

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Klinik und Poliklinik für Mund- und Kiefer-Gesichtschirurgie
– Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. med .dent. Dr.h.c. U. Joos –

Einfluß des Vascular Endothelial Growth Factors bei der Vaskulogenese
in der Knochenregeneration – Eine *in-vivo* basierte Analyse
am Unterkiefer- Defekt Modell
des Kaninchens

INAUGURAL–DISSERTATION

zur

Erlangung des doctor medicinae
der Medizinischen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms–Universität Münster

vorgelegt von
Lunatschek, Christian Ilja Boris
aus Höxter

2007

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

Dekan:	Univ.-Prof. Dr. V. Arolt
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Dr. J. Kleinheinz
2. Berichterstatter:	Priv.-Doz. Dr. T. Stamm
Tag der mündlichen Prüfung:	05.03.2007

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Klinik und Poliklinik für Mund- und Kiefer-Gesichtschirurgie
– Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Dr.med. dent. Dr.h.c. U. Joos –
Referent: Prof. Dr.med. Dr. med. dent. J. Kleinheinz
Korreferent: Priv.-Doz. Dr. T. Stamm

Zusammenfassung

Einfluß des Vascular Endothelial Growth Factors bei der Vaskulogenese in der
Knochenregeneration – Eine *in-vivo* basierte Analyse
am Unterkiefer- Defekt Modell
des Kaninchens
Lunatschek, Christian Ilja Boris

Zufriedenstellende Knochenersatzmaterialien sind trotz steigenden Bedarfes immer noch nicht entwickelt worden. Als primärer Motor einer suffizienten Osteogenese gilt eine ausreichende Vaskularisation. In der vorliegenden Studie wurde die Angiogenese und die Osteogenese unter dem Einfluss des angiogenen Wachstumsfaktors VEGF₁₆₅ (Vaskular Endothelial Growth Factor 165) in Typ-1 Kollagen als Trägermaterial in einem Unterkieferdefektmodell am Kaninchen untersucht.

Der Ablauf des Tierexperiments wurde unter Einhaltung der Anforderungen durch das Tierschutzgesetz und mit einer Genehmigung durch das Regierungspräsidium Münster vom 12. Januar 1998 (Az. 23.0835.1.0 (G 46 / 97)) durchgeführt.

Bei insgesamt 56 weißen New Zealand Kaninchen wurden im Unterkiefer 4 Bohrlochdefekte gesetzt. In der Studiengruppe wurden alle vier Defekte mit Kollagen, welches mit VEGF₁₆₅ komplexiert war, gefüllt. Die Kontrollversuche wurden jeweils an anderen Tieren durchgeführt um systemische Effekte des VEGF zu unterbinden. Hier erfolgte die Füllung des Defektes zur Hälfte mit Blutkoagel oder mit Kollagen ohne Wachstumsfaktorzusatz. Um die Kinetik der Regeneration zu untersuchen waren die Tiere in vier Gruppen eingeteilt, wo sie nach 3, 7, 14 oder 28 Tagen getötet wurden. Die vormaligen Bohrlochdefekte wurden mit umgebendem Knochen entnommen und immunhistologisch bezüglich der Parameter Lokalisation, Ausdehnung, zeitlicher Verlauf, Struktur der Gefäßneubildung und Gefäßzahl und Gefäßquerschnittsfläche untersucht.

Bei allen Proben zeigten sich typische Zeichen der Osteogenese mit der einsprossenden Gefäßfront gefolgt von der osteogenen Wachstumszone. Die Studiengruppe mit Kollagen und VEGF zeigte im Bereich der Regeneration zwar keinen größeren Gefäßquerschnitt, jedoch insgesamt eine deutlich erhöhte Gefäßdichte im Vergleich zu den Proben ohne VEGF. Die daraus folgende vermutete verbesserte Osteogenese lässt sich im besser ausgebildeten Regeneratknochen bei der Gruppe mit VEGF zeigen. Dies lässt den Schluss einer verbesserten Osteogenese durch den Einsatz von VEGF zu.

Tag der mündlichen Prüfung: 05.03.2007

Aktenzeichen des Tierexperiments: (Az. 23.0835.1.0 (G 46 / 97))

Für meine Frau

Glossar

Ang-1	Angiopoietin 1
BMP	Bone morphogenetic protein
°C	Grad Celsius
cm	Zentimeter
CSD	Critical size defect
dest.	Destilliert
EDTA	Äthylen-diamin-tetraessigsäure
EGF	Epidermal growth factor
et al.	und andere
evtl.	eventuell
FGF	fibroblast growth factor
flt	fms-like tyrosin kinase
g	Gramm
GTR	guided tissue regeneration
h	Stunde
H	Höhe
HA	Hydroxylapatit
H.E.	Hämatoxylin-Eosin
IGF	Insulin like growth factor
KDR	kinase-domain insert containing receptor
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
l	Liter
m	Meter
mg	Milligramm
min	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
μ	Mikro
μm	Mikrometer

ng	Nanogramm
đ	Pi, Ludolfsche Zahl, Verhältnis Umfang zu Durchmesser beim Kreis
PBS	Phosphatpuffer (phosphat buffered saline)
PDGF	Platelet-derived growth factor
PEC	Poly-Epsilon-Caprolacton
pg	Pikogramm
PGA	Poly-Glycolic-Acid
PGE1+2	Prostaglandin 1+2
pH	Säure / Basenwert
PLA	Poly-Lactid-Acid
PTFA	Poly-Tetra-Fluor-Acid
%	Prozent
r	Radius
S.	Seite
sec.	Sekunde
TCP	Trikalziumphosphat
TGF-β1+2	Transforming growth factor- beta 1+2
Tie-1+2 factor	tyrosine kinase with immunoglobulin and epidermal growth homology domains
TNFá	Tumornekrosefaktor á u. a. unter anderem
VEGF	Vascular endothelial growth factor-Rezeptor
VEGF-R	Vascular endothelial growth factor-Rezeptor-Rezeptor
vergl.	vergleiche
z. B.	zum Beispiel
>	größer als
≥	größer gleich
=	gleich
<	kleiner als
≤	kleiner gleich
x	-mal, -fach, Multiplikator

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	Osteogenese, Osteokonduktion und Osteoinduktion	2
1.1.1	Mitogene Faktoren der extrazellulären Matrix.....	3
1.2	Osteoinduktion am Beispiel der Frakturheilung	4
1.3	Gefäßversorgung des Knochens.....	6
1.3.1	Grundlagen der Gefäßneubildung	8
1.3.2	Vaskulogenese.....	9
1.3.3	Angiogene Faktoren	10
1.4	Knochenersatzmaterialien	16
1.5	Problemstellung	20
2	MATERIAL UND METHODE	22
2.1	Grundlagen.....	22
2.1.1	Tiermodell	22
2.1.2	Probeneinteilung – Implantate	23
2.1.3	Narkoseverfahren.....	26
2.1.4	Operatives Verfahren - Implantation	26
2.1.5	Operative Explantation – Paraffineinbettung	29
2.1.6	Histologie und Immunhistologie	29
3	ERGEBNISSE	37
3.1	Makroskopisch-klinische Beurteilung	37
3.2	Mikroskopisch – Immunhistologische Auswertung	39
3.3	Quantitative Auswertung Gefäßzahl	45
4	DISKUSSION.....	49
4.1	Immunhistologie.....	56
4.1.1	Zukunft.....	57
5	ZUSAMMENFASSUNG	58
6	LITERATURVERZEICHNIS	60
7	DANKSAGUNG	84
8	LEBENS LAUF	85

1 Einleitung

Eine der Domänen der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie ist die rekonstruktive Chirurgie des Viszero- und frontalen Neurocraniums. So stehen inzwischen für die Frakturversorgung evoluzionierte Osteosynthesysteme zur Verfügung. Distraktoren sind mittlerweile Standard bei Translokationen osseärer Fragmente, wie z.B. Dysgnathieoperationen. Eine konzeptionelle Herausforderung stellt weiterhin der knöcherne Kontinuitätsverlust dar. Fehlbildungen, Traumen oder osseäre Defekte infolge von Entzündungen oder Tumoroperationen bedeuten für einen Patienten häufig massive ästhetische aber auch funktionelle Einschränkungen. Möglichkeiten eines Knochenersatzes durch Knochenneubildung und die Knochenregeneration zur morphologischen und funktionellen Wiederherstellung ist in den letzten Jahren zunehmend Gegenstand der wissenschaftlichen Forschung. Die Wiederherstellung von Knochendefekten durch Transplantate und Implantate beruht auf drei wesentlichen Mechanismen. Diese sind die Osteogenese, die Osteokonduktion und die Osteoinduktion. Die Osteogenese ist die Knochenneubildung aus Osteoblasten bzw. deren Vorläuferzellen aus dem Empfängerknochen bzw. bereits im autologen Transplantat vorhandenen Zellen. Die Osteokonduktion ist das Integrieren eines Implantats im Knochen und gleichzeitigem schleichendem Ersatz der primären Implantatarchitektur. Hierbei reifen im Gefolge der einsprossenden Gefäße aus der Umgebung Osteoprogenitorzellen aus dem Transplantat und bilden kalzifizierende Knochenmatrix [Kübler 1997]. Die einsprossenden Gefäße werden von pluripotenten Wirtszellen begleitet, welche sich über die Osteoinduktion durch Aktivierung über den Einfluß von Bone Morphogenetic Proteins (BMP) zu Chondro- und Osteoblasten differenzieren [Urist et al. 1967].

Ziel der Entwicklung ist es ein Präparat aus einer knochenähnlichen Grundsubstanz herzustellen, das nach einer Einheilungsphase nebenwirkungsfrei im Organismus inkorporiert und physiologisch belastet werden kann. Alle bei der Knochenregeneration beteiligten zellulären und extrazellulären organischen und anorganischen Matrixbestandteile, welche Bestandteil der physiologischen Abläufe sind, sollen vorhanden sein. Es stellen sich daher an ein solches Präparat die gleichen Anforderungen wie bei der physiologischen Osteogenese. Der Knochen ist während des ganzen Lebens einer Erneuerung unterworfen [Buckwalter et al. 1995]. Die physiologische Erneuerungsrate, d.h. das bone remodelling mit gesteuertem Ab- und Wiederaufbau des gesamten Knochenvolumens pro Jahr, liegt bei etwa 5 %. Diese Rate ist jedoch bei entsprechendem Bedarf, wie z.B. nach einer Fraktur, deutlich erhöht [Kleinheinz 2000]. Steuerungsmechanismen sind daher Schlüssel einer benötigten gesteigerten Osteogenese. Ein Knochenersatzpräparat sollte daher neben notwendigen Substraten möglichst Faktoren beinhalten, welche eine Erhöhung der Osteogenese induzieren.

1.1 Osteogenese, Osteokonduktion und Osteoinduktion

Die Osteogenese oder Knochenneubildung beschreibt die grundlegende, lebenslang funktionierende Eigenschaft des Knochens zur Regeneration. Nicht nur bei Frakturen, auch bei bedarfsgerechter Anpassung der Knochenarchitektur ist der dynamische Prozess von Knochenab- und -aufbau von verschiedenen Faktoren beeinflusst. Hierunter fallen äußere mechanische Faktoren, wie etwa die trabekuläre Knochenmodellierung bei physiologischer Belastung des Knochens als auch endogene humorale Faktoren, wie der Kalziumstoffwechsel oder hormonelle Einflüsse. Eingebettet sind diese Mechanismen in ein Regulationssystem, das sich durch verschiedene Rückkopplungsprozesse auszeichnet.

1.1.1 Mitogene Faktoren der extrazellulären Matrix

Der Hauptanteil der in der extrazellulären Matrix vorhandenen Polypeptidfaktoren sind Mitogene, wie beispielsweise Insulin-like growth factor-1 und -2 (IGF-1, IGF-2), transforming growth factors (TGF- β 1, TGF β 2 und TGF- β 3), platelet derived growth factor (PDGF) und acidic und basic fibroblast growth factor (aFGF und bFGF). Sie üben auf ortständiges Knochengewebe eine regulierende und proliferationsfördernde Wirkung aus. Da Wachstumsfaktoren auf die entstehenden oder schon im Knochen vorhandenen Osteoprogenitorzellen einwirken, ist ihre Wirksamkeit bei großen knöchernen Defekten begrenzt.

Insulin-like growth factor (IGF)

Der Insulin-like growth factor spielt eine lokal regulatorische Rolle im Knochenremodelling [Collins et al.1998]. Ebenfalls ist eine Regulierung der Proliferation von Endothelzellen knöchernen Ursprungs durch IGF-I gezeigt worden. Solche Studien lassen einen Einfluss von IGF-I in der skelletalen Angiogenese vermuten [Fiorelli et al. 1994]. Allerdings ist die direkte angiogene Wirkung ungeklärt. Goad et al. 1996 kommen zu dem Entschluß, dass IGF-I die VEGF-Synthese der Osteoblasten steigert und somit indirekt angiogen wirken kann [Goad et al. 1996]. Ob er jedoch direkten Einfluß auf die Gefäßneubildung besitzt ist bisher ungeklärt [Fiorelli et al. 1994].

Platelet-derived growth factor (PDGF)

Platelet-derived growth factors (PDGFs) sind starke Mitogene für Knochenzellen und stimulieren die Osteoblastenproliferation. Indirekt scheinen sie auch Einfluss auf die Induktion von Endothelzellproliferation und damit der Angiogenese zu nehmen. Untermauert wird diese These durch die Tatsache, dass PDGF sowohl von Osteoblasten als auch von vaskulären Endothelzellen produziert werden und dass PDGF mRNA und der PDGF-alpha Rezeptor im

neugebildeten Knochen ubiquitär angefundene werden kann [Horner et al. 1996]. Genaue Aussagen zum Wirkmechanismus im Verlauf der Angiogenese bestehen bisher noch nicht.

1.2 Osteoinduktion am Beispiel der Frakturheilung

Jede Form der Wundheilung, so auch im Knochen, findet um und auf der extrazellulären Matrix statt [Reddi 1994]. Beginnend mit einem Fibrin-Fibronectin Blutgerinnsel, wandelt sich das Regenerat in ein Gerüst um, welches von Kollagen und Glycoproteinen durchsetzt wird. Die Steigerung des Prozesses entwickelt sich aus der Stimulierung pluripotenter mesenchymaler Stammzellen (induzierbare mesenchymale Zellen, IOPC), Proliferation determinierter Osteoblastenvorläuferzellen (DOPC) und durch metaplastische Umwandlung von Zellen des Binde- und Stützgewebes. Dadurch können verschiedene Populationen zur Osteogenese befähigter Vorläuferzellen aktiviert werden, ein Vorgang der als Osteoinduktion bezeichnet wird [Kübler 1997, Schmidt und Swoboda 1995]. Triggermoleküle stellen dabei die morphogenen Proteine aus der Familie der bone morphogenetic proteins (BMP) dar. BMP ist seit Mitte der 60er Jahre bekannt. Inzwischen wird auch rekombinantes, humanes BMP (rhBMP) seit fast 20 Jahren hergestellt. Aufgrund ihrer Aminosäuresequenz werden die BMP der transforming growth factor- β (TFG- β) Großfamilie zugeordnet und sind speziesübergreifend weitgehend identisch. Durch Ähnlichkeit der Aminosäuresequenz der BMP untereinander lassen sich BMP-2 bis 8 außerdem in drei Untergruppen teilen: BMP-2 und 4, BMP-5 bis 8 und BMP-3. Bei adäquater Reizsetzung (z.B. Trauma) wird die Knocheninduktionskaskade [Aubin et al. 1995, Reddi und Anderson 1976, Hollinger und Leong 1996] gestartet. Sie stellt einen klassischen Regenerationsprozess mit Neubildung ohne Narben- oder Ersatzgewebsbildung dar. Der Ablauf wird charakterisiert durch eine präzise Abfolge der Aktivierung von Fibroblasten, Endothelzellen und Osteo- und Chondroprogenitorzellen. Dies

geschieht einerseits durch Veränderung der Rahmenbedingungen (vermindertes Sauerstoffangebot, abnehmender pH-Wert), andererseits durch Freisetzung aktiver biologischer Faktoren, vor allem aus den extravasal im Hämatom liegenden Thrombozyten [Hollinger und Wong 1996].

Nach erfolgter Bereitstellung einer ausreichenden Anzahl zur Knochenneubildung befähigter Zellen, den Osteoblasten, sind es neben den lokal wirkenden osteogenen Wachstumsfaktoren (TGF- β 1+2, IGF, bFGF, PDGF) [Eymer und Preusse 1999, Hollinger und Wong 1996, Schaub und Wozney 1991, Terheyden und Jepsen 1999], vor allem auch systemische Faktoren (Parathormon, Vitamin D3, Calcitonin, Geschlechtshormone), welche die interzellulären Aktionen über autokrine, parakrine und endokrine Bahnen [Hollinger und Leong 1996] vermitteln und zur Modulation der Osteogenese führen.

Unabdingbare Voraussetzungen für eine Knochenformation sind aber eine suffiziente Blutversorgung und eine angepaßte mechanische Unterstützung [Schenk 1994]. Den Osteoblasten kommt innerhalb dieses Gefüges die Aufgabe zu, nach der Differenzierung, Proliferation und Maturation, die Knochenmatrix und anschließend das Assembling einer charakteristischen dreidimensionalen Struktur durch die Mineralisation zu bilden. Durch funktionelle Ausformung des Knochens wird die Knochenregeneration abgeschlossen.

Normales Knochenwachstum und Knochenheilung sind abhängig von der Angiogenese [Saadeh et al. 2000], und die Beurteilung der Vitalität des skelettalen Systems ist heutzutage im Wesentlichen vaskularisationsabhängig [Hollinger und Wong 1996].

Dabei gilt die Blutversorgung als der kritischste Faktor für die Beeinflussung der Knochenheilung [Motoki und Mulliken 1990], denn eine Unterbrechung führt zu Beginn einer Regeneration rasch zum Erliegen der Migration und Matrixsynthese der Osteoblasten [Lemperle et al. 1998], in späteren Stadien zum Untergang der Osteozyten, zur Knochennekrose und -resorption [Buckwalter et al. 1995a, Buckwalter et al. 1995b]. Die Zirkulation ist daher

Dreh- und Angelpunkt der Knochenheilung [Collin-Osdoby 1994, Paralkar et al. 1991].

