. *Bone*. 1998;23(1):59-66.
76. Bonnet N, Laroche N, Vico L, Dolleans E, Courteix D, Benhamou C. Assessment of trabecular bone microarchitecture by two different x-ray microcomputed tomographs: A comparative study of the rat distal tibia using Skyscan and Scanco devices. *Medical physics*. 2009;36(4):1286-97.
77. Paul K, Padalhin AR, Linh NTB, Kim B, Sarkar SK, Lee BT. A Study of BMP-2-Loaded Bipotential Electrolytic Complex around a Biphasic Calcium Phosphate-Derived (BCP) Scaffold for Repair of Large Segmental Bone Defect. *PloS one*. 2016;11(10):e0163708.
78. Volkmer E, Leicht U, Moritz M, Schwarz C, Wiese H, Milz S, et al. Poloxamer-based hydrogels hardening at body core temperature as carriers for cell based therapies: in vitro and in vivo analysis. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 2013;24(9):2223-34.



79. Cipitria A, Wagermaier W, Zaslansky P, Schell H, Reichert J, Fratzl P, et al. BMP delivery complements the guiding effect of scaffold architecture without altering bone microstructure in critical-sized long bone defects: a multiscale analysis. *Acta biomaterialia*. 2015;23:282-94.
80. Bagi CM, Berryman E, Moalli MR. Comparative bone anatomy of commonly used laboratory animals: implications for drug discovery. *Comparative medicine*. 2011;61(1):76-85.
81. Schray D, Stumpf U, Kammerlander C, Böcker W, Neuerburg C. Diagnosis and therapy of osteoporosis in geriatric trauma patients: an update. *Innovative Surgical Sciences*. 2016;1(2):65-71.
82. Calabria S, Cinconze E, Rossini M, Rossi E, Maggioni A, Pedrini A, et al. Adherence to alendronic or risedronic acid treatment, combined or not to calcium and vitamin D, and related determinants in Italian patients with osteoporosis. Patient preference and adherence. 2016;10:523.
83. Turner AS. Animal models of osteoporosis—necessity and limitations. *Eur Cell Mater*. 2001;1(66-81):13.
84. Li X, Ominsky MS, Warmington KS, Morony S, Gong J, Cao J, et al. Sclerostin antibody treatment increases bone formation, bone mass, and bone strength in a rat model of postmenopausal osteoporosis. *Journal of Bone and Mineral Research*. 2009;24(4):578-88.
85. Clarke BL. Anti-sclerostin antibodies: utility in treatment of osteoporosis. *Maturitas*. 2014;78(3):199-204.

## 9 Danksagung

Mein größter Dank gebührt der Deutschen Osteologie Stiftung, die dieses Projekt großzügig unterstützte. Mein besonderer Dank geht dabei an Dr. med. Michael Pfeifer. Meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. med. Matthias Schieker danke ich für die Überlassung des Themas, die fachliche Kompetenz und die zahlreichen Anregungen. Darüber hinaus gilt mein besonderer Dank Herrn PD Dr. med. Carl Neuerburg, der in hohem Maße zur Entwicklung des Themas wie auch der Fertigstellung dieser Arbeit beigetragen hat.

Bei Frau PD Dr. rer. nat. Dagmar-Christiane Fischer möchte ich mich für die stete Unterstützung, äußerst freundschaftliche und kompetente Betreuung und unermüdliche Hilfsbereitschaft bedanken. Ebenso gilt mein großer Dank Anja Rahn für die gute Zusammenarbeit im Labor.

Herrn PD Dr. rer. nat. Attila Aszodi danke ich ebenso für seine herzliche Betreuung und fachliche Expertise.

Meine tiefe Dankbarkeit gilt meinen Eltern Doris und Thomas, die mir die Möglichkeit und Freiheit gegeben haben, mein Studium zu absolvieren wäre. Ohne Euch wäre diese Arbeit nie zustande gekommen.

Meiner Schwester Anne und meiner Großmutter bin ich zu Dank verpflichtet, da sie immer da sind und mich in allen Zielen unterstützen.

Ganz besonders möchte ich mich bei meinem Freund Marcus bedanken, der mir stets den Rücken stärkt.

## 10 Lebenslauf





# 11 Nachtrag

## Förderung des vorliegenden Dissertationsprojekts

Die vorliegende Arbeit wurde durch ein Promotionsstipendium der Deutschen Osteologie Stiftung unterstützt.

## Veröffentlichungen / Vorträge im Rahmen der Dissertation

- **Mittlmeier L.** „*Local stimulation of bone growth in the murine femur by application of hydrogels loaded with BMP-7*“; DAdorW-Nachwuchsakademie 2016, TUM-Study-Center Raitenhaslach, Burghausen, 04/2016
- **Mittlmeier L.**, Westphal I, Fischer DC, Augat P, Schieker M, Aszodi A, Böcker W, Neuerburg C. „*Untersuchung des osteoinduktiven Potentials BMP-7-beladener Hydrogele im Mausmodell: eine Option zur Prävention osteoporotischer Frakturen?*“; Postersession, Deutscher Kongress für Orthopädie und Unfallchirurgie (DKOU) , Berlin, 10/2015
- **Mittlmeier L.** „*Lokale Stimulation des Knochenwachstums durch Applikation von BMP-7-beladenen BDI-Gelen im Mausfemur*“; Preisträgersession, Osteologie Kongress, Berlin, 03/2015
- **Mittlmeier L.** „*Local stimulation of bone growth in the murine femur by application of hydrogels loaded with BMP-7*“; Experimed Symposium, Chirurgische Klinik der LMU, München, 02/2015

## Rechtliche Grundlagen

Die im Rahmen der Studie durchgeführten Kleinterversuche wurden nach den Tierversuchsbestimmungen der Regierung Oberbayern durchgeführt und genehmigt. Es wurde darauf geachtet, dass das Leiden der Versuchstiere auf ein Minimum reduziert wird.

## 12 Eidesstattliche Versicherung

Mittlmeier, Lena Maria

---

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema *„Evaluation der Wirkung eines BMP-7-beladenen Hydrogels im murinen intramedullären Injektionsmodell“* selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe. Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, den 13.03.2019

---

Ort, Datum

Lena Maria Mittlmeier

---

Unterschrift Doktorand