1.3 Gefäßversorgung des Knochens

Neben der Differenzierung und Proliferation von Osteoblasten, der Matrixsynthese und Mineralisation spielt die Gefäßneubildung und -einsprossung eine entscheidende Rolle im Verlauf der Knochenneubildung und -regeneration [Collin-Osdoby 1994]. Der Knochen benötigt, vergleichbar mit allen anderen körpereigenen Geweben, eine Gefäßversorgung, um seine physiologischen Aufgaben erfüllen zu können. Morphologisch ist dies durch die typische osseäre Architektur, durch Osteone bzw. Havers-Kanäle, deutlich. Die Vaskularisation gewährleistet die Aufrechterhaltung der Homöostase (Temperatur, pH-Wert, Austausch von Zellen und Molekülen), die Sauerstoffversorgung der Zellen (Blutfluß und Hämatokrit), die flexible Speicherung eines großen Anteiles des Blutvolumens [Gross et al. 1979], den Austausch von Nährstoffen, Abbauprodukten, Hormonen und Zytokinen und besitzt somit einen großen Einfluß auf den Strukturerhalt und die Regeneration. Das Gefäßendothel besitzt dabei wesentlichen Einfluß auf Blutfluß, Gefäßpermeabilität und Diapedese durch Expression aktiver Substanzen. Die Ausbildung einer endothelzellgestützten Mikrovaskularisation und -zirkulation wird schon seit längerer Zeit zweifelsfrei als Grundlage für eine erfolgreiche Ossifikation angesehen [Trueta und Little 1960, Trueta 1963]. Die Verbindung von Osteoblasten und Gefäßen reicht in unterschiedlichen Abläufen von indirekten Einflüssen, beispielsweise der Regulation der interstitiellen Temperatur durch die Mikrozirkulation, bis zur direkten Beeinflussung, wie z.B. durch die Produktion von Vascular endothelial growth factor (VEGF) durch Osteoblasten [Wang et al. 1997], die Bereitstellung der Osteoprogenitorzellen durch das Gefäßsystem [Winet 1996] oder sogar die direkte Transdifferenzierung von Osteoprogenitorzellen aus einwandernden Endothelzellen [Decker et al. 1995,

Brighton und Hunt 1991, Brighton et al. 1992]. Die Gefäßneubildung verbindet den Bindegewebsprozess der fibroblastendominierten Granulation mit dem Prozess der osteoblastengetragenden Kalzifizierung einer Kollagen-I Matrix. Instabile Verhältnisse, beispielweise eine permanente Beweglichkeit im Regenerationsbereich, verändern den Gang der Bindegewebsreaktion durch permanente Schädigung der feinen neu ausgesprossenen Gefäße. Infolgedessen wird der Weg über die minimal gefäßabhängige Knorpelbildung eingeschlagen. Die Knorpelbildung stellt somit auch einen Hinweis auf die Gefäßversorgung und –situation im Regenerationsbereich dar [Gerber et al. 1999, Winet 1996]. Die extrazelluläre Matrix des Knochens ist integraler Bestandteil der vaskulären Physiologie. Mit ihrer Porosität, bedingt durch die schwammartige Struktur aus Kollagen und Hydroxylapatit (Porengröße 20-60 nm), stellt sie die ideale Verbindung zum Substrataustausch zwischen Gefäßen und extravasalen Zellen dar. Die Gefäße selbst, umgeben von einer perivaskulären Flüssigkeitssäule, befinden sich in den Havers'schen und Volkmann'schen Kanälen. Die Matrixproteine scheinen im Bereich der Steuerung der Gefäßneubildungsrate eine bedeutende Rolle zu spielen [Drake und Little 1995].

Neben der Ver- und Entsorgungsaufgabe spielt das vaskuläre System innerhalb der mechanisch relativ unflexiblen Knochenstruktur eine bedeutende Rolle in der Transduktion von Kompressions- und Spannungsbelastungen. Zum einen erfolgt eine Verteilung und Dämpfung auftretender Energie durch Flüssigkeitskonvektion, zum anderen werden durchflussbedingte Scherbelastungen auf der Osteozytenmembran in mechanisch-sensorische Stimuli umgewandelt. Diese führen über eine zytoplasmatische Ca^{++} -Freisetzung und einen Proteoglykan-Albumin-Komplex letztendlich zur Synthese von Kollagen I [James et al. 1995, Weinbaum et al. 1994]. Der intraossäre Flüssigkeitshaushalt, charakterisiert durch den Austausch zwischen Gefäßen und EZM, reguliert durch mechanische und neurohumorale Mechanismen [Gross et al. 1979], spielt somit eine direkte Rolle im Knochenwachstum und der Knochenregeneration.

1.3.1 Grundlagen der Gefäßneubildung

Die Gefäßversorgung stellt für den menschlichen Organismus eine Grundvoraussetzung für Entwicklung, Aufrechterhaltung, Reparatur und Schutz dar. Das Gefäßendothel gilt als Interface zwischen Blut und Gewebe mit der Eigenschaft einer permeablen Membran für Blutprodukte und der darunterliegenden Matrix [DiCorleto und Cimbrone 1996]. In der Embryonalzeit ist für die Gewebedifferenzierung vor allem der Transport von Ernährungssubstraten und der Abtransport von Abbauprodukten sowie der Einfluß der hämodynamischen Kräfte auf Teile der Morphogenese von Bedeutung. Im Erwachsenenalter kommt zusätzlich die Aufgabe als Kommunikationssystem zwischen entfernt liegenden Organen und Geweben dazu.

In den meisten ausdifferenzierten Geweben findet man eine hochspezialisierte Vaskularisation, die den speziellen Anforderungen hinsichtlich der Qualität und Quantität der ein- und ausgehenden Moleküle und Nachrichten entspricht [Risau 1995b]. Den Endothelzellen der Gefäße kommt dabei eine entscheidende Bedeutung zu, da ihre Heterogenität es erst ermöglicht, die funktionelle Hämostase grundlegend unterschiedlicher Gewebearten und Organformen aufrechtzuerhalten [Garlanda und Dejana 1997]. Ihre organspezifische Differenzierung wird durch Interaktionen mit den umgebenden Zellen determiniert, wobei lösliche Zytokine, Zell-Zell-Adhäsionen und die Synthese von Matrixproteinen eine Rolle spielen [Goerdts et al. 1991].

Neben seiner Bedeutung für die physiologischen Abläufe spielt der Zustand des Gefäßsystems und seine regenerativen Potentiale auch eine entscheidende Rolle im Zuge der Pathophysiologie einiger Kiefererkrankungen. Der Osteomyelitis wird eine massive Störung der Blutzirkulation ebenso zugrunde gelegt [Bartkowski et al. 1994, Wannfors 1989, Wannfors und Gazelius 1991] wie der Osteoradionekrose [Marx und Johnson 1987] oder der trockenen Alveole [Amler 1999].

Die Blutgefäßneubildung im menschlichen Organismus kann grundsätzlich in zwei unterschiedliche Abläufe aufgeteilt werden, die sich in ihrer Entstehung und in ihrem Ablauf deutlich voneinander unterscheiden. Vaskulogenese und Angiogenese treten (Abb.2) in vivo aber nicht immer streng getrennt voneinander auf und sind eher als Alternativwege, basierend auf unterschiedlichen Voraussetzungen, zu verstehen.

1.3.2 Vaskulogenese

Die Vaskulogenese beschreibt den Vorgang der Gefäßneubildung während der Embryonalentwicklung [Risau und Flamme 1995] und, jedoch zu einem weitaus geringeren Teil, auch im postnatalen Verlauf [Asahara et al. 1999a]. Die Differenzierung der Angioblasten aus dem Mesoderm und die Formierung von primitiven Blutgefäßen aus den Angioblasten sind zwei spezifische Schritte zu Beginn der Vaskulogenese. Die Differenzierung erfolgt nach Induktion durch Faktoren aus der Familie der fibroblast growth factors (FGF). Es wird angenommen, dass vor der Ausbildung des Angioblasten zunächst die Stufe des Hämangioblasten durchlaufen wird [Bikfalvi und Han 1994, Nishikawa et al. 1998, Risau 1997]. Sie stellt die Trennungsstelle zwischen hämatopoetischer und angioblastischer Zellreihe dar, wie Untersuchungen an Defektmodellen spezifischer Rezeptoren (VEGF-Rezeptor 2 für die angioblastische Reihe) und Transkriptionsfaktoren (Scf/tal-1 für die hämatopoetische Reihe) ergeben haben [Robb 1996, Shalaby et al. 1995]. Nach Ausdifferenzierung in Angioblasten, maßgeblich initiiert durch VEGF-Rezeptor 2 [Flamme et al. 1995], erfolgt die Formung erster funktioneller Blutgefäße, die speziell unter dem Einfluß von VEGF-Rezeptor 1 steht [Fong et al. 1995]. Sowohl für die Differenzierung der Zellen als auch für die Formierung von Gefäßen ist eine ausreichende Konzentration des Liganden der Rezeptoren, dem VEGF selbst, erforderlich [Breier et al. 1997, Carmeliet et al. 1996, Ferrara et al. 1996, Yancopoulos et al. 2000], der das Überleben der Angioblasten sichert. Weitere

angiogene Wachstumsfaktoren, Zell-Adhäsionsmoleküle, Transkriptionsfaktoren und mechanische Kräfte sind im weiteren Verlauf bestimmend sowohl für die vaskuläre Regression und Remodellation [Augustin et al. 1995, Bach et al. 1998, Brooks et al. 1994], als auch für Endothelzelldifferenzierung und Angiogenese [Breier und Risau 1996, Risau 1995b].

Die umsatzstärkste Phase der Neovaskularisation besteht zweifelsfrei in der Embryonalzeit, da es im Erwachsenenalter unter physiologischen Bedingungen zu keiner nennenswerten Gefäßneubildung kommt. Das Endothel weist dabei einen niedrigen Mitoseindex mit einem sehr geringen Zellturnover auf. Pathologische Reize können allerdings das „ruhende“ Endothel erneut aktivieren [Ali et al. 1997, Plate 1993], ein Vorgang, der als Angiogenese beschrieben wird.

1.3.3 Angiogene Faktoren

Die Angiogenese gilt im ausgereiften gesunden Organismus als Prozess, der sich in Form einer dynamischen Balance zwischen Stimulatoren und Inhibitoren (Inhibitoren der Prostaglandinsynthese, Protamin, Fumagillin, Angiostatin, Endostatin, Thrombospondin-1) abspielt [Iruela-Arispe und Dvorak 1997]. Neben einer geeigneten Umgebungsmatrix, wie z.B. Fibrin [Nehls und Herrmann 1996], sind es vor allem die Stimulatoren mit angiogenem Potential (Angiogenese-Faktoren), die eine entscheidende Rolle spielen. Sie werden in Gruppen eingeteilt [Folkman und Klagsbrun 1987, Litwin et al. 1995, Schott und Morrow 1993], deren Wirkungsweise und -potential unterschiedlich beurteilt werden.

Vascular endothelial growth factor (VEGF)

Zu einem der wichtigsten Wachstumsfaktoren für Endothelzellen gehört der Vascular endothelial growth factor (VEGF) [Iruela-Arispe und Dvorak 1997]. Als endothelzellspezifisches Mitogen [Brown et al. 1992, Drake und Little 1995, Leung et al. 1989, Schlaeppli et al. 1997, Wang et al. 1996] stellt er den Hauptmediator der pathologischen Angiogenese dar [Ferrara et al. 1996] und ist als Hauptinduktor der Angiogenese bei physiologischen [Leung et al. 1989] und pathologischen Konditionen etabliert [Farnebo et al. 1999, Harada et al. 1994]. Er induziert die Angiogenese, stimuliert die Endothelzellproliferation und spielt eine entscheidende Rolle bei der Regulation der Vaskulogenese [Asahara et al. 1999b, Risau und Flamme 1995, Risau 1997]. Vorausgegangene Studien haben gezeigt, dass der VEGF an der Knochenformation und -reparatur beteiligt ist [Schlaeppli et al. 1997]. VEGF ist ein heparinbindendes dimerisches Glykoprotein, welches von Fibroblasten, Monozyten, Makrophagen, Lymphozyten, Tumorzellen und auch von Osteoblasten mit Ausnahme der Endothelzellen selbst exprimiert wird [Steinbrech et al. 1999, Wang et al. 1997]). Die Expression von VEGF-Rezeptoren erstreckt sich auf unterschiedliche Zelltypen, jedoch zeigen ausschließlich die Endothelzellen eine mitogene Wirkung auf VEGF [Chang et al. 2000, Clauss et al. 1996]. Das VEGF ist für die Endothelzellen, die an ihrer Oberfläche kompatible Rezeptoren (u.a. VEGF-R1 und VEGF-R2) exprimieren, als Ligand existenziell [Yancopoulos et al. 2000]. VEGF und das high-affinity receptor tyrosine kinase flk-1 repräsentieren ein parakrines System, welches entscheidend für die Differenzierung von Endothelzellen und die Entwicklung des vaskulären Systems ist [Risau und Flamme 1995]. Als Ergebnis einer alternativen Verbindung sind fünf Typen (A-E) der VEGF-Species, mit Differenzen in der Molekularmasse und den biologischen Merkmalen, von einem einzelnen Gen kopiert [Neufeld et al. 1994]. VEGF-A entfaltet seine Aktivitäten vor allem bei der Angiogenese in vivo und zeigt großen Einfluß auf die Tumorangiogenese. VEGF-B konnte vor allem im Herz und im ZNS während der embryonalen Entwicklung nachgewiesen

werden [Lagercrantz et al. 1998], während VEGF-C bei der Lymphangiogenese [Mandriota und Pepper 1999] und bei der lymphogenen Metastasierung eine entscheidende Rolle spielt. VEGF-D ist strukturell dem VEGF-C verwandt und kann während der Embryonalzeit speziell in der Lunge nachgewiesen werden [Farnebo et al. 1999]. Die E-Form des VEGF scheint dem VEGF-A vergleichbare Bioaktivitäten zu besitzen [Ogawa et al. 1998]. Es bindet mit ebenso hoher Affinität an den VEGF-Rezeptor 2, jedoch nicht an den VEGF-Rezeptor 1 [Meyer et al. 1999]. Die verschiedenen Mitglieder der VEGF - Familie haben stimulatorische Schlüsselrollen in der Angiogenese in vivo, der Vaskulogenese, der Steigerung der mikrovaskulären Permeabilität [Brown et al. 1992], der Endothelzellproliferation [Klagsbrun und D'Amore 1996], der Chemotaxis und dem Sprießen von vaskulären Endothelzellen in vitro [Meyer et al. 1999]. Durch alternatives Splicing der RNA können verschiedene Isoformen des VEGF-A mit Sequenzen von 121, 145, 165, 183, 189 oder 206 Aminosäuren entstehen. VEGF₁₆₅ ist das vorherrschende Protein, obwohl die Transkriptionsrate von VEGF₁₂₁ teilweise höher ist. Beide Formen sind frei im Plasma gelöst, während VEGF₁₈₉ und VEGF₂₀₆ vorwiegend an Heparin oder an Basalmembranen gebunden sind [Heits et al. 1998]. Die Endothelzellproliferation, Angiogenese und mikrovaskuläre Permeabilität wird durch die hohe Affinität zu den VEGF-Endothelzellrezeptoren KDR/Flk-1 (VEGF-R2) und Flt-1 (VEGF-R1) vermittelt [Klagsbrun und D'Amore 1996, Ogawa et al. 1998]. Beide Tyrosin-Kinase-Rezeptoren (Flt-1 und Flk-1/KDR) sind für die Angiogenese essentiell [Hiratsuka et al. 1998] und werden als zwei der wichtigsten Systeme betrachtet, die in die Angiogenese verwickelt sind [Shibuya 1996].

Hemmende und fördernde Effekte auf die VEGF mRNA-Synthese konnten für weitere Mediatoren nachgewiesen werden. IL-1 β , TGF- β , Östrogene und Prostaglandin E₁₊₂ [Harada et al. 1994] fördern die VEGF-Freisetzung, während TNF- α und Dexamethason sie hemmen [Heits et al. 1998]. VEGF-R1 zeigt eine höhere Affinität für VEGF-A als VEGF-R2 und vermittelt die Motilität und die vaskuläre Permeabilität, während VEGF-R2 für die endotheliale Proliferation bedeutend ist. Die Wirkungsweise beruht auf der Autophosphorylierung des

Rezeptors und einem biphasischen Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration [Meyer et al. 1999]. Seine zentrale Bedeutung für die Angiogenese basiert auf der Steigerung der Gefäßpermeabilität (Fenestration durch Auflösung von Zell-Zell-Kontakten nach Rezeptorbindung), der Stimulation der Endothelzellproliferation (Mitogenität) und des Aussetzens eines Migrationsreizes für Endothelien, Makrophagen und Mastzellen (Chemotaxis).

Eine direkte Wechselwirkung zwischen knochenbildenden Osteoblasten und gefäßbildenden Endothelien wurde von Wang et al. 1997 beschrieben. Über eine $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ vermittelte Aktivierung kommt es zu einer gesteigerten Expression von VEGF mRNA durch die Osteoblasten. Die aktivierten Endothelzellen wiederum steigern die Proliferation und Differenzierung von osteoblast-like cells durch Produktion von osteogenen Faktoren [Hauschka et al. 1986]. Eine weitere Wechselwirkung zwischen VEGF und der Knochenformation wurde von Gerber et al. 1999 sowie Harper und Klagsbrun 1999 beschrieben. Die Sequestrierung von VEGF, welches durch Chondrozyten sezerniert wurde, durch eine lösliche Form eines VEGF-Rezeptors führte bei nicht ausgereiften Mäusen zu einer hypertrophen Chondrozytenzone und einer Unterentwicklung der trabekulären Knochenneubildungszone im Bereich der Epiphysenfugen. Nach Aufhebung der Blockade kam es binnen kurzer Zeit zu einer Kapillareinsprossung, einer Restauration der osteogenen Front, einer Resorption des hypertrophen Knorpels und damit zu einer Normalisierung der Architektur der Wachstumsfuge.

Angiopoietin 1 (Ang-1)

Der endothelzellspezifische Faktor Angiopoietin 1 spielt ebenfalls im Verlauf der Angiogenese eine bedeutende Rolle. Gemeinsam mit VEGF hat Ang-1 eine additive Wirkung auf die Angiogenese. Im Vergleich zu VEGF werden unter seinem Einfluß stabilere Endothelzellverbände gebildet, die sich durch eine geringere Permeabilität und Durchlässigkeit für weitere Moleküle auszeichnen

[Thurston et al. 1999]. Neben der Regulation der Bildung von kapillarartigen Tubulusstrukturen gilt er als Überlebensfaktor für die Endothelzellen [Hayes et al. 1999]. Die Abwesenheit von Ang-1 oder Tie-2 verhindert den geregelten Ablauf der Angiogenese [Sato et al. 1995]. Eine direkte Wirkung auf die Osteogenese ist nicht bekannt.

Ephrin-B2

Das System aus dem Liganden Ephrin-B2 und seinem Tyrosinkinase Rezeptor EphB4 nimmt eine Schlüsselstellung während der Gefäßentwicklung ein [Adams et al. 1999]. Besonders hervorzuheben ist die Eigenschaft, die arterielle und venöse Identität der Gefäße zu etablieren. Ein Ausbleiben dieser Wirkung, untersucht in Studien mit Knock-out Mäusen, führt zu einem völlig insuffizienten und unterentwickelten Gefäßsystem [Wang et al. 1998]. Ephrin-B2 markiert zu Anfang der Angiogenese arterielle Endothelzellen und der Rezeptor EphB4 (Ephrinrezeptor B4) fördert dagegen Venen [Wang et al. 1998].

Fibroblast growth factors (FGF)

Die Vertreter dieser Familie, das azidische aFGF (FGF1) und das basische bFGF (FGF2) zeigen eine Vielzahl von Wirkungen auf unterschiedliche Zelltypen, insbesondere als Mitogen für Osteoblasten und Chondrozyten [Leunig et al. 1997]. Für das bFGF ist jedoch bekannt, daß es sich um den Wachstumsfaktor mit der stärksten mitogenen und chemotaktischen Aktivität auf Endothelzellen in vitro handelt [Bastaki et al. 1997, Slavin 1995]. Alle bisherigen in vivo Versuche weisen ebenfalls auf eine bFGF induzierte angiogene Reaktion hin [Litwin et al. 1995]. So konnte Leunig et al. 1997 am Mäusefemur zeigen, daß bFGF die Angiogenese moduliert, indem es indirekt chemotaktisch die Zellmigration und -invasion beeinflusst. Eppley et al. 1988 stellten am Kaninchenunterkiefer eine deutlich schnellere und extensivere Vaskularisation in Knochentransplantaten unter Mitwirkung von bFGF fest.

Weitere angiogene Faktoren

Die Liste der Wachstumsfaktoren mit angiogenem Potential ist zunehmend [Schott und Morrow 1993]. In der Literatur werden eine Reihe weiterer Faktoren beschrieben, die jedoch in Struktur und Funktion nicht im gleichen Ausmaß wie die oben beschriebenen charakterisiert sind. Zu diesen gehören: Angiogenin, Angiotropin, TNF α , PGE $_{1+2}$ und Interleukine. Zum Teil zeigen diese Faktoren nur sehr geringe und nicht vorhersagbare Auswirkungen auf die Angiogenese, zum Teil ist ihr Wirkungsmechanismus und -ort nicht bekannt. Da weder in vitro noch in vivo Versuche vorliegen, die eine gesicherte Aussage zulassen, wird diesen Faktoren keine spezifische angiogene Potenz zugeordnet. Daher wird auf diese Faktoren nicht näher eingegangen. Mit den lokal wirkenden Wachstumsfaktoren TGF β -1+2, IGF, bFGF, PDGF und BMP fanden bisher zahlreiche Untersuchungen statt [Hollinger und Wong 1996, Schaub und Woznej 1991]. Darüberhinaus sind als Modulatoren der Osteogenese die systemischen Faktoren Parathormon, Vitamin D3, Calcitonin und Geschlechtshormone bekannt [Hollinger und Leong 1996].

Eine Gemeinsamkeit vieler Untersuchungen mit Cytokinen ist, dass in vitro die Ergebnisse besser ausfallen als in vivo. Gerade deshalb werden Versuche entwickelt, in denen der Aktivität der Knochenzellen, der Knochenmatrix, den interagierenden körpereigenen Cytokinen und den Freisetzungseigenschaften und der Dosisfestlegung Rechnung getragen wird. In der vorliegenden Studie wurde auf diese Problemstellung geachtet und in einer vorausgegangenen in vitro Studie die Freisetzungskinetik und die Dosisfeststellung errechnet [Kleinheinz et al. 2000].

Nach Übersicht über die unterschiedlichen Wachstumsfaktoren wird wegen der Förderung der Blutversorgung in der kritischen Phase des Knochenheilungsprozesses [Motoki und Mulliken 1990] dem VEGF $_{165}$ besonderer Vorzug gewährt.

1.4 Knochenersatzmaterialien

Das autologe Knochentransplantat stellt nach wie vor das beste Material zur Verbesserung der lokalen Knochenregeneration dar. Neben einer optimalen osteokonduktiven Wirkung durch Bereitstellung der natürlichen Knochenmatrix, bedeuten vor allem die in physiologischer Menge und Bindung vorhandenen osteoinduktiven Proteine und Wachstumsfaktoren [Bolander und Balian 1986] einen unschlagbaren Vorteil. Zunehmend problematisch ist jedoch zum einen die Gewinnung eines ausreichenden Knochenvolumens, ohne den oftmals multimorbiden Patienten durch weitere operative Eingriffe zu belasten, zum anderen die immunologischen und infektionsbedingten Gründe, die bei einer allogenen Transplantation ein oft nicht abschätzbares Risiko in sich bergen.

Alloplastische Materialien

Trotz unterschiedlicher Bearbeitungsschritte, die in diesem Bereich deutliche Verbesserungen zeigen [Kübler et al. 1993, Schwartz et al. 1996], bleibt die zwingende Herausforderung, nach immunologisch vorteilhafteren und mengenmäßig unbegrenzten Alternativen zu suchen. Diese müssten komplexe Systeme (drug delivery systems) sein, die sich aus einer Grundsubstanz, dem Trägermaterial oder Carrier, und darin komplexierten aktiven Stoffen, zusammensetzen. Als Carrier kommen Materialien in Frage, denen die aktiven Faktoren bei der Herstellung verloren gegangen sind oder sie diese niemals besaßen und somit neu zugeführt werden müssen. Die sowohl aus organischen Gewebearten als auch aus synthetischen Gerüstbausteinen hergestellten Materialien weisen dabei in ihren physikalischen und chemischen Eigenschaften oft deutliche Unterschiede auf (mechanische Stabilität, Porosität, Resorptionsverhalten etc.) und durchlaufen nicht selten bis zu ihrer Endform umfangreiche Modifikationsprozesse. Vorteile dieser Systeme sind eine gewisse Steuerbarkeit der Eigenschaften und die nahezu unbegrenzte Verfügbarkeit. Sie sollten die aktiven Stoffe räumlich und zeitlich begrenzt aufnehmen und für lokale Anforderungen zur Verfügung stellen [Hollinger und Leong 1996]. Ein

detaillierter Anforderungskatalog an eine Trägersubstanz, die gleichzeitig auch als Knochenersatzmaterial verwendet werden sollte, wurde bereits mehrfach beschrieben [Agrawal et al. 1995, Hutmacher et al. 1998, Wang et al. 1996, Zellin und Linde 1997]. Grundsätzlich muß das Trägermaterial suffizient in all seinen biochemischen, physikalischen und pharmakologischen Eigenschaften charakterisiert werden können und biokompatibel sein [Winet et al. 1995]. So sollte neben einer funktionell und strukturell definierten Resorptions- oder Umbaurate in einem biologischen Millieu und der damit verbundenen definierten Freigabe von Faktoren, eine osteokonduktive Wirkung vorliegen. Entscheidend dabei ist die Synchronisation zwischen Abbaurate des Carriers und Aufbaurate des Knochens [Hutmacher et al. 1998]. Im Augenblick werden vier unterschiedliche Biomaterialgruppen diskutiert, die sowohl experimentell als auch klinisch ausgetestet wurden:

synthetische organische Materialien (Bsp.: PLA, PGA)

synthetische anorganische Materialien (Bsp.: Hydroxylapatit,
Trikalziumphosphat, Biogläser)

natürliche organische Materialien (Bsp.: Kollagen, Fibringel)

natürliche anorganische Materialien (Bsp.: korallines Hydroxylapatit,
gereinigte anorganische bovine Knochenmatrix, AAA-Knochen)

Die wichtigsten resorbierbaren Implantatmaterialien stellen im Augenblick die Polymere der Milchsäure PLA (Poly-Lactic-Acid) und der Glykolsäure PGA (Poly-Glycolic-Acid) dar. Tierexperimentelle und klinische Studien ergaben vielversprechende Ergebnisse, sowohl im Einsatz als Knochenersatzmaterial, als auch als Carrier für Proteine und Wachstumsfaktoren [Hollinger und Leong 1996a, Miki und Imai 1996, Zellin und Linde 1997]. Vor allem die Beeinflussung der Abbaurate des Carriers durch unterschiedliche Zusammensetzung der Bestandteile erscheint hinsichtlich der Anforderungen von besonderer Bedeutung. Es muss jedoch erwähnt werden, dass durch den hydrolytischen Abbau des Materials eine lokale Ansäuerung des Gewebes erfolgen und eine

entzündliche Reaktion aufrecht erhalten werden kann, bis das Material vollständig abgebaut wird. Des Weiteren erscheint während der Regeneration eines knöchernen Defektes durch ein PLA/PGA Ersatzstück die Vaskularisation und damit die Sauerstoffversorgung aufgrund des Zerfalls des Materials deutlich reduziert und somit für die kritische Phase des Heilungsprozesses nicht geeignet zu sein [Winet 1995].

Die am weitest verbreiteten Implantattypen stellen sicherlich die Kalziumphosphate Hydroxylapatit (HA) und Trikalziumphosphat (TCP) dar. Die synthetisch hergestellten Apatitkristalle des HA zeigen eine ausgezeichnete Biokompatibilität und Osteokonduktivität und können als Granulat [Horch und Steegmann 1985] oder Festkörper eingesetzt werden. HA-Zement kann problemlos intraoperativ an die Gegebenheiten adaptiert werden und bindet ohne Wärmebildung ab [Costantino et al. 1991]. Probleme entstehen bei der individuellen Formgebung der Blöcke, die zumeist sehr spröde sind und nicht im Bereich lasttragender Regionen angebracht werden können. Die langen Resorptionszeiten führen häufig dazu, daß es zu einer Dislokation des Granulates unter Belastung kommt. Deutliche kürzere Degradationszeiten weist das β -TCP auf [Foitzik und Stamm 1997, Ramselaar et al. 1991] allerdings wird der abgebaute Teil nur zögerlich von Knochen ersetzt, so daß eine Konturstabilität nicht immer gewährleistet werden kann. Als Trägersubstanzen wurden Kalziumphosphate speziell für das bone morphogenetic proteins (BMP) bereits getestet [Ripamonti et al. 1992]. HA in Kombination mit BMP zeigte sich dem reinen HA bezüglich der Knochenneubildung in einem Schädeldefektmodell deutlich überlegen [Horisaka et al. 1994] Formbarer HA-Zement als Carrier wurde als Verbesserung des Gesamtsystems angesehen [Kamegai et al. 1994] zudem zeigte sich in dieser Studie eine Resorption des HA und ein direkter Ersatz durch neu gebildeten Knochen.

Biogläser können nach Implantation bleibende strukturelle Verbindungen mit dem Knochenlager eingehen und zeigen auch bezüglich der Stabilität ausreichende Qualität um als Last tragender Knochenersatz verwendet zu

werden. Neben der lokalen Stabilität, wird vor allem der rasche Ersatz durch Knochen hervorgehoben [Greenspan 1999, Stanley et al. 1997]. Die Funktion als Carrier für Proteine oder Wachstumsfaktoren zeigte bisher jedoch noch keine Erfolge.

Das Kollagen, speziell das Kollagen I, stellt mit 90% den Hauptbestandteil der organischen Knochenmatrix, den natürlichen Träger von Wachstumsfaktoren und den Bindungsort für Osteoblasten dar [Basle et al. 1998]. Nach geeigneter Vorbehandlung können Schwämme, Blöcke oder Granulat, zumeist aus boviner oder equiner Herkunft, in die zu rekonstruierenden Defekte eingebracht werden [Hemprich et al. 1989]. Durch Tamponade des Defektes mit dem Kollagenvlies können Blutkoagel vermieden werden, eine Grundvoraussetzung für ein rasches Einsprossen neu gebildeter Gefäße und somit einer raschen knöchernen Regeneration [Joos 1983]. Die Tatsache, dass die kollagene Matrix nicht abgebaut sondern in den regenerierten Knochen eingebaut wird, führt zu einer schnellen knöchernen Regeneration und es können Nebenwirkungen durch Spaltprodukte nahezu ausgeschlossen werden [Horisaka et al. 1994, Joos 1983]. In präklinischen Tierstudien wurde das Kollagen I als bevorzugtes Trägermaterial für rhBMP verwendet [Boyne 1995, Kübler et al. 1998, Kusumoto et al. 1997, Nevins et al. 1996]. Besondere Bedeutung fand die Identifikation von deutlich ausgeprägten angioiden Strukturen innerhalb des Kollagens nach vier Wochen und der ausgeprägte Einfluß auf die Mineralisation im Verlauf der Knochenregeneration [Horisaka et al. 1994, Kusumoto et al. 1997]. Aktuelle Entwicklungen zielen darauf ab, durch Denaturierung und Renaturierung boviner Kollagenmatrix einen schwer löslichen Komplex aus Kollagen und Nichtkollagen-Proteinen zu bilden, der die natürliche Zusammensetzung enthält und somit osteoinduktiv wirksam werden kann [Arzt et al. 1996]. Des Weiteren wird versucht, die Eigenschaften des Kollagens durch Kombination mit anderen Grundmaterialien (PLA/PGA oder Hydroxylapatit) zeitlich variabel zu gestalten.

Die natürlichen anorganischen Materialien werden von unterschiedlichen Spendern durch unterschiedliche Verfahren gewonnen. Neben phylogener

Matrix [Kasper et al. 1988] wird deproteinierte bovine Knochenmatrix [Schlickewei und Paul 1991], lösungsmittelkonservierte sterilisierte bovine Knochenmatrix [Günther et al. 1996] und autolyzierter, antigen-extrahierter, allogener Knochen [Kübler et al. 1993] eingesetzt. Untersuchungen in Kombination mit BMP [Terheyden und Jepsen 1999] einem bone inducing complex (BIC) [Feifel et al. 1995] und anderen osteoinduktiven Faktoren [Herr et al. 1993] wurden durchgeführt. Hinsichtlich der osteoinduktiven Eigenschaften der reinen Trägersubstanz konnten keine signifikanten Unterschiede zu den synthetisch hergestellten anorganischen Materialien festgestellt werden. Lediglich für den AAA-bone wird postuliert, dass die Herstellungsmethode eine Konservierung der osteoinduktiven Matrixproteine bei gleichzeitiger Extraktion der zellgebundenen Alloantigene ermöglicht [Kübler 1997].

1.5 Problemstellung

Nach den bisher dargestellten Grundlagen und dem aktuellen Stand der Forschung hinsichtlich der Untersuchung und Beeinflussung der Angiogenese während der Knochenregeneration unter dem Einfluss VEGF ergibt sich die Forderung, Ergebnisse und Daten von vorausgegangenen Studien und in vitro Modellen in eine in-vivo-Studie umzusetzen und zu untersuchen. Der Aufbau und die Eigenschaften des in vitro Modells müssen charakterisiert und optimiert sein, um sie in die in vivo Studie übernehmen zu können. Die Untersuchung soll in einer tierexperimentellen Studie stattfinden. Diese muss die Beurteilung der Angiogenese während der Knochenregeneration in einem Kaninchenunterkieferdefektmodell und die Beurteilung der qualitativen und quantitativen Veränderung der Knochenregeneration und der Angiogenese unter dem Einfluß von VEGF beinhalten. Zudem muss die Wirkung der Zeit auf die Regeneration verdeutlicht werden und mit dem Einfluss von VEGF im zeitlichen Verlauf vergleichbar sein. Ferner ist morphologisch und quantitativ zu

klären, ob und wie weit sich eine Beeinflussung der Gefäßneubildung auf die Knochenregeneration auswirkt und wie viele Unterschiede zwischen angiogener.

2 Material und Methode

2.1 Grundlagen

Nach Erfolgs versprechenden in vitro Untersuchungen für VEGF₁₆₅ bei der Knochenregeneration soll nun eine in vivo Studie klären, wieweit eine Umsetzung der Ergebnisse auf einen Organismus erfolgen kann. Es soll die biologische Aktivität des Faktors in Verbindung mit einem konventionellen Kollagen I auf die Osteogenese im Vergleich mit Kollagen ohne VEGF bzw. einer „Leerprobe“ mit einem Blutkoagel analysiert werden. Die Auswahl erfolgte unter dem Gesichtspunkt des Lebensalters sowie den zum Vergleich vorliegenden Erfahrungen anderer Arbeitsgruppen bezüglich der Knochenregeneration im Tiermodell. In verschiedenen experimentellen Studien konnte die gute Eignung vom Kaninchenmodell für Experimente mit Zytokinen nachgewiesen werden [Eppley et al. 1991, Kübler 1998, Schenk 1994, Walgenbach et al. 1998]. Auch die Wirksamkeit von humanem VEGF₁₆₅ im Kaninchenmodell [Takeshita et al. 1996] sprach für dessen Auswahl.

2.1.1 Tiermodell

Als Versuchstiere wurden insgesamt 56 skelettal ausgereifte männliche Kaninchen der Rasse „White New Zealand Rabbits“ herangezogen. Sie hatten ein durchschnittliches Gewicht von 3800 g. Die Haltung der Tiere erfolgte unter Standardlaborbedingungen. Jedes Kaninchen wurde im Einzelkäfig und unter gleichen sozialen Bedingungen gehalten. Als Futter erhielten die Tiere eine Standarddiät und zusätzlich Wasser ad libidum, entsprechend den Richtlinien zur Tierhaltung der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster. Eine präoperative Akkomodationszeit an die Laborbedingungen von mindestens einer

Woche wurde eingehalten. Nach Operation in Vollnarkose wurden die Tiere nach jeweils verschiedenen Intervallen euthanisiert und die zu untersuchenden Regionen explantiert und untersucht. Dabei entsprach der experimentelle Ablauf den Anforderungen des Tierschutzgesetzes und war durch das Regierungspräsidium Münster mit dem Aktenzeichen 23.0835.1.0 (G 46 / 97) vom 12. Januar 1998 genehmigt worden.

2.1.2 Probeneinteilung – Implantate

Die Einteilung der Proben erfolgte in drei Hauptgruppen, welche sich durch das Substrat zur Füllung des Bohrlochdefektes unterschieden. Pro Tier wurden im Unterkiefer insgesamt vier Bohrlochdefekte gesetzt, welche entweder mit Kollagen, Kollagen-VEGF-Komplex oder Blutkoagel als Leerprobe gefüllt wurden. Die einzelnen Tiere wurden später nach verschiedenem Heilungsintervall euthanisiert und der Progress der Restitutio histologisch untersucht. Zur Einteilung siehe Tabelle 1.

Gruppe	Defektfüllung	Regio	Tage	Anzahl Proben/Tiere
Kontrollgruppe K1	Leer	3+4	3/7/14/28	56/28
Kontrollgruppe K2	Kollagen	1+2	3/7/14/28	56/28
Studiengruppe S	Koll. + VEGF ₁₆₅	1+2+3+4	3/7/14/28	112/28

Tab. 1: Gruppen- und Probeneinteilung

Die Proben der Kontrollgruppen (K1, K2) und der Studiengruppe S1 mit dem zu untersuchenden Cytokin stammten von getrennten Tierserien, um systemische Effekte des VEGF₁₆₅ auf die Gegenseite eines Tieres zu vermeiden. Die Einlage der Implantate (Typ-1 Kollagen, Typ-1 Kollagen-VEGF₁₆₅-Komplex) und die Anlage der Leerproben erfolgte in 4 regional definierte Bohrdefekte (Regionen 1-4) pro Tier, wobei Regio 1 im Kieferwinkelbereich distokaudal des letzten Molaren rechts, Regio 2 im Corpusbereich kaudal der Schneidezahnwurzel

rechts gewählt wurden. Regio 3 und Regio 4 wurden analog der Zahnformel spiegelbildlich anterior bzw. posterior festgelegt (Abb.1 und 2).

Dabei waren in den Regionen 3 und 4 Leer-Kontrollproben und in den Regionen 1 und 2 Kollagen-Kontrollproben, um systemische Wirkungen durch VEGF zu vermeiden. So konnte auch die Anzahl der Versuchstiere gering gehalten werden. In der Studiengruppe beinhalteten alle 4 Regionen eines Tieres Typ-1 Kollagen mit VEGF₁₆₅ (Tab.1). Insgesamt waren nicht alle Proben, sondern 7 Proben pro Zeitpunkt (3, 7, 14, 28 Tage) und Gruppe für die Paraffineinbettung und für die immunhistologische Untersuchung vorgesehen.

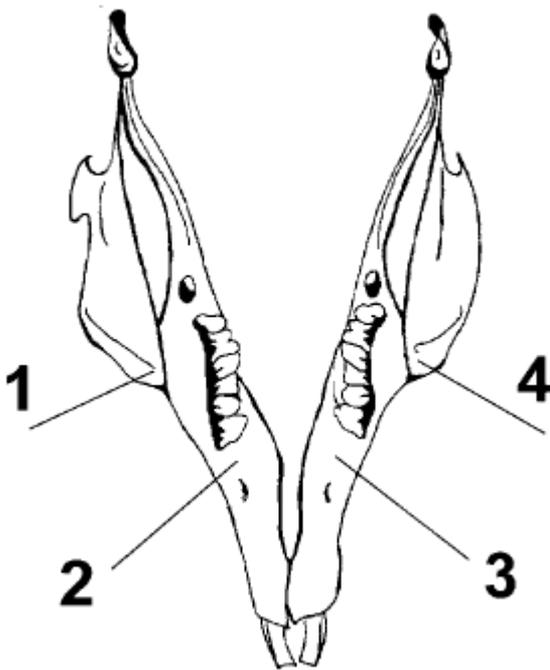


Abb. 1: Bohrlöcher Aufsicht von oben

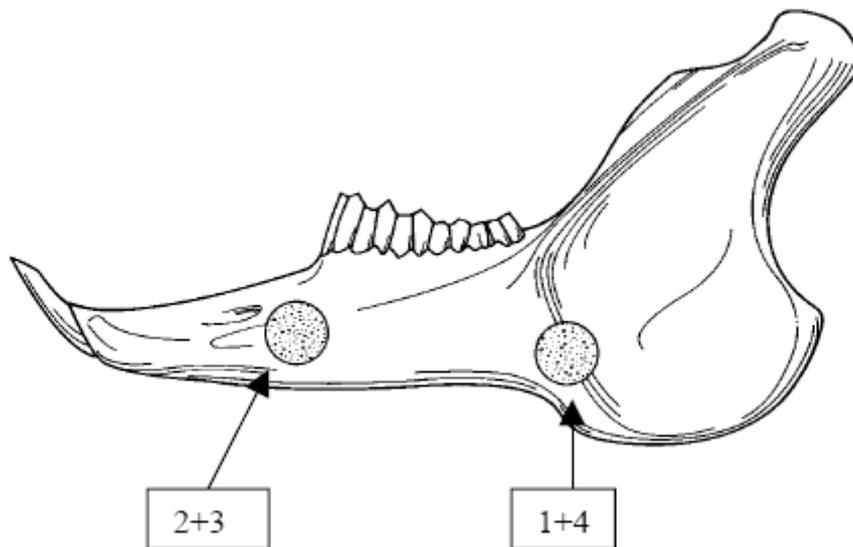


Abb. 2 Bohrlöcher von der Seite

Für die Bestimmung einer ausreichenden VEGF₁₆₅-Konzentration des Kollagenimplantates im Tiermodell wurden Ergebnisse von in vitro Untersuchungen von Kleinheinz et al. 2000 als Referenz herangezogen.

Das Volumen des Bohrdefekts (Durchmesser: 5mm, Höhe: 5mm), die Freisetzungseigenschaften und die auf Endothelzellen biologisch wirksame Konzentration wurden mit einbezogen. Aus dem in vitro Modell ging hervor, dass die nach 48 h freigesetzte VEGF₁₆₅ -menge aus einem Kollagenimplantat, beladen mit 800ng VEGF₁₆₅, in einem Kreislaufsystem mit einem Volumen von 80 ml, nach 48 h bei 10 pg/ml liegt. Der Bohrzylinder ($H \cdot r^2 \cdot \pi = 5 \cdot 2,5^2 \cdot \pi$) weist ein Regenerationsvolumen von 98mm³ (98µl) auf. Im Tierversuch würde bei gleichbleibender Freisetzungskinetik eine lokale Konzentration von mindestens 10 ng/ml vorliegen.

Für eine ausreichende Promotion der Endothelzellen durch VEGF₁₆₅ ist eine Konzentration von bis 6 ng/ml notwendig und ausreichend nach Conn et al. 1990 . Daraus lässt sich schließen, dass zur Stimulierung der endothelialen Zellproliferation im und um den Bohrdefekt eine Konzentration von 0,8µg VEGF₁₆₅ ausreicht.

Es wurden daher industriell gefertigte (Resorba, Nürnberg) mit 800ng VEGF₁₆₅ beladene Typ-1 Kollagen-Implantate als Träger-Cytokin-Komplex eingesetzt.

2.1.3 Narkoseverfahren

Die Betäubung der Kaninchen erfolgte in Allgemeinanästhesie unter Beibehaltung der Spontanatmung. Nach Wiegen der Tiere zur Ermittlung des Körpergewichts wurde die entsprechende dem Gewicht adaptierte Anästhesielösungen aus 3,0 mg Xylazinhydrochlorid (Xylazin 2%) / kg KG , 20 mg Ketaminhydrochlorid (Ketanest) / kg KG und 0,25 mg Atropinsulfat / kg KG in separaten Spritzen aufgezogen.

Die Anästhesielösungen wurden intramuskulär in der gluteal- Region injiziert. Xylazin wirkte als Sedativum und Muskelrelaxanz. Das Ketanest wirkte sedativ und analgetisch. Anschließend wurde zusätzlich im Operationsgebiet 1,2ml 2%iges Ultracain zur perioperativen Analgesie und zur Vasokonstriktion injiziert.

2.1.4 Operatives Verfahren - Implantation

In Narkose wurde dem Kaninchen die submandibulären Region, der Hals links und rechts und eines der Ohrinnenseiten rasiert. Anschließend erfolgte die Lagerung des Tieres auf dem Operationstisch. Nach steriler Abdeckung erfolgte die Desinfektion mit Betaisodona-Lösung der rasierten Areale. Am rasierten Ohr wurden aus einer Ohrvene Blutproben entnommen. Die Monovetten wurden sofort kühl gelagert und anschließend als Vollblut und abzentrifugiertes Serum der Auswertung zugeführt um eventuelle systemische Auswirkungen des VEGF₁₆₅ auf den Gesamtorganismus festzustellen. Anschließend wurde in die Submandibularloge links und rechts 1,2 ml 2%iges Ultracain zur Vasokonstriktion und Analgesie subkutan injiziert. Jetzt wurde eine mediane Inzision von ca. 4 cm in der Submandibularregion durchgeführt. Unter Schonung der V. facialis und anderen kleineren Gefäße wurde sukzessive bis

auf den Unterkieferunterrand präpariert. Dabei musste die Sehne der Muskelschlinge, gebildet aus dem M. masseter und dem M. pterygoideus medialis, durchtrennt werden. Kleinere Blutungen wurden mit der bipolaren Pinzette subtil koaguliert. Anschließend wurde im Bereich des Unterkieferrandes das Periost scharf mit einem Skalpell durchtrennt und mit einem Raspatorium vom Korpusbereich subperiostal präpariert. Dies erfolgte sowohl auf der bukkalen wie auch auf der lingualen Korpusoberfläche. Die Konstruktion des Bohrzylinders erfolgte mit einem Trepanbohrer mit 5mm Außendurchmesser. Die Bohrung erfolgte von der bukkalen Fläche ausgehend drucklos in linguale Richtung. An der lingualen Fläche wurde ein Raspatorium zum Schutz des Weichgewebes im Mundbodenbereich positioniert. Zur Protektion vor Wärmeschaden des Unterkieferknochens durch die Bohrung wurde ständig mit steriler Kochsalzlösung gespült. Auf jeder Kieferhälfte wurden jeweils 2 Implantatlager, eine im anterioren Bereich caudal der Schneidezahnwurzeln und eine am Übergang vom Korpus zum aufsteigenden Ast distocaudal der Seitenzahnwurzeln, konstruiert. Anschließend folgte die Einlage aus reinem Typ-1 Kollagen oder Typ-1 Kollagen mit VEGF₁₆₅ in die Implantatlager. Bis zum Zeitpunkt der Implantation wurden die Implantate bei -25°C gelagert. Zur Gewinnung von Leerproben wurden einige Implantatlager leer gelassen, so dass sie sich mit einem Blutkoagel füllen konnten. Vor dem Wundverschluss wurde die Wunde mit physiologischer Kochsalzlösung gespült. Anschließend erfolgte die Rekonstruktion der Muskelschlinge und der Subcutis mit 4-0 Vicryl Einzelknopfnähten und der Haut mit 5-0 monofilen Prolene Einzelknopfnähten (Abb. 3- Bilder A-H). Als Verband diente ein Sprühpflaster. Eine postoperative, prophylaktisch-antibiotische und -analgetische Medikation wurde nicht verabreicht. In engen Zeitabständen wurden die Tiere klinisch beobachtet. Die ausreichende Nahrungsaufnahme sowie die Ausscheidung der Kaninchen wurden kontrolliert. Postoperativ wurde bedingt durch die Nachwirkungen der Narkose und des Eingriffs, eine eingeschränkte Nahrungsaufnahme kurzfristig beobachtet. Der operative Eingriff an den Tieren verlief bei allen Versuchstieren komplikationslos.

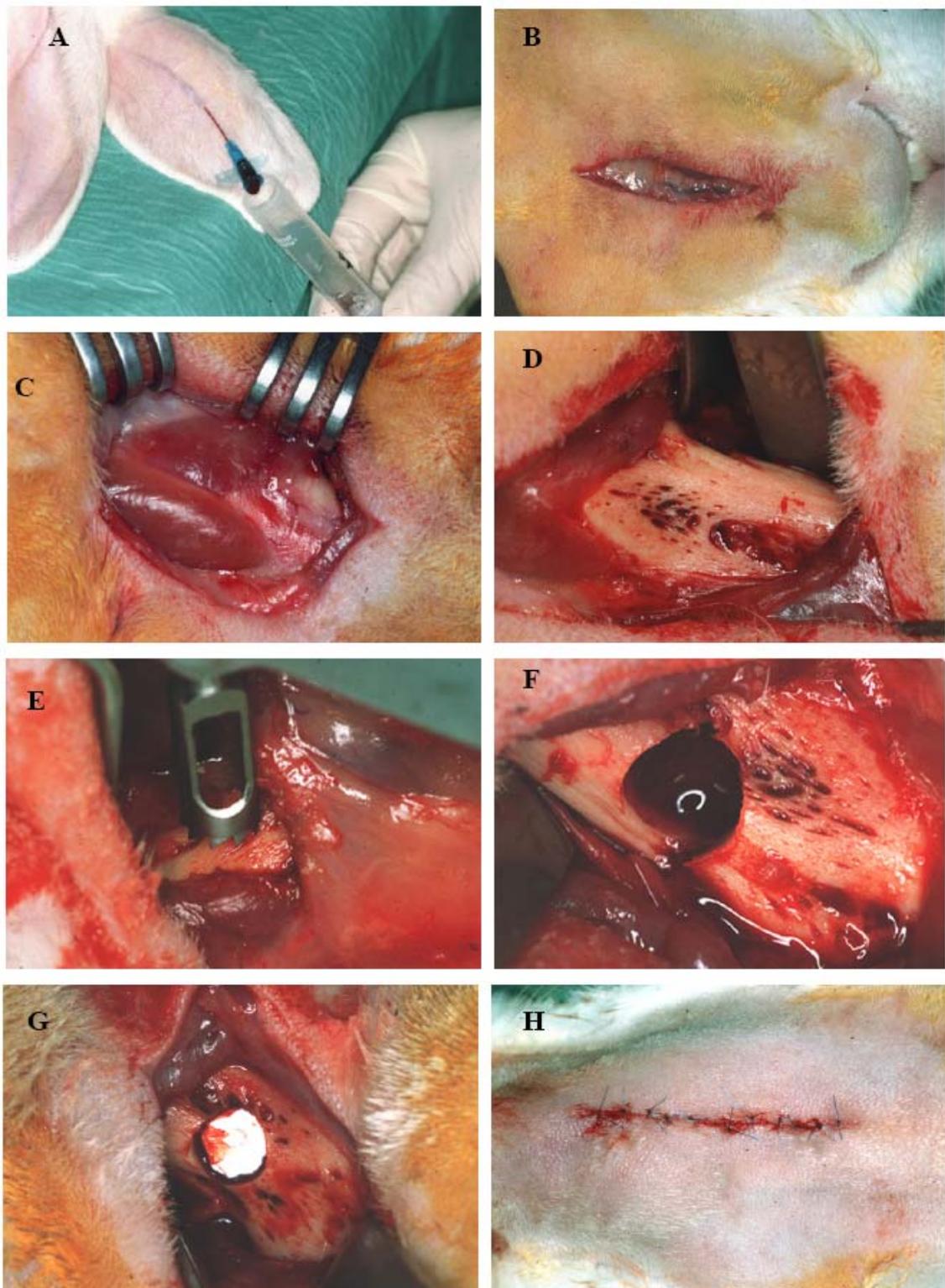


Abb. 3: Operativer Verlauf

2.1.5 Operative Explantation – Paraffineinbettung

Die Entnahme der Proben erfolgte in der zweiten Operation nach 3, 7, 14 oder 28 Tagen nach bereits beschriebener Narkotisierung und der Blutentnahme aus der Ohrvene. Die Kaninchen wurden exzitationslos geopfert mittels intrakardialer Injektion von 2ml des Tötungsmittels T61. Nach Feststellung des Todes wurden Organproben von Herz, Leber, Niere, Milz, Speicheldrüse und Lymphknoten und eine Urinprobe direkt aus der Harnblase zur weiteren Diagnostik entnommen. Jetzt erfolgte die Exartikulation des Unterkiefers und Entfernung des Weichgewebsmantels. Anschließend wurden die Implantatlager makroskopisch betrachtet und untersucht. Drei Tiere mit insgesamt vier Proben wiesen Zeichen einer Infektion des Präparationsbereichs auf. Diese Präparate wurden nicht verwertet. Die makroskopischen erkennbaren Befunde differierten einerseits in der Einlageform (Leer, Kollagen oder VEGF₁₆₅) und in der Einlagezeit bis zur Explantation (3, 7, 14 oder 28 Tage). Zur radiologischen Untersuchung wurden von den implantierten Regionen Röntgenbilder mit einem Langtubusröntgengerät bei definierter Einstellung (70 kV, 7 mA) auf Zahnfilmen (2,5 x 4,0 cm) aufgenommen. Anschließend wurde der Defektbereich als Gesamtprobe, mit dem Implantations- bzw. Regenerationsbereich, mit einer diamantierten Trennscheibe unter Kühlung mit steriler Natriumchloridlösung in Rechteckform aus dem Kiefer herausgeschnitten und bis zur weiteren Bearbeitung und Entkalkung nach folgendem Protokoll einzeln in 4%igem Paraformaldehyd fixiert.

2.1.6 Histologie und Immunhistologie

Lichtmikroskopie – Paraffineinbettung

Die knöchernen Proben aus den Regenerationsbereichen wurden mit einer Diamanttrennscheibe in Blockform aus den Kiefern herausgeschnitten und sofort fixiert (siehe Protokoll). Nach Entkalkung und Einbettung erfolgte die

Anfertigung von Schnitten aus dem zentralen Bereich des Regenerates ,um eventuelle Einflüsse der Weichgewebe an den oberflächlichen Schnitten bei der Analyse auszuschließen. Die Auswertung der Schnitte erfolgte an definierten Stellen.

Entkalkung

Die Herstellung der Proben erfolgt nach folgendem Standardverfahren zur Aufbereitung von biologischen Knochenproben (Entkalkung) für die histologische, immunhistologische und histomorphometrische Untersuchung:

- Fixierung der Probe für 24 h bei RT in 4 % Paraformaldehyd
- Spülung für 24 h in 0,1 m PBS (pH 7,4) mit zweimaligem Wechsel
- Entkalkung der Proben über 8 -10 Wochen in einem 10 ml fassenden Probegefäß in 20 % EDTA und 0,2 % Paraformaldehyd (pH 7,3); die Lösung wurde wöchentlich gewechselt
- der Endpunkt des Entkalkungsvorganges wurde durch stichprobenartige Röntgenkontrollen und Erfahrungswerte des Labors festgestellt
- Spülung für 24 h in 0,1 m PBS (pH 7,4) mit zweimaligem Wechsel
- Dehydratation durch eine aufsteigende Alkoholreihe (50 % - 70 % - 90 % - 96 %) in 24 h Abständen
- Abschluß mit 100 % Isopropylalkohol
- Verdrängung von Restalkohol und eventuellen Wasserrückständen durch Einlagerung für 24 h - 72 h in Zedernholzöl und anschließende Einlagerung für 24 h in einem Zedernholzöl/Paraffingemisch (Verhältnis 1:1)
- Einbettung in reines Paraffin für 24 h bei 60°C
- Einbettung in ein Paraffin-Polymer-Gemisch mit DMSO für 3 x 24 h bei 60°C und dreimaligem Wechsel
- Ausgießen in eine Blockform und Abkühlung bei RT

- Schneiden der Paraffinblöcke in 8-10 µm Schnitte mit einem Rotationsmikrotom
- Aufziehen der Schnitte auf Objektträger

Gestützt auf das theoretische Modell der Knochenregeneration, welches besagt, dass knöcherne Defekte von außen, von der Peripherie zum Zentrum hin, regenerieren, dabei jedoch mittig primär die größte Anlagerung erreicht wird, und sich die Knochenlamellen dort zuerst konzentrisch vereinigen [Brockmann 2003], wurden histologische Schnitte mit einer Dicke von 10 µm stets aus der Mitte des entnommenen Probenzylinders angefertigt.

Immunhistologie

An den Paraffinschnitten wurde immunhistologisch der spezifische Nachweis und die Darstellung von Endothelien geführt, wofür der monoklonale Antikörper CD 31 / PECAM-1 und der von Willebrand Faktor der Literaturhinweise entsprechend verwendet wurden [Albelda et al. 1991, Baldwin et al. 1994, Horak et al. 1992, Rabie 1997]

Die Detektion des CD 31 / PECAM-1 erfolgte mit einem auf der Streptavidin-Biotin-Methode basierenden Catalyzed Signal Amplifikation (CSA) System, mit Peroxidase als Enzym und DAB-Wasserstoffperoxid als Chromogen-Substrat. Die Durchführung stützte sich auf die Protokolle von Bobrow et al. 1991 und Arras et al. 1998.

Für den von Willebrand Faktor wurde eine universelle Avidin-Biotin-Peroxidase-Methode (A.B.C.), von Hanke et al. 1999 für den Einsatz am Kaninchen beschrieben, angewandt.

Protokoll für CD 31 / PECAM-1

- Entparaffinieren der Schnitte mit Xylol für 2 x 10 min
- Rehydratation über eine absteigende Alkoholreihe (100 % - 96 % - 70 %) für jeweils 10 min
- Spülung in Aqua dest.
- Antigendemaskierung durch eine Mikrowellenvorbehandlung mit 10 mM Citratpuffer (pH 6,0) für 5,5 min bei 500 Watt
- Abkühlen der Schnitte für 20 min bei RT
- Spülen mit 0,05 M Tris-HCL-Puffer (pH 7,6)
- Blockierung der endogenen Peroxydase durch Inkubation über 5 min bei RT mit 3 % H₂O₂
- Spülen mit Puffer und Lagerung im CSA-Puffer
- 5 min Inkubation bei RT mit Blockierungsreagenz (serumfreies Protein in PBS mit 15 mM NaN₃)
- 15 min Inkubation bei RT mit Primärantikörper CD 31 (die optimale Verdünnung wurde im Vorfeld ausgetestet und betrug 1:20)
- Spülen mit Puffer und Lagerung im Pufferbad
- 15 min Inkubation bei RT mit Brückenantikörper (biotinylierte F(ab')₂ Kaninchen Anti-Mausimmunoglobuline in Tris-HCL-Puffer mit Trägerprotein)
- Spülen mit Puffer und Lagerung im Pufferbad
- 15 min Inkubation bei RT mit Streptavidin-Biotin-Peroxidasekomplex
- Spülen mit Puffer und Lagerung im Pufferbad
- 15 min Inkubation bei RT mit Verstärkungsreagenz (biotinyliertes Tyramin und H₂O₂ in PBS mit Trägerprotein und antimikrobiellem Agens)
- Spülen mit Puffer und Lagerung im Pufferbad
- 15 min Inkubation bei RT mit Streptavidin-Peroxidase-Konjugat
- Spülen mit Puffer und Lagerung im Pufferbad
- 5 min Inkubation bei RT mit Substrat-Chromogenlösung (DAB-Chromogen)
- Spülen mit Aqua dest.
- 2-3 sec Inkubation bei RT mit Hämatoxylin zur Gegenfärbung

- Spülen mit Leitungswasser
- Dehydratation über eine aufsteigende Alkoholreihe (50 % - 70 % - 96 % - 100 %)
- 5-10 min Xylol zum Alkoholentzug
- Eindecken der Gewebeschnitte mit Metacrylat (DePeX)

Protokoll für den von Willebrand Faktor

- Entparaffinieren der Schnitte mit Xylol für 2 x 10 min
- Rehydratation über eine absteigende Alkoholreihe (100 % - 96 % - 70 %) für jeweils 10 min
- Blockierung der endogenen Peroxydase durch Inkubation für 15 min in 3% Hydrogenperoxidase-Lösung
- Spülen mit Aqua dest.
- Antigendemaskierung durch Kochen in 10 mM Citratpuffer (pH 6,0) für 2 -3 min im Schnellkochtopf
- Spülen mit 0,1 M Tris-HCL-Puffer (pH 7,6)
- 45 min Inkubation bei RT mit Primärantikörper (die optimale Verdünnung wurde im Vorfeld ausgetestet und betrug 1:100)
- Spülen mit Puffer
- 30 min Inkubation bei RT mit universal secondary antibody (Verdünnung 1 : 100)
- Spülen mit Puffer
- 30 min Inkubation bei RT mit ABC-Reagenz
- Spülen mit Puffer
- 6 min Inkubation bei RT mit Peroxidase-Chromogen-Substrat
- Spülen mit Puffer
- 2-3 sec Inkubation bei RT mit Hämatoxylin zur Gegenfärbung
- Spülen mit Leitungswasser
- Dehydratation über eine aufsteigende Alkoholreihe (50 % - 70 % - 96 % - 100 %)

- 5-10 min Xylol zum Alkoholentzug
- Eindecken der Gewebeschnitte mit Metacrylat

Die Qualitätskontrolle erfolgte bei allen Gewebeschnitten über eine negative Gewebeprobe, bei der unspezifische Anfärbungen ausgeschlossen wurden.

Auswertungskriterium und Auswertungsmethoden

Zur Auswertung wurden ausgewählte Präparate verwendet. Es wurden nur unbeschädigte und fehlerfreie Proben der 3-, 7-, 14- und 28-Tages-Tiere herangezogen. Defekte oder fehlerhaft geschnittene Präparate wurden verworfen. Es wurde berücksichtigt, dass keine großen Varianzen oder Dislokationen in der Auswahl der Schnittebene lagen.

Immunhistologische Untersuchung

Nach Anfärbung mit Hilfe des spezifischen Antikörper CD 31 und den von Willebrand Faktor wurden die angefertigten Schnitte unter dem Lichtmikroskop bei 40 bis 400- facher Vergrößerung deskriptiv nach morphologischen Kriterien, Verteilungsmustern sowie Lokalisation des markierten Endothels untersucht. Speziell an den Übergangsbereichen (ortsständiger Knochen – regenerierter Knochen – Kollagenimplantat) wurden die Schnitte untersucht. Die Vergleiche erfolgten unter den einzelnen Gruppen und im zeitlichen Verlauf.

Auswertung Gefäßdichte und Gefäßquerschnitt

Die Quantifizierung der Gefäßdichte und des Gefäßquerschnitts pro Sichtfeld wurde in Anlehnung an die von Augustin et al. 1995, Kleinheinz et al. 1997 und Weidner et al. 1991 beschriebenen Verfahren durchgeführt. Zunächst erfolgte bei 100- facher Vergrößerung eine Übersicht über die Probe und die randomisierte Auswahl von 5 sogenannten „hot spots“ [Takano et al. 1996]. Diese wurden fotografiert, digitalisiert und mit Hilfe der Bildbearbeitungsprogramme ImageTool 2.0 und Corel Photo-Paint 8.0 quantitativ ausgewertet.

Die Werte für die Gefäßdichte (= Anzahl der Gefäße / 1,18 mm² hot spot) und die Vaskularisation (= Gefäßfläche / 1,18mm² hot spot) wurden unter der Annahme einer Normalverteilung mit dem Statistikprogramm SPSS 9.0

zunächst rein deskriptiv und anschließend mit einer Rang-Varianzanalyse nach Kruskal-Wallis[Miller1980]ausgewertet.

3 ERGEBNISSE

3.1 Makroskopisch-klinische Beurteilung

Der klinisch-makroskopische Befund differierte je nach Studiengruppe und Zeitpunkt der Probenentnahme. An keiner der entnommenen Proben waren Zeichen von Infektionen, Resorptionen oder Atrophien festzustellen.

In den Proben ohne Implantateinlage konnte klinisch nach 3 Tagen ein stabiles randbildendes Koagel festgestellt werden, welches den Defekt vollständig ausfüllt.(Abb. 4)

Anzeichen einer Hartgewebsbildung waren nicht zu erkennen.

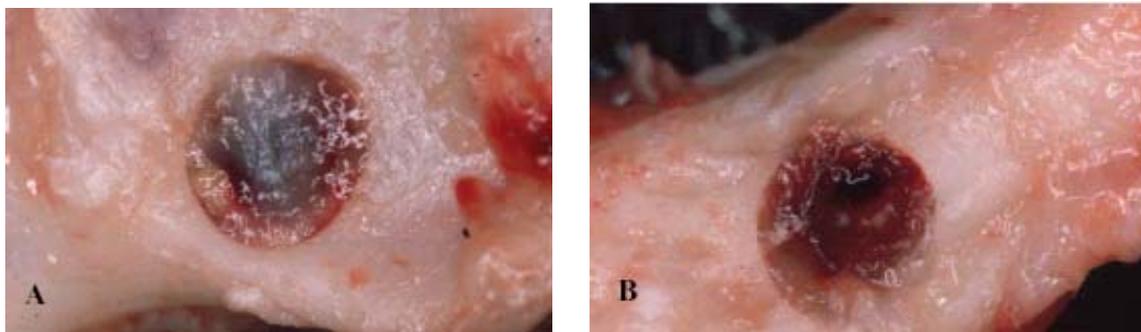


Abb. 4: Stabiles randbildendes Koagel nach drei Tagen in Regio 4 (A) und 3 (B) in einem ungefüllten Defekt.

In den Kollagenproben ohne Faktorzusatz und Implantaten mit VEGF₁₆₅ war nach drei Tagen die typisch retikuläre Kollagenstruktur für Kollagenimplantate noch zu erkennen.

Das Kollagen hatte durch seine Quellungstendenz an Volumen zugenommen, so dass der Defekt randbildend mit teilweise überragenden Kollagenanteilen ausgefüllt wurde.(Abb. 5)

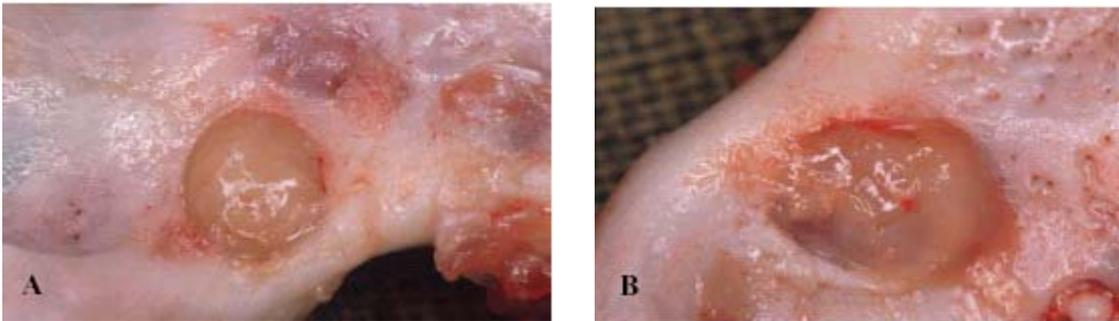


Abb. 5: Deutliche Quellungstendenz des Kollagenimplantates nach drei Tagen in Regio 2 (A) und 3 (B).

Erst nach dem 14. Tag war makroskopisch in allen Gruppen (Leer, Kollagen und VEGF₁₆₅) eine knöcherne Regeneration in den Randzonen festzustellen. Im zentralen Bereich waren noch Kollagenimplantatreste nachweisbar (Abb. 6).



Abb. 6: Defekt aus der Studiengruppe mit VEGF₁₆₅ – Freisetzung nach 14 Tagen.

Am 28. Tag war bei den Proben mit dem Faktor-Kollagen-Komplex der Defekt fast vollständig knöchern regeneriert. Die Verknöcherung war oberflächlich homogen und auch im Zentrum fortgeschritten.

In einzelnen Proben war im Zentrum noch Kollagen und weiches fibrochondroides Gewebe erkennbar (Abb. 7).



Abb. 7: Defekt aus der Studiengruppe nach VEGF₁₆₅ – Freisetzung nach 28 Tagen.

Zum Vergleich wiesen die Leerproben ebenfalls die gleiche Ausrichtung der Verknöcherung vom Rand zum Zentrum hin auf. Nach 28 Tagen war die Ausprägung der Knochenregeneration im Vergleich zu den Proben mit Kollagen und Kollagen mit VEGF deutlich schwächer. Auch die reinen Kollagenproben wiesen gegenüber der Leerprobe lediglich im Randbereich eine fortgeschrittenere Verknöcherung auf.

3.2 Mikroskopisch – Immunhistologische Auswertung

Die spezifischen Antikörper CD 31 und von Willebrand Faktor erlaubten eine differenzierte Beurteilung von Lokalisation, Ausdehnung, zeitlichem Verlauf und Struktur der Gefäßneubildung durch Darstellung der Endothelien. Gezielt an den Übergangsbereichen (ortsständigen Knochen - regenerierter Knochen - Kollagenimplantates) konnte das Verteilungsmuster der Gefäße mit der Knochenneubildungsfront verglichen werden (Abb. 8).

Der Vergleich erfolgte unter den einzelnen Gruppen und im zeitlichen Verlauf.

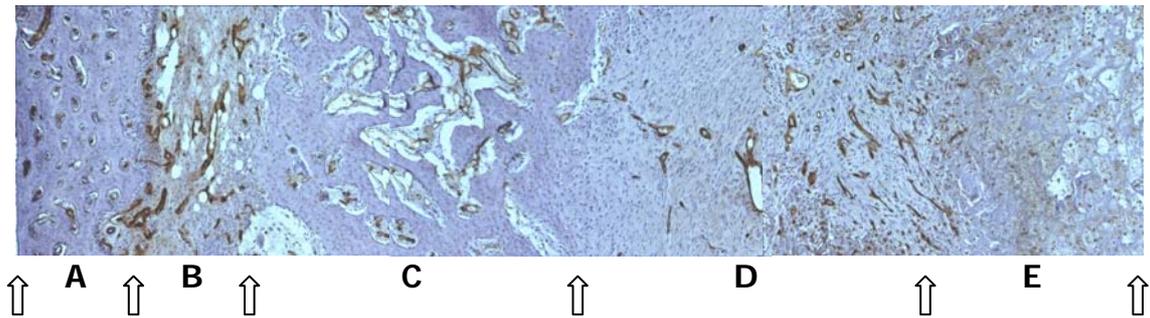


Abb. 8: Querschnitt durch einen Regenerationsbereich nach 14 Tagen. (A) ortsständiger Knochen, (B) Randzone, (C) regenerierter trabekulärer Knochen, (D) fibro-össare Übergangszone, (E) Kollagenimplantat (Endothelmarkierung: CD 31, Vergrößerung x 100).

Nach 3 Tagen ist eine Mehranfärbung der Zellen zwischen Knochen und Kollagenimplantat im Spaltbereich festzustellen (Abb. 9). Es kommt bei der Anfärbung mit vWF zur Anfärbung freier Endothelien mit zusätzlicher Markierung von noch nicht abgebauten Thrombozyten, Monozyten und Granulozyten.

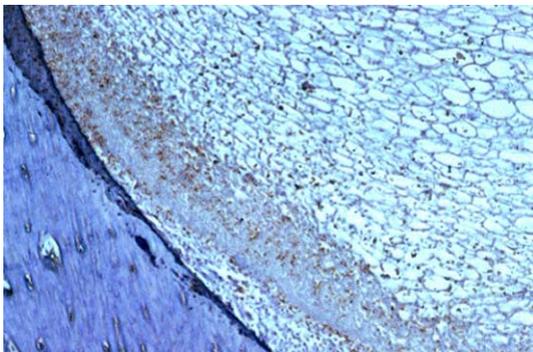


Abb. 9: Kollagenimplantat nach drei Tagen (vWF). Darstellung des Randspaltes mit vermehrter Markierung von Zellen (Vergrößerung x 40).

Die Vergrößerung demonstriert, dass das Zentrum des Implantates nur geringe Mengen an Blutzellen und Endothelien enthält (Abb.10).

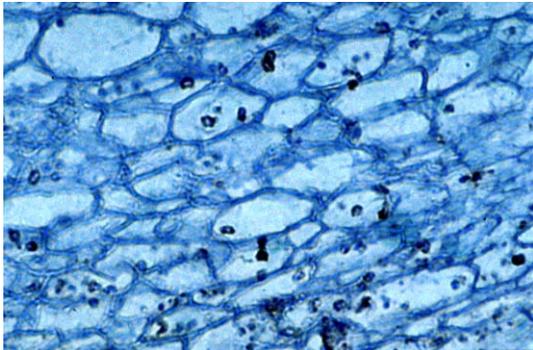


Abb. 10: Kollagenimplantat nach drei Tagen (vWF). Die Detailaufnahme zeigt nur wenige Markierungen im Zentrum des Implantates (Vergrößerung x 400).

Nach sieben Tagen kommt es zur ersten Ausbildung vaskulärer Strukturen und Strukturveränderung des Kollagengerüsts in Abhängigkeit von der Lokalisation innerhalb des Defektes (Abb.11).

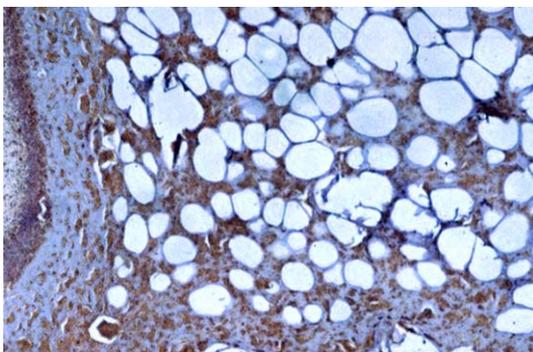


Abb. 11: Kollagenfüllung nach 7 Tagen mit VEGF₁₆₅ (CD 31). Übersichtsaufnahme mit Bereichen unterschiedlicher Kollagenstrukturen (x 100).

Der Randspalt zeigte bereits deutliche tubuläre Formationen (Abb.12).

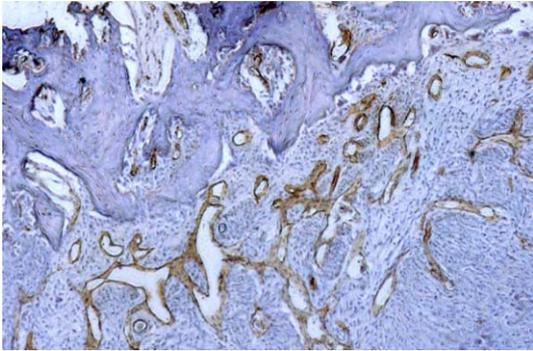


Abb. 12: *Kollagenfüllung nach 7 Tagen mit VEGF₁₆₅ (CD 31). Am Übergang zum ortsständigen Knochen kann eine ausgeprägte Gefäßneubildung dargestellt werden (x 100).*

Der Übergang vom ortsständigen Knochen zum Kollagengerüst ist faserig verschmolzen und beladen mit kleinen Clustern von Endothelien und Resten von Blutzellen (Abb.13).

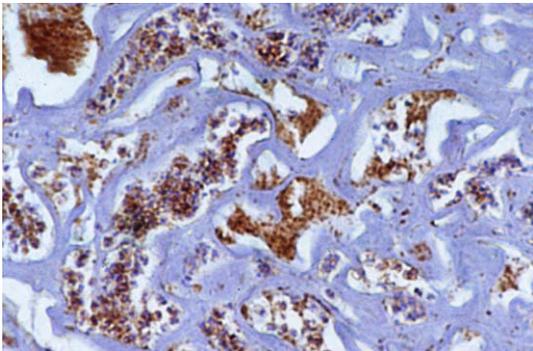


Abb. 13: *Kollagenfüllung nach 7 Tagen mit VEGF₁₆₅ (CD 31). Umgebaute Kollagenstrukturen mit Einlagerung von Blut- und Endothelzellen (x 200).*

Der überwiegende Anteil des Kollagengerüstes weist nach wie vor eine retikuläre Struktur auf, wenngleich die einzelnen Verstrebungen deutliche Zeichen einer Aufquellung durch die Einlagerung von Blutzellen aufweisen (Abb.14).

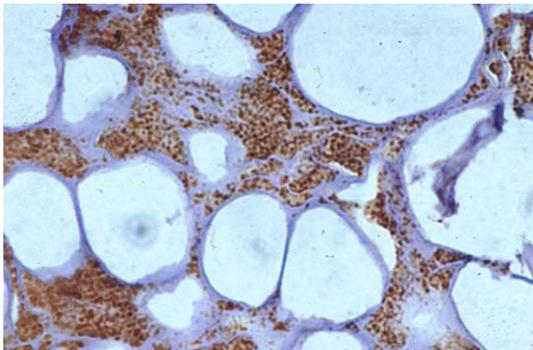


Abb. 14: Kollagenfüllung nach 7 Tagen mit VEGF₁₆₅ (CD 31). Verdickte retikuläre Grundstruktur des Kollagens mit Einlagerung von Zellen (x 400).

Nach 14 Tagen tritt eine weitere Strukturveränderung des Kollagens und der nun deutlich mengenmäßig zunehmenden Ausbildung endothelial gebildeter Kapillaren ein. Diese finden sich innerhalb des neu gebildeten Knochens (Abb.15A), im direkten Bereich der osteogenen Front (Abb.15B) und im Kollagenimplantat (Abb.15C+D).

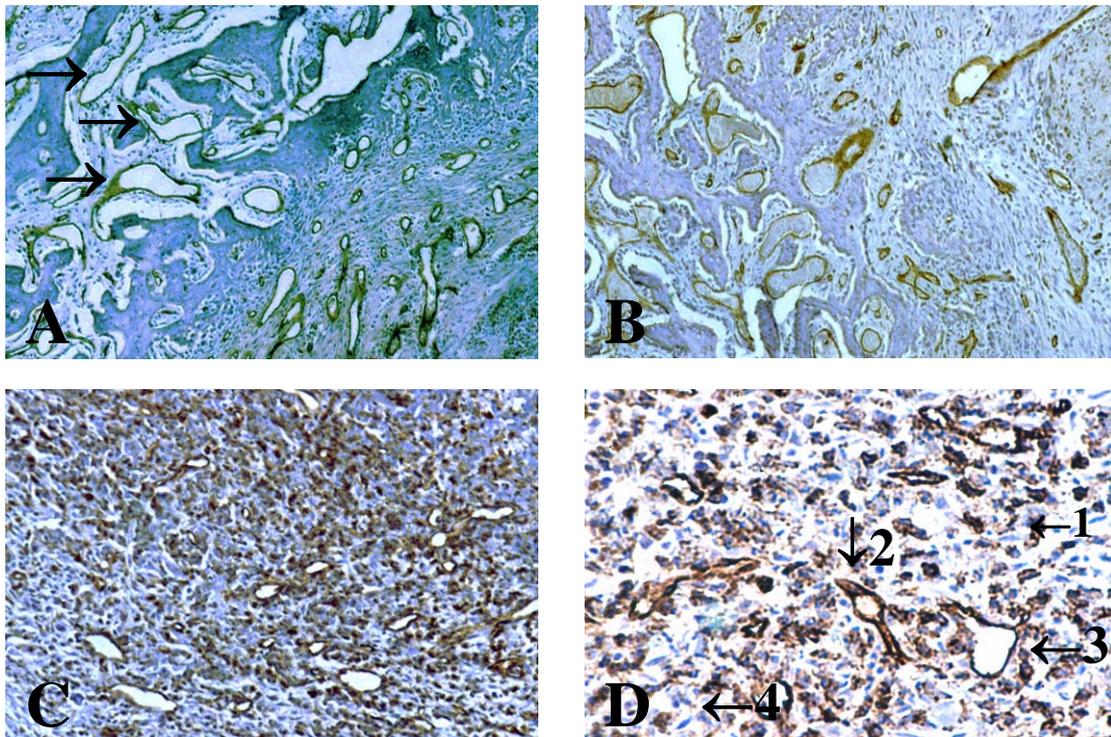


Abb. 15 A-D: Kollagenfüllung mit Faktor nach 14 Tagen (CD 31). (A) Sowohl in der Knochenneubildungszone als auch in den Trabekeln sind Gefäße erkennbar (→) (x 100). (B) Die osteogene Front beinhaltet die größte Gefäßdichte mit sehr unterschiedlichen Gefäßkalibern (x 100). (C+D) Im Implantat selbst findet sich eine Zone, in der alle Stufen der Lumenbildung demonstriert werden können (Endothelinseln (←1), Teillumebildung (↓2), entfaltetes Gefäß (←3)). Reste des Kollagens sind nur noch als bläuliche Inseln zu erkennen (←4) (x 400).

Nach 28 Tagen werden am Übergang zum ortständigen Knochen Resorptionslakunen sichtbar, die primär durch Gefäße und nachfolgend durch neu gebildeten Knochen ausgefüllt werden (Abb.16A). Innerhalb der Trabekel sind neben den Kapillaren deutlich auch großlumigere Gefäße mit großem Lumen zu erkennen (Abb.16B). Die osteogene Front hat sich weiter in das Implantatzentrum verlagert, gekoppelt mit der direkt vorgelagerten angiogenen Front (Abb.16C+D). In dieser Randzone zeigt sich die größte angiogene Aktivität.

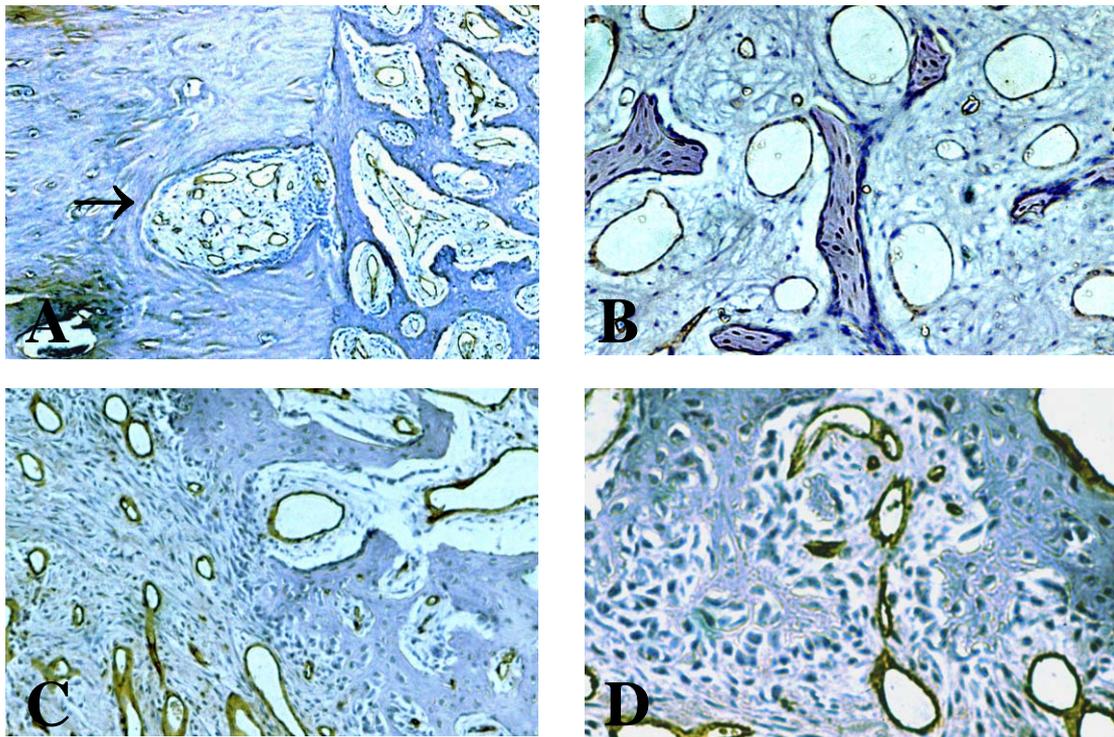


Abb. 16A-D: Kollagenfüllung mit Faktor nach 28 Tagen (vWF). (A) Die Resorptionslakune (→) ist durch mehrere Gefäße und bereits neu gebildeten Knochen aufgefüllt (x 100). (B) Großlumige Gefäße im trabekulären Regenerationsbereich (x 200). (C+D) Verstärkte angiogene Aktivität im Bereich der Regenerationsfront (x 200, x 400).

3.3 Quantitative Auswertung Gefäßzahl

Die quantitative Auswertung unter den Gesichtspunkten Gefäßzahl und Gefäßquerschnitt ergab nahezu gleichmäßige und -gerichtete Veränderungen für alle Gruppen, mit einheitlich führender Position für die Studiengruppe. Die Gefäßzahl stieg, beginnend mit dem 3. postoperativen Tag, bis zum 14. Tag an.

Am 28. Tag zeigte lediglich die Studiengruppe eine gleichbleibend hohe Anzahl, während in den beiden Kontrollgruppen ein eindeutiger Rückgang zu bemerken war (Abb.17).

Der Werte für den Gefäßquerschnitt wiesen in allen Gruppen einen kontinuierlichen Anstieg bis zum 28. Tag auf, ohne Veränderung der Rangfolge der einzelnen Gruppen (Abb.18).

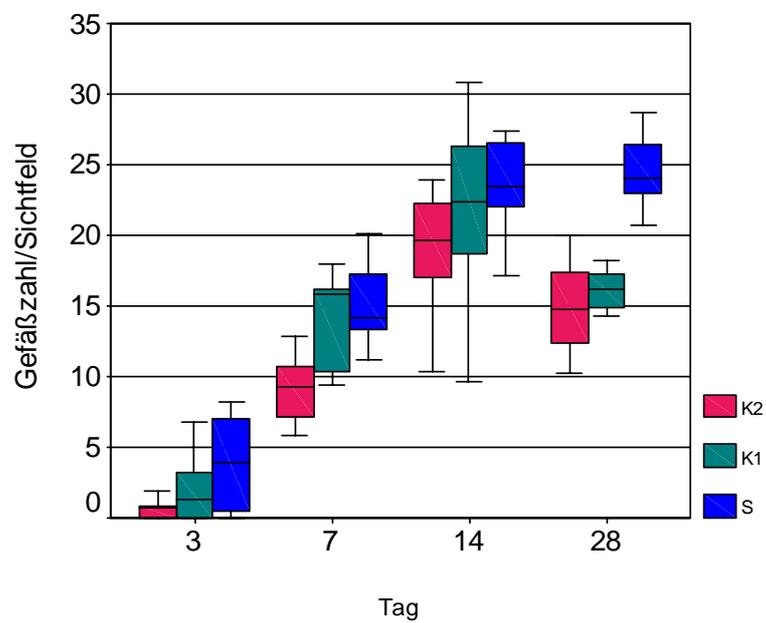


Abb.17: Veränderung der Gefäßzahl / Gefäßdichte in den einzelnen Gruppen im zeitlichen Verlauf.

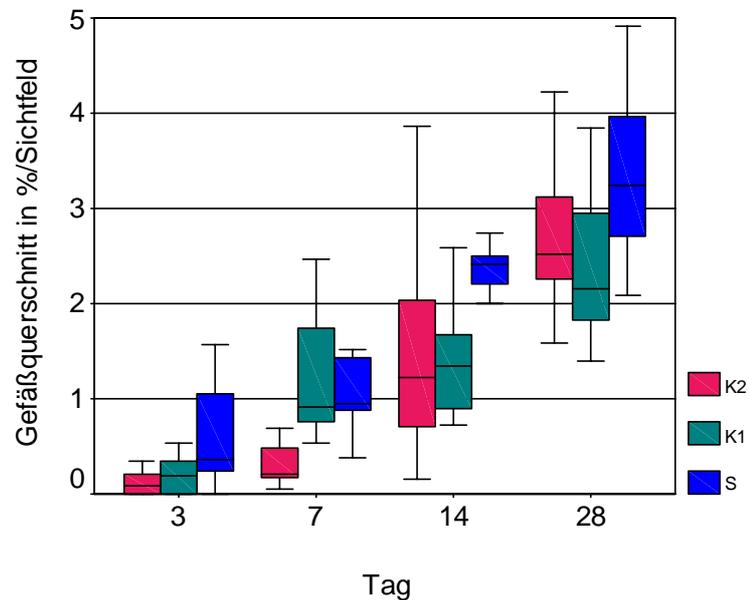


Abb. 18: Veränderung des Gefäßquerschnittes in den einzelnen Gruppen im zeitlichen Verlauf.

Die statistische Auswertung ergab nach Anwendung der Rang-Varianzanalyse signifikante Unterschiede der Werte für die unterschiedlichen Tage innerhalb der einzelnen Gruppen. Die Differenz der Rangmittelwerte wurden unter Zuhilfenahme der Chi2F-Verteilung errechnet und einzelne Signifikanzen ($p < 0,05$) ermittelt (Abb. 19).

Gefäßzahl

Tag	3 n=7	7 n=7	14 n=7	28 n=7
3		7,93	18,64	15,43
7	n.s.		10,71	7,2
14	*	n.s.		3,21
28	*	n.s.	n.s.	

Gefäßquerschnitt

Tag	3 n=7	7 n=7	14 n=7	28 n=7
3		10,86	12,43	18,15
7	n.s.		1,57	7,29
14	*	n.s.		5,72
28	*	n.s.	n.s.	

A: Kontrollgruppe K1 (leer)

Tag	3 n=7	7 n=7	14 n=7	28 n=7
3		10,5	18,86	12,64
7	n.s.		8,36	2,14
14	*	n.s.		6,22
28	*	n.s.	n.s.	

Tag	3 n=7	7 n=7	14 n=7	28 n=7
3		4,57	12,57	17,43
7	n.s.		8	12,86
14	*	n.s.		4,86
28	*	*	n.s.	

B: Kontrollgruppe K2

Tag	3 n=7	7 n=7	14 n=7	28 n=7
3		9	16,29	16,71
7	n.s.		7,29	7,71
14	*	n.s.		0,42
28	*	n.s.	n.s.	

Tag	3 n=7	7 n=7	14 n=7	28 n=7
3		4,28	11,28	17,28
7	n.s.		7	13
14	n.s.	n.s.		6
28	*	*	n.s.	

C: Studiengruppe S C:

Abb. 19: Statistische Auswertung der Gefäßzahl und des -querschnittes für die Kontrollgruppen (K1 und K2) sowie die Studiengruppe S. Im rechten oberen Teil sind die Differenzen der Rangmittelwerte dargestellt, links unten deren Bewertung (n.s. = nicht signifikant, * = signifikant für $p < 0,05$).

4 Diskussion

In der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie hat die Rekonstruktion knöcherner Defekte und Defizite durch Knochenneubildung und die Knochenregeneration in den letzten Jahren eine zunehmende klinische Bedeutung gewonnen. Der Ersatz osseärer Defekte nach Substanzverlust nach Tumoroperationen oder –destruktion, nach Traumen, nach Infektionsfolgen oder Fehlbildungen ist Grundvoraussetzung für Wiederherstellung eines funktionellen und ästhetisch zufriedenstellenden Ergebnisses. Die Anforderungen an ein geeignetes Ersatzmaterial sind vielfältig: so sollte ein rascher Einbau in das vorhandene Skelett und eine physiologische Belastung möglich sein. Hierfür prädestiniert sich ein autologes Knochentransplantat, welches aufgrund der begrenzten Menge und der mit Entnahme verbundenen Morbidität eine enge Grenze gesetzt ist. Die gesuchte künstliche Alternative sollte daher eine knochenähnliche Grundsubstanz aufweisen und möglichst ein Milieu bieten, welches durch Vorhandensein entsprechender Substrate und Wachstumsfaktoren eine Vaskulogenese und Osteogenese im Transplantat fördert.

Maßgebliche Voraussetzung für eine regelrechte Knochendefektheilung ist die Neovaskularisation durch Gefäßeinsprossung aus dem randständigen Knochen [Goad et al. 1996, Kloss und Neukam 1999]. Das Zusammenspiel von Osteoblasten und Endothelzellen umfaßt indirekte Einflüsse aus dem Gefäßsystem wie die Regulation der interstitiellen Temperatur durch Mikrovaskularisation und direkte Einflüsse durch die Produktion von Angiogenesefaktoren [Carano 2003 und Olmsted-Davis 2003]. Der Grad der Vaskularisation ist für die Qualität des neuen Knochenlagers von entscheidender Bedeutung [Ritman 1998].

Je nach Patientenkollektiv ist jedoch die lokale Durchblutung häufig insuffizient oder sogar nahezu kaum vorhanden. Dies kann durch Bestrahlung, Traumata, Osteomyelitis oder knochendestruierende Tumorerkrankungen bedingt sein. Zur Wiederherstellung des Blutflusses werden zwei komplementäre Prozesse, die Rezirkulation und die Neovaskularisation, benötigt [Leunig et al. 1994]. Diese könnten für eine gezielte therapeutische Intervention genutzt werden.

Der Nachweis, daß bovine Knochenzellen Wachstumsfaktoren synthetisieren [Globus et al. 1989) und die Angiogenese induzieren [Arnold und West 1991], ist ein Beweis für die Interaktion zwischen der Gefäßversorgung und der Osteogenese.

Durch eine selektive Beeinflussung der Vaskularisation kann die Osteogenese gefördert werden kann. Diese gezielte Intervention kann durch eine gerichtete Stimulation mit Wachstumsfaktoren aus einem Ersatzmaterial erfolgen [Kübler et al. 1998, Ripamonti et al. 1992].

VEGF₁₆₅ spielt als angiogenes Protein im Regelkreis der Knochenneubildung eine zentrale Rolle, da die Neubildung von Blutgefäßen und die Blutversorgung den Dreh- und Angelpunkt für die Knochenneuf ormation darstellt [Paralkar et al. 1991].

Physiologisch ist der Startpunkt der Angiogenese innerhalb der ersten zwei Tage nach Wachstumsfaktoraktivierung in jeder Gewebsart [Folkman 1992 und Risau 1997]. Die dynamische und optimale Balance zwischen Stimulatoren und Inhibitoren für die Angiogenese ist entscheidend [Iruela-Arispe und Dvorak 1997].

Durch die Auswahl des VEGF₁₆₅ als angiogenes Zytokin wird über den physiologischen Weg der Angiogenese die Knochenregeneration stimuliert ohne direkten Einfluß auf das Knochenwachstum zu haben [Hollinger und Kleinschmidt 1990].

Für den Einsatz von extern zugeführten Faktoren ist die Wahl des richtigen Zeitpunktes, die optimale Konzentration und die Berücksichtigung des Carrier-Freisetzungsmodus wichtig. Nur durch eine gute Interaktion zwischen Zellen, Proteinen, Molekülen, Inhibitoren und Stimulatoren, welche eine Kaskade

bilden, kann die Angiogenese begünstigt werden [Klagsburn und D'Amore 1991, Risau 1997].

Lazarous et al. 1997 und Leunig et al. 1997 konnten bei systematischer Applikation von bFGF keine Beeinflussung, jedoch bei lokaler Applikation eine deutliche Beeinflussung der Angiogenese nachweisen. Weiter wiesen sie auf die lokale Wirkung und die Notwendigkeit einer kontinuierlichen Freisetzung wegen der kurzen Halbwertszeit hin.

Ein zentraler Punkt ist die Bestimmung einer günstigen Ausgangskonzentration vor der Komplexherstellung. Nach der Implantatherstellung, Implantatlagerung bis zum Einbringen des Trägermaterials und während der Wirkstofffreisetzung muß eine optimale und definierte aktive Konzentration vorliegen [Dash AK und Cudworth GC 1998]. Nach Kleinheinz et al. 2000 geht ein Teil des Faktors schon bei Lagerung und Transport verloren. Es ist daher besonders wichtig die Proteinstabilisierung und damit die Träger-Wirkstoff-Effizienz zu steigern.

Ziel ist es, eine definierte Wirkstoffkonzentration über einen bestimmten Zeitraum in einem bestimmten Regenerationsbereich aufrecht zu erhalten (optimales Dosisprofil) [Kleinheinz 2000].

Tiermodell

Die Auswahl des Tiermodells erfolgte unter Berücksichtigung der in der Literatur angegebenen Erfahrungen. Das skelettal ausgereifte Kaninchen gilt sowohl für die Simulation einer reproduzierbaren physiologischen Knochenregeneration [Eppley et al. 1991, Rabie 1997, Schenk 1994 und Walgenbach et al. 1998] als auch für die Untersuchung der Angiogenese [Arras et al. 1998] als ausreichend valide.

Auch der Einsatz von VEGF₁₆₅ im Kaninchenmodell mit der Suggestion der Therapie vaskulärer Insuffizienzen zeugt für die Zulänglichkeit des Kaninchenmodells [Takeshita et al. 1996]. Trotz der Unterschiede der Spezies, Mensch als Proteinquelle und Kaninchen als Empfänger, konnte die Effektivität des Kaninchenmodells gezeigt werden [Arras et al. 1998, Takeshita et al. 1996].

Die Vorteile des Kaninchenmodells liegen in den großzügigen Dimensionen, der Möglichkeit bikortikaler Defektsetzung, der Übersichtlichkeit, der nahezu atraumatischen Operationsmöglichkeit und der Möglichkeit der postoperativen physiologischen Belastung und ungestörten Regeneration. Andererseits ist das Kaninchenmodell klein genug, so dass man an ihm gleichmäßige stetige Evaluationen in großer Anzahl durchführen kann [Hollinger und Kleinschmidt 1990].

Eine weitere Forderung von Hollinger und Kleinschmidt 1990 ist das Hinzuziehen von Kontrollgruppen in die Studie, bei denen alle Parameter, bis auf die zu untersuchenden Wirkstoffe und Materialien, gleich sind mit denen der Studiengruppe. Nur so können Vergleiche und signifikante Daten erfaßt und der Einfluß des Untersuchungsgutes bestimmt werden. So wurde der Forderung nach Kontrollgruppen [Joos et al. 1980] eine abgestufte Rechnung getragen, da einerseits ein Vergleich der Studiengruppe mit einem unversorgten und einem mit reinem Kollagen versorgten Defekt und andererseits ein Vergleich der beiden Kontrollgruppen untereinander möglich war. Dabei mußten das Lager und das Ersatz- und Trägermaterial eine ungestörte Regeneration ermöglichen. Hollinger und Kleinschmidt 1990 fordern, eine Wunde nach dem Critical size defect (CSD), das heißt, eine kleinstmögliche intraossäre Wunde, die nicht spontan und in der gesamten Lebenszeit des Individuums nicht komplett knöchern regenerieren würde, zu wählen, um die Vorzüge von Knochenersatzmaterialien und Wachstumsfaktoren zu beweisen. Darüber hinaus soll eine Wunde nach dem CSD nicht schneller als eine mit einem Knochenersatzmaterial versorgte Wunde heilen dürfen. Andererseits diskutiert Kleinheinz 2000 zum Critical size defect, dass es eher einschränkend sei, diese Defektgröße für alle Tiermodelle zu fordern. Zum einen sei es nicht durchführbar, für jedes Knochen- und Versuchsmodell den CSD eindeutig definieren zu können, zum anderen wäre es für derartige Studien (Kontrolluntersuchungen) geradezu entscheidend, einen Defekt zu wählen, der mit Sicherheit verknöchert, da nur so der komplette Ablauf einer ungestörten Knochenregeneration als Vergleich herangezogen werden könne, um die

quantitativen Veränderungen unter dem Einfluß von VEGF₁₆₅ beurteilen zu können [Kleinheinz 2000].

Wie von Hollinger und Kleinschmidt 1990 für den Kaninchen-Unterkiefer verlangt, betrug der CSD in der vorliegenden Studie 5 mm im Durchmesser. Ebenfalls ist die Forderung nach standardisierbaren Bedingungen zur Erlangung von möglichst genauen und reproduzierbaren Ergebnissen, untrügliche Kennzeichen wissenschaftlicher Methodik [Hollinger und Kleinschmidt 1990], zu stellen. Entzündliche Veränderungen und Störungen der Regeneration sollten in tierexperimentellen Studien soweit ausgeschlossen werden. Folglich wurden Proben mit Infektionszeichen, Resorptionen und Atrophien nicht weiter verwertet und beurteilt.

Trägermaterial

Bei der Auswahl des Ersatzmaterials sind besonders die klinischen Anwendungsmöglichkeiten und die physikalischen und chemischen Eigenschaften des Materials von großer Bedeutung. Als Trägermaterial sind unter anderem Granulate, Pulver, Schwämme und Gele erhältlich.

Kollagen weist durch seine immunologisch nebenwirkungsfreie Resorbierbarkeit und Integration in das Regenerat, seine Inkorporationsfähigkeit im Defekt und seine ausgezeichnete Formbarkeit wesentliche Vorteile [Hollinger und Leong 1996].

Materialien, bei deren Resorption Spaltprodukte entstehen, haben Auswirkungen auf die Regeneration und sind somit den nebenwirkungsfreien Materialien wie Kollagen unterlegen [Horisaka et al. 1994, Joos 1983].

Typ-1 Kollagen füllt als unlösliche Matrix den Defekt aus, verhindert Einfall von Weichgewebe in die Wunde [Ripamonti et al. 1992] und übernimmt dadurch auch osteokonduktive Aufgaben [Kloss und Neukam 1999].

Pulver und Granulate können nach Dislokation in falsche Bereiche, bedingt durch mechanische Instabilität, zu falsch-positiven Ergebnissen führen [Kübler et al. 1998].

Kollagen steht als industriell aus Schweine- oder Rinderhaut hergestelltes Ersatzmaterial in steriler und gefriergetrockneter Form in großen Mengen zur Verfügung [Joos et al. 1980].

Auch Hollinger und Leong 1996 und Kübler et al. 1998 haben in Vergleichsstudien mit Kollagen als Trägermaterial für das BMP sehr gute Ergebnisse erzielt. Darüber hinaus wurde Kollagen in klinischen Studien als Trägermaterial für Gentamycin in der Osteomyelitistherapie erfolgreich eingesetzt [Letsch et al. 1993].

Das Typ-1 Kollagen als Trägermaterial für VEGF₁₆₅ ermöglicht eine Stabilisierung im Defekt, verbunden mit einer längeren Wirkdauer im Tierversuch. Diesen Nachweis konnte Kleinheinz 2000 erbringen.

Die Freisetzung des VEGF läuft über Diffusionsvorgänge, wobei das Kollagen von Blut durchsetzt und das VEGF ausgeschwemmt wird. Wichtig ist die gleichmäßige Verteilung des Faktors im Carrier. Wenn der Faktor überwiegend im Randbereich des Trägers vorhanden ist, ist die Dauer der Freisetzung kurz. Aus den tieferen Schichten des Trägermaterials ist die Freisetzungsdauer länger. Die sich in den Kollagenporen befindlichen restlichen Faktorkonzentrationen werden in einem zweiten Schritt durch Abbau des Kollagens freigegeben [Shah et al. 1992].

Nach dem bisherigen Stand des Wissens und in Anlehnung an die Arbeit von Joos et al. 1980 beeinflusst Kollagen die Knochenregeneration in Qualität und Quantität positiv und entspricht als Träger für Wachstumsfaktoren der Forderung nach vernünftiger und schrittweiser Weiterentwicklung von wissenschaftlichen Studien.

Bestimmung der Wirkstoffkonzentration

Kleinheinz 2000 stellte fest, dass 90 % der Gesamtmenge des VEGF bereits nach 4-8 Stunden freigegeben werden. Darüber hinaus sei ein weiterer Effekt auf das Gewebe nicht vorhanden. Entscheidend ist allerdings der lokale Wirkspiegel des Zytokins im Regenerationsbereich. VEGF₁₆₅ liegt nach 48 Stunden noch in hyperphysiologischen Konzentrationen vor. Dies stimuliert eine Zellaktivierung [Kleinheinz 2000].

Untersuchungszeitraum

Aufgrund der kurzzeitigen Aktivierungsphase und der früh einsetzenden Angiogenese wurde der Untersuchungszeitraum auf 28 Tage angesetzt. Die Wachstumsfaktoren und die Ersatzmaterialien greifen am Anfang der Implantation in die Regeneration ein und haben ihren Wirkungshöhepunkt in der Mitte des Regenerationsablaufs [Kübler et al. 1998]. Zu späteren Zeitpunkten, in denen die Wachstumsfaktoren und das Ersatzmaterial nicht mehr wirksam sind, holt die Regeneration im unversorgten Defekt auf und die Unterschiede werden kleiner [Feifel et al. 1995]. Lazarous et al. 1996 haben die Wirkung von VEGF und bFGF auf die Koronargefäßentwicklung ebenfalls über einen Zeitpunkt von 4 Wochen erfolgreich verglichen.

Vergleich Kollagenprobe mit der Leerprobe

Vorteile des Kollagens gegenüber der Leerprobe konnten in dieser Studie nicht gezeigt werden. Im Gegensatz zu den Leerproben, wo sich bei einem relativ kleinen Bohrdefekt von 5 mm Durchmesser sehr früh ein randdichtes und stabiles Blutkoagel organisierte, fehlte dieses bei den Kollagenproben durch die Spalt- und Hohlraumbildung zum ortständigen Knochen. Bei den Kollagenproben verzögerte sich die angio- und osteoinduktive Wirkung der im Koagel befindlichen Zytokine. Wesentliche Vorteile des Kollagens gegenüber der Leerprobe werden nur Defekten zugeschrieben, in denen aufgrund der Größe

und Ausdehnung eine stabilisierende Wirkung des Kollagens auf das Koagel erwartet wird. Der Osteokonduktion kommt jedoch eine entscheidende Rolle bei der Osteogenese zu [Farmand 1988, Joos 1983].

4.1 Immunhistologie

Die spezifischen Antikörper CD 31 und von Willebrand Faktor erlaubten eine differenzierte Beurteilung von Lokalisation, Ausdehnung, zeitlichem Verlauf und Struktur der Gefäßneubildung durch Darstellung der Endothelien. Gezielt an den Übergangsbereichen (ortsständigen Knochen – regenerierter Knochen – Kollagenimplantat) konnte das Verteilungsmuster der Gefäße mit der Knochenneubildungsfront verglichen werden. Mit der Immunhistologie konnten alle Zwischenstufen der Angiogenese dargestellt werden. Ab dem dritten Tag kamen Gefäßlumina zur Darstellung.

In der Quantifizierung der Gefäßzahl zeigte sich in allen 3 Gruppen ein permanenter Anstieg der Gefäßdichte bis zum 14. Tag.

Im Gegensatz zu der Studiengruppe mit dem Wachstumsfaktor VEGF₁₆₅, wo die Gefäßzahl stetig war, kam es ausschließlich in den Kontrollgruppen ab dem 14. Tag zu einer Regression der Gefäßzahl. Dies läßt auf eine länger andauernde Aktivierungsphase verbunden mit einem ausgeprägteren Gefäßnetz schließen. Die Gefäßquerschnittsfläche in der Kontrollgruppe ohne Wachstumsfaktor zeigte keinen Rückgang, was in Kombination mit der abnehmenden Gefäßdichte als physiologischer Reifungsprozess mit zunehmender Lumenvergrößerung des Einzelgefäßes des zunächst unreifen Gefäßplexus angesehen wird [Augustin et al. 1995, Drake und Little 1995, Yancoupolus et al.2000]. In der Studiengruppe war keine derartige Veränderung nachweisbar.

4.1.1 Zukunft

Durch den gezielten Einsatz von Wachstumsfaktoren sollte die Unterstützung der natürlichen Mechanismen der Osteogenese in großen Defekten induziert werden, in denen alleine eine solide Reossifikation nicht erreicht wird. Knochenersatzmaterialien können dabei alleinig durch ihre osteokonduktive Wirkung zu keiner Konsolidierung führen [Kübler et al. 1998]. Durch Zugabe von osteoinduktiv wirksamen Proteinen kann eine dichtere und größere Konsolidierung der Defekte erreicht werden [Kübler et al. 1998, Kloss und Neukam 1999, Ripamonti et al. 1992]. Bezogen auf die Knochenregeneration kann gesagt werden, daß VEGF₁₆₅ durch die lokale Freisetzung zu einer Steigerung der Gefäßzahl und zur Verstärkung der Osteogenese führt und somit zur Knochenregeneration deutlich beiträgt. Um eine Aussage über die Wirksamkeit des VEGF₁₆₅ in pathologisch veränderten Defekten treffen zu können, müßten weitere Untersuchungen durchgeführt werden. Man könnte sich auch einen gezielten Einsatz von VEGF₁₆₅ in einem mit Hilfe des Tissue-Engineerings hergestellten Trägers vorstellen, wodurch die Einheilungsphase verkürzt und die Knochenqualität gesteigert werden könnte.

5 Zusammenfassung

Zufriedenstellende Knochenersatzmaterialien sind trotz steigenden Bedarfes immer noch nicht entwickelt worden. Als primärer Motor einer suffizienten Osteogenese gilt eine ausreichende Vaskularisation. In der vorliegenden Studie wurde die Angiogenese und die Osteogenese unter dem Einfluss des angiogenen Wachstumsfaktors VEGF₁₆₅ (Vaskular Endothelial Growth Factor 165) in Typ-1 Kollagen als Trägermaterial in einem Unterkieferdefektmodell am Kaninchen untersucht. Es lagen zwei Kontrollgruppen, K1 mit reinem Typ-1 Kollagen als Defektfüllung und K2 als Leerprobe ohne Einlage in den Defekt zum Vergleich vor.

Der Ablauf des Tierexperiments wurde unter Einhaltung der Anforderungen durch das Tierschutzgesetz und mit einer Genehmigung durch das Regierungspräsidium Münster vom 12. Januar 1998 (Az. 23.0835.1.0 (G 46 / 97)) durchgeführt.

Es wurden Proben von 56 weißen New Zealand Kaninchen mit vier bikortikal angelegten Bohrlöcher im Unterkiefer untersucht. Für die zwei Kontrollgruppen wurden zwei Bohrungen ohne Einlage belassen (K1) und zwei mit reinem Typ-1 Kollagen ausgefüllt (K2). In der Studiengruppe wurden alle vier Defekte mit Typ-1 Kollagen komplexierten mit einer in der Konzentration und Freisetzungskinetik angepassten Ausgangsmenge von 0,8µg VEGF₁₆₅ versorgt. Nach 3,7,14 und 28 Tagen wurden die Tiere geopfert, Proben aus dem Defektbereich entnommen und immunhistologisch bezüglich der Parameter Lokalisation, Ausdehnung, zeitlicher Verlauf, Struktur der Gefäßneubildung und Gefäßzahl und Gefäßquerschnittsfläche evaluiert.

In der immunhistologischen Untersuchung wurden speziell an den Übergangsbereichen (ortsständiger Knochen – regenerierter Knochen – Kollagenimplantat) das Verteilungsmuster der Gefäße mit der Knochenneubildungsfront verglichen. Die osteogene Wachstumszone hatte sich

direkt hinter der angiogenen Front mit der größten angiogenen Aktivität in das Implantatzentrum vorgeschoben. In der quantitativen Auswertung zeigten sich nahezu gleichmäßige und gleichgerichtete Veränderungen für alle Gruppen mit führender Position für die Studiengruppe.

Die Gefäßdichte stieg bei allen Gruppen ab dem 3. postoperativen Tag bis zum 14. Tag. Am 28. Tag konnte gleich große Gefäßdichte in der Studiengruppe nachgewiesen werden. In den beiden Kontrollgruppen kam es zu einem signifikanten Abfall der Gefäßdichte.

In der Untersuchung bezüglich des Gefäßquerschnittes konnten dagegen keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden.

Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung lassen den Schluss zu, dass die Einbringung und lokale Freisetzung von VEGF₁₆₅ die Angiogenese im Defektbereich steigert und verlängert. Es zeigten sich bereits innerhalb des Beobachtungszeitraums Hinweise auf eine bessere Osteogenese bei Vorhandensein von VEGF. Damit ist die supportive Wirkung von VEGF im Komplex mit Kollagen für die Osteogenese im vorliegenden in-vivo Experiment nachgewiesen.

6 Literaturverzeichnis

1. Adams RH, Wilkinson GA, Weiss C, Diella F, Gale NW, Deutsch U, Risau W, Klein R (1999)
Roles of ephrinB ligands and EphB receptors in cardiovascular development: demarcation of arterial/venous domains, vascular morphogenesis, and sprouting angiogenesis. *Genes Dev* 13:295-306
2. Agrawal CM, Best J, Heckmann JD, Boyan BD (1995)
Protein release kinetics of a biodegradable implant for fracture non-unions. *Biomaterials* 16: 1255-1260
3. Albelda S, Muller W, Buck C, Newman P (1991)
Molecular and cellular properties of PECAM-1 (endoCAM/CD31): a novel vascular cell-cell adhesion molecule. *J Cell Biol* 114: 1059-1068
4. Ali J, Liao F, Martens E, Muller WA (1997)
Vascular endothelial cadherin (VE-cadherin): cloning and role in endothelial cell-cell adhesion. *Microcirculation* 4: 267-277
5. Amler MH (1999)
Disturbed healing of extraction wounds. *J Oral Implantol* 25: 179-184
6. Arnold F, West DC (1991)
Angiogenesis in wound healing. *Pharmacol Ther* 52: 407-422

7. Arras M, Ito WD, Scholz D, Winkler B, Schaper J, Schaper W (1998)
Monocyte activation in angiogenesis and collateral growth in the rabbit hindlimb. *J Clin Invest* 101: 40-50
8. Arzt T, Maschtowski J, Wimmer F, Schmidt K (1996)
Sinuselevation durch Osteogenese mittels eines osteoinduktiven Proteinkomplexes. *Z Zahnärztl Implant* 12: 3-10
9. Asahara T, Masuda H, Takahashi T, Kalka C, Pastore C, Silver M, Kearne M, Magner M, Isner JM (1999a)
Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularisation. *Circ Res* 85: 221-228
10. Asahara T, Takahashi T, Masuda H, Kalka C, Chen D, Iwaguro H, Inai Y, Silver M, Isner JM (1999b)
VEGF contributes to postnatal neovascularisation by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *EMBO J* 18: 3964-3972
11. Aubin J, Liu F, Malaval L, Gupta AK (1995)
Osteoblast and chondroblast differentiation. *Bone* 17: 77S-83S
12. Augustin H, Braun K, Telemenakis I, Modlich U, Kuhn W (1995)
Phenotypic characterization of endothelial cells in a physiological model of blood vessel growth and regression. *Am J Pathol* 147: 339-351
13. Bach T, Barsigian C, Chalupowicz D, Busler D, Yaen C, Grant D, Martinez J (1998)
VE-cadherin mediates endothelial cell capillary tube formation in fibrin and collagen gels. *Exp Cell Res* 238: 324-334

14. Baldwin H, Shen H, Yan H, DeLisser H, Chung A, Mickanin C, Trask T, Kirschbaum N, Newman P, Albelda S (1994)
Platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1/CD31): Alternatively spliced, functionally distinct isoforms expressed during mammalian cardiovascular development. *Development* 120: 2539-2553
15. Bartkowski SB, Heczko PB, Lisiewicz J, Dorozynki J, Kurek M, Kusiderski J, Kasprzyk J (1994)
Combined treatment with antibiotic, heparin and streptokinase- a new approach to the therapy of bacterial osteomyelitis. *J Craniomaxillofac Surg* 22: 167-176
16. Basle MF, Lesourd M, Grizon F, Pascaretti C, Chappard D (1998)
Typ-I-Kollagen im xenogenen Knochenmaterial reguliert Anbindung und Verbreitung von Osteoblasten über die beta 1-Integrin-Untereinheit. *Orthopade* 27: 136-142
17. Bastaki M, Nelli EE, Dell'Era P, Rustani M, Molinari-Tosatti MP, Parolini S, Auerbach R, Ruco LP, Possati L, Presta M (1997)
Basic fibroblast growth factor-induced angiogenic phenotype in mouse endothelium. A study of aortic and microvascular endothelial cell lines. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17: 454-464
18. Bikfalvi A, Han ZC (1994)
Angiogenic factors are hematopoietic growth factors and vice versa. *Leukemia* 8: 523-529
19. Bobrow M, Shaughnessy K, Litt G (1991)
Catalyzed reporter deposition, a novel method of signal amplification. II. Application to membrane immunoassays. *J Immunol Methods* 137: 103-112

20. Bolander ME, Balian G (1986)
The use of demineralized bone matrix in the repair of segmental defects. Augmentation with extracted matrix proteins and a comparison with autologous grafts. *J Bone Joint Surg Am* 68: 1264-1274
21. Boyne P (1995)
Reconstruction of discontinuity defects in rhesus monkeys using rhBMP-2. *J Oral Maxillofac Surg* 53: 92-97
22. Breier G, Risau W (1996)
The role of vascular endothelial growth factor in blood vessel formation. *Trends Cell Biol* 6: 454-456
23. Breier G, Damert A, Plate KH, Risau W (1997)
Angiogenesis in embryos and ischemic diseases. *Thromb Haemost* 78: 678-683
24. Breier G (2000)
Functions of the VEGF/VEGF receptor system in the vascular system. *Semin Thromb Hemost* 26: 553-559
25. Brighton CT, Lorch DG, Kupcha R, Reilly TM, Jones AR, Woodbury RA (1992)
The pericyte as a possible osteoblast progenitor cell. *Clin Orthop* 275: 287-299
26. Brighton C, Hunt R (1991)
Early histological and ultrastructural changes in medullary fracture callus. *J Bone Joint Surg* 73: 832-847

27. Brockmann J (2003)
Die Beeinflussung der Knochenregeneration durch Vascular endothelial growth factor – Korrelation von Histomorphometrie und Radiomorphometrie. Dissertationsschrift; Klinik und Poliklinik für Mund- und Kiefer- Gesichtschirurgie der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster
28. Brooks P, Clark R, Cheres D (1994)
Requirement of vascular integrin alpha v beta 3 for angiogenesis. *Science* 264: 569-571
29. Brown LF, Berse B, Tognazzi K, Manseau EJ, Van de Water L, Senger DR, Dvorak HF, Rosen S (1992)
Vascular permeability factor mRNA and protein expression in human kidney. *Kidney Int* 42: 1457-1461
30. Buckwalter J, Glimcher M, Cooper R, Recker R (1995a)
Bone biology. Part I: structure, blood supply, cells, matrix, and mineralization. *J Bone Joint Surg* 77: 1256-1275
31. Buckwalter J, Glimcher M, Cooper R, Recker R (1995b)
Bone biology. Part II: formation, modeling, remodeling, and regulation of cell function. *J Bone Joint Surg* 77: 1276-1289
32. Burchardt H (1987)
Biology of bone transplantation. *Orthop Clin North Am* 18: 187-196
33. Carano R.A. and Filvaroff E.H. (2003)
Angiogenesis and bone repair, *Drug Discov Today* 8 : 980.

34. Carmeliet P, Ferreira V, Breier G, Pollefeyt S, Kieckens L, Gertsenstein M, Fahrig M, Vandenhoeck A, Harpal K, Eberhardt C, Declercq C, Pawling J, Moons L, Colen D, Risau W, Nagy A (1996)
Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature* 380: 435-439
35. Carmeliet P, Jain RK (2000)
Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 407: 249-257
36. Chang Y, Munn L, Hillsley M, Dull R, Yuan J, Lakshminarayanan S, Gardner T, Jain R, Tarbell J (2000)
Effect of vascular endothelial growth factor on cultured endothelial cell monolayer transport properties. *Microvas Res* 59: 265-277
37. Clauss M, Weich H, Breier G, Knies U, Röckl W, Waltenberger J, Risau W (1996)
The vascular endothelial growth factor receptor flt-1 mediates biological activities. *J Biol Chem* 271: 17629-17634
38. Collin-Osdoby P (1994)
Role of vascular endothelial cells in bone biology. *J Cell Biochem* 55: 304-309
39. Collins D, Woods A, Herd R, Blake G, Fogelman I, Wheeler M, Swaminathan R (1998)
Insulin-like growth factor-I and bone mineral density. *Bone* 23: 13-16
40. Costantino PD, Friedmann CD, Jones K, Chow LC, Pelzer HJ, Sisson GA (1991)
Hydroxyapatite cement. I. Basic chemistry and histologic properties.

Arch Otolaryngol Head Neck Surg 117: 379-384

41. Dash AK, Cudworth GC (1998)
Therapeutic applications of implantable drug delivery systems. J Pharmacol Toxicol Methods 40: 1-12
42. Decker B, Bartels H, Decker S (1995)
Relationships between endothelial cells, pericytes, and osteoblasts during bone formation in the sheep femur following implantation of tricalciumphosphate-ceramic. Anat Rec 242: 310-320
43. DiCorleto P, Cimbrone M (1996)
Vascular endothelium. In: Foster V, Ross R, Topol E (eds) Atherosclerosis and coronary artery disease; Lippincott-Raven; Philadelphia 1996: 387-397
44. Drake CJ, Little CD (1995)
Exogenous vascular endothelial growth factor induces malformed and hyperfused vessels during embryonic neovascularisation. Proc Natl Acad Sci U S A 92: 7657-7661
45. Eppley BL, Connolly DT, Winkelmann T, Sadove AM, Heuvelmann D, Feder J (1991)
Free bone graft reconstruction of irradiated facial tissue: experimental effects of basic fibroblast growth factor stimulation. Plast Reconstr Surg 88: 1-11
46. Eymer H, Preusse F (1999)
Platelet-rich plasma: erste klinische Beobachtungen mit autologen Wachstumsfaktoren zur Verbesserung augmentativer Verfahren mit autologem, xenogenem sowie synthetischem Knochenersatzmaterial. Implantologie 4: 399-406

47. Farmand M (1988)
Experimentelle Ergebnisse zur spontanen Unterkieferregeneration beim wachsenden Organismus. *Kiefer Gesichtschirurgie* 1: 53-56
48. Farnebo F, Piehl F, Lagercrantz J (1999)
Restricted expression pattern of vegf-d in the adult and fetal mouse: high expression in the embryonic lung. *Biochem Biophys Res Commun* 257: 891-894
49. Feifel H, Gerner A, Schmidt K-H, Wimmer F, Schmitz H-J (1995)
Die Beeinflussung der Knochenregeneration in phylogener Hydroxylapatitkeramik durch einen osteoinduktiven Proteinkomplex. *Dtsch Z Mund Kiefer Gesichtschir* 19: 25-27
50. Ferrara N, Carver-Moore K, Chen H, Dowd M, Lu L, O'Shea KS, Powell-Braxton L, Hillan KJ, Moore MW (1996)
Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature* 380: 439-442
51. Fiorelli G, Orlando C, Benvenuti S, Franceschelli F, Bianchi S, Pioli P, Tanini A, Serio M, Bartucci F, Brandi ML (1994)
Characterization, regulation, and function of specific cell membrane receptors for insulin-like growth factor I on bone endothelial cells. *J Bone Miner Res* 9: 329-337
52. Flamme I, Breier G, Risau W (1995)
Vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receptor 2 (flk-1) are expressed during vasculogenesis and vascular differentiation in the quail embryo. *Dev Biol* 169: 699-712

53. Foitzik C, Stamm M (1997)
Einsatz von phasenreinem β -Tricalciumphosphat zur Auffüllung von ossären Defekten biologische Materialvorteile und klinische Erfahrungen. Quintessenz 48: 1365-1377
54. Folkman J, und Klagsbrunn M (1987)
Vascular physiology. A family of angiogenic paptides. Nature. 1987 Oct 22 – 28;329(6141): 671 – 2.
55. Folkman J. and Shing Y. (1992)
Angiogenesis, J Biol Chem :10931.
56. Fong G, Rossant J, Gerstenstein M, Breitman M (1995)
Role of the FLT-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. Nature 376: 66-70
57. Garlanda C, Dejana E (1997)
Heterogenity of endothelial cells. Arterioscler Thromb Vasc Biol 17: 1193-1202
58. Gerber H, Vu T, Ryan A, Kowalski J, Werb Z, Ferrara N (1999)
VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation. Nature Medicine 5: 623-628
59. Globus RK, Poulet J, Gospodarowicz D (1989)
Cultured bovine bone cells synthesize basic fibroblast growth factor and store it in their extracellular matrix. Endocrinology 124: 1539-1547

60. Goad DL, Rubin J, Wang H, Tashjian AH, Patterson C (1996):
Enhanced expression of vascular endothelial growth factor in human SaOS-2 osteoblast -like cells and murine osteoblasts induced by insulin-like growth factor I. *Endocrinology* 137:2262-2268
61. Goerdts S, Walsh L, Murphy G, Pober J (1991)
Identification of a novel high molecular weight protein preferentially expressed by sinusoidal endothelial cells in normal human tissues. *J Cell Biol* 113: 1425-1437
62. Greenspan D (1999)
Bioactive glass: mechanisms of bone bonding. *J Swed Dent Ass* 8: 31-35
63. Gross PM, Heistad DD, Marcus ML (1979)
Neurohumoral regulation of blood flow to bones and marrow. *Am J Physiol* 237: H440-H448
64. Günther K, Scharf H, Pesch H, Puhl W (1996)
Osteointegration lösungsmittel-konservierter Knochenimplantate im Tiermodell. *Osteologie* 5: 4-12
65. Hanke H, Kamenz J, Hanke S, Spiess J, Lenz C, Brehme U, Bruck B, Finking G, Hombach V (1999)
Effect of 17-beta estradiol on pre-existing atherosclerotic lesions: role of the endothelium. *Atherosclerosis* 147: 123-132
66. Harada S, Nagy JA, Sullivan KA, Thomas KA, Endo N, Rodan GA, Rodan SB (1994)
Induction of vascular endothelial growth factor expression by prostaglandin E2 and E1 in osteoblasts. *J Clin Invest* 93: 2490-2496

67. Harper J, Klagsbrun M (1999)
Cartilage to bone - angiogenesis leads the way. *Nature Medicine* 5: 617-618
68. Hauschka P, Mavrakos A, Iafrazi M, Doleman S, Klagsbrun M (1986)
Growth factors in bone matrix. *J Biol Chem* 261: 12665-12674
69. Hayes AJ, Huang WQ, Mallah J, Yang D, Lippman ME, Li LY (1999)
Angiopoietin-1 and its receptor Tie-2 participate in the regulation of capillary-like tubule formation and survival of endothelial cells. *Microvasc Res* 58: 224-237
70. Heits F, Wiedemann G, Jelkmann W (1998)
Der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor VEGF stimuliert die Angiogenese im Guten wie im Bösen. *Dtsch Med Wschr*: 259-265
71. Hemprich A, Lehmann R, Khoury F, Schulte A, Hidding J (1989)
Filling cysts with type 1 bone collagen. *Dtsch Zahnarztl Z* 44: 590-592
72. Herr G, Wahl D, Küsswetter W (1993)
Osteogenic activity of bone morphogenetic protein and hydroxyapatite composites implants. *Ann Chir Gyn* 82: 99-108
73. Hiratsuka S, Minowa O, Kuno J, Noda T, Shibuya M (1998)
Flt-1 lacking the tyrosine kinase domain is sufficient for normal development and angiogenesis in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 9349-9354
74. Hollinger JO, Kleinschmidt JC (1990)
The critical size defect as an experimental model to test bone repair materials. *J CraniofacSurg* 1: 60-68

75. Hollinger J, Leong K (1996)
Poly(a-hydroxy acids): carriers for bone morphogenetic proteins.
Biomaterials 17: 187-194
76. Hollinger JO, Wong ME (1996)
The integrated processes of hard tissue regeneration with special
emphasis on fracture healing. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol
Endod 82: 594-606
77. Horak E, Leek R, Klenk N, Lejeune S, Smith K, Stuart N, Greenall M,
Stepniewska K, Harris A (1992)
Angiogenesis, assessed by platelet/endothelial cell adhesion molecule
antibodies, as indicator of node metastases and survival in breast cancer.
Lancet 340: 1120-1124
78. Horch H, Steegmann B (1985)
Experience with resorbable TCP-ceramic granules for the filling of large
bone defects after cystectomy in the jaw. Dtsch Zahnarztl Z 40: 672-677
79. Horisaka Y, Okamoto Y, Matsumoto N, Yoshimura Y, Hirano A, Nishida M,
Kawada J, Yamashita K, Takagi T (1994)
Histological changes of implanted collagen material during bone induction.
J Biomed Mater Res 28: 97-103
80. Hutmacher D, Kirsch A, Ackermann K, Hürzeler M (1998)
Matrix and carrier materials for bone growth factors: state of the art and
future perspectives. Berlin Heidelberg, Springer
81. Iruela-Arispe ML, Dvorak HF (1997)
Angiogenesis: a dynamic balance of stimulators and inhibitors. Thromb
Haemost 78: 672-677

82. James N, Harrison D, Nerem R (1995)
Effects of shear on endothelial cell calcium in the presence and absence of ATP. *FASEB J* 9: 968-973
83. Joos U, Ochs G, Ries P (1980)
Influence of Collagenfleece on bone regeneration. *Biomaterials* 1: 23-26
84. Joos U (1983)
Die Beschleunigung der Knochenregeneration in chirurgisch bedingten Defekten am Kiefer durch Kollagen. Habilitationsschrift; Albert-Ludwigs-Universität Freiburg
85. Kamegai A, Shimamura N, Naitou K, Nagahara K, Kanematsu N, Mori M (1994)
Bone formation under the influence of bone morphogenetic protein/self setting apatite cementcomposite as a delivery system. *Biomed Mater Eng* 4: 291-307
86. Kasper C, Ewers R, Simons B (1988)
Knochenersatzmaterial aus Algen. *Dtsch Zahnärztl Z* 43: 116-119
87. Klagsbrun M, D'Amore P (1991)
Regulators of angiogenesis. *Annu Rev Physiol* 53: 217-239
88. Klagsbrun M, D'Amore PA (1996)
Vascular endothelial growth factor and its receptors. *Cytokine Growth Factor Rev* 7: 259-270

89. Kleinheinz J, Rottke S, Blasius C, Wiesmann H, Joos U (1997)
Immunohistochemical investigation of the microcirculation of mandibular osteomyelitis using endothelial-specific antibodies. *Int J Oral Maxillofac Surg* 26: 245
90. Kleinheinz J (2000)
Die Beeinflussung der Angiogenese durch Vascular endothelial growth factor im Verlauf der Knochenregeneration des Unterkiefers.
Habilitationsschrift; Klinik und Poliklinik für Mund- und Kiefer-Gesichtschirurgie der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster
91. Kloss FR, Neukam FW (1999)
Rekonstruktive Knochenchirurgie. Methoden der letzten 15 Jahre. *Z Zahnärztl Implantol* 15: 33-43
92. Kusumoto K, Bessho K, Fujimura K, Ogawa Y, Iizuka T (1997)
Intramuscular osteoinduction and bone marrow formation by the implantation of rhBMP-2 with atelopeptide type I collagen. *Br J Oral Maxillofac Surg* 35: 433-437
93. Kübler NR, Reuther J, Kirchner T, Priessnitz B, Sebald W (1993)
Osteoinductive, morphologic, and biomechanical properties of autolyzed, antigen-extracted, allogenic human bone. *J Oral Maxillofac Surg* 51: 1346-1357
94. Kübler NR (1997)
Osteoinduktion und –reparation. *Mund Kiefer Gesichtschir* 1: 2-25
95. Kübler NR (1998)
Knochenregeneration durch Osteoinduktion. *Dtsch Zahnärztl Z* 1998 Heft 12

96. Kübler NR, Würzler KK, Biebl S, Käding C, Faller G, Sieber E, Kirchner T, Sebald W, Lagercrantz J, Farnebo F, Larsson C, Tvrđik T, Weber G, Piehl F (1998)
A comparative study of the expression patterns for VEGF, VEGF-B/VRF and VEGF-C in the developing and adult mouse. *Biochem Biophys Acta* 1398: 157-163
97. Lazarous DF, Shou M, Scheinowitz M, Hodge E, Thirumurti V, Kitsiou AN, Stiber JA, Lobo AD, Hunsberger S, Guetta E, Epstein SE, Unger EF (1996)
Comparative effects of basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor on coronary collateral development and the arterial response to injury. *Circulation* 94: 1074-1082
98. Lagercrantz J, Farnebo F, Larsson C, Tvrđik T, Weber G, Piehl F (1998)
A comparative study of the expression patterns for VEGF, VEGF-B/VRF and VEGF-C in the developing and adult mouse. *Biochem Biophys Acta* 1398: 157-163
99. Lazarous DF, Shou M, Stiber JA, Dadhania DM, Thirumurti V, Hodge E, Unger EF (1997)
Pharmacodynamics of basic fibroblast growth factor: route of administration determines myocardial and systemic distribution. *Cardiovasc Res* 36: 78-85
100. Lazarous DF, Shou M, Stiber JA, Hodge E, Thirumurti V, Goncalves L, Unger EF (1999)
Adenoviral-mediated gene transfer induces sustained pericardial VEGF expression in dogs: effect on myocardial angiogenesis. *Cardiovasc Res* 44: 294-302

101. Lemperle S, Calhoun C, Curran R, Holmes R (1998)
Bony healing of large cranial and mandibular defects protected from soft tissue interposition: a comparative study of spontaneous bone regeneration, osteoconduction, and cancellous autografting in dogs. *Plast Reconstr Surg* 101: 660-672
102. Letsch R, Rosenthal E, Joka T (1993)
Lokale Antibiotika-Applikation in der Osteomyelitisbehandlung--Eine Vergleichsstudie mit zwei verschiedenen Trägersubstanzen. *Aktuelle Traumatol* 23: 324-329
103. Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, Goeddel DV, Ferrara N (1989)
asacular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* 246: 1306-1309
104. Leunig M, Yuan F, Berk DA, Gerweck LE, Jain RK (1994)
Angiogenesis and growth of isografted bone: quantitative in vivo assay in nude mice. *Lab Invest* 71: 300-307
105. Leunig M, Yuan F, Gerweck LE, Jain RK (1997)
Effect of basic fibroblast growth factor on angiogenesis and growth of isografted bone: quantitative in vitro-in vivo analysis in mice. *Int J Microcirc Clin Exp* 17: 1-9
106. Litwin M, Gamble J, Vadas M (1995)
Role of cytokines in endothelial cell functions, Human cytokines: their role in disease and therapy. Aggarwal B, Puri R (Hrsg.). Cambridge, Blackwell Science, 101-129

107. Mandriota SJ, PepperMS (1999)
Lymphangiogenesis and biological activity of vascular endothelial growth factor-C. *J Soc Biol* 193: 159-163
108. Marden LJ, Reddi AH, Hollinger JO (1990)
Growth and differentiation factors: role in bone induction and potential application in craniofacial surgery. *J Craniofac Surg* 1: 154-160
109. Marx RE, Johnson RP (1987)
Studies in the radiobiology of osteoradionecrosis and their clinical significance. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 64: 379-390
110. Meyer M, Clauss M, Lepple-Wienhues A, Waltenberger J, Augustin HG, Ziche M, Lanz C, Buttner M, Rziha HJ, Dehio C (1999)
A novel vascular endothelial growth factor encoded by Orf virus, VEGF-E, mediates angiogenesis via signaling through VEGF-R2 (KDR) but not VEGF-R1 (Flt-1) receptor tyrosine kinases. *EMBO J* 18: 363-374
111. Miki T, Imai Y (1996)
Osteoinductive potential of freeze-dried, biodegradable, poly(glycolic acid-co-lactic acid) disks incorporated with bone morphogenetic protein in skull defects of rats. *Int J Oral Maxillofac Surg*; 25: 402-406
112. Miller R (1980)
Simultaneous statistical inference, 2. Edition. New York, Springer Verlag
113. Motoki D, Mulliken J (1990)
The healing of bone and cartilage. *Clin Plast Surg*; 17: 527-544

114. Nehls V, Herrmann R (1996)
The configuration of fibrin clots determines capillary morphogenesis and endothelial cell migration. *Microvasc Res* 51: 347-364
115. Neufeld G, Tessler S, Gitay-Goren H, Cohen T, Levi B (1994)
Vascular endothelial growth factor and its receptors. *Prog Growth Factors Res* 5: 89-97
116. Nevins M, Kirker-Head C, Nevins M, Wozney J, Palmer R, Graham D (1996)
Bone formation in the goat maxillary sinus induced by absorbable collagen sponge implants impregnated with recombinant human bone morphogenetic protein-2. *Int J Periodont Rest Dent* 16: 9-19
117. Nishikawa S, Nishikawa S, Hirashima M, Matsuyoshi N, Kodama H (1998)
Progressive lineage analysis by cell sorting and culture identifies FLK+VE-cadherin+ cells at a diverging point of endothelial and hematopoietic lineages. *Development*; 125: 1747-1757
118. Ogawa S, Oku A, Sawano A, Yamaguchi S, Yazaki Y, Shibuya M (1998)
A novel type of vascular endothelial growth factor, VEGF-E (NZ-7 VEGF), preferentially utilizes KDR/Flk-1 receptor and carries a potent mitotic activity without heparin-binding domains. *J Biol Chem* 273: 31273-82
119. Olmsted-Davis E.A., Gugala Z. and Camargo F. et al. (2003)
Primitive adult hematopoietic stem cells can function as osteoblast precursors, *PNAS Proceedings of the National Academy of Sciences* 100 : 15877.

120. Paralkar VM, Vukicevic S, Reddi AH (1991)
Transforming growth factor b type I binds to collagen IV of basement membrane matrix: implication for development. Dev Biol 143: 303-308
121. Plate H (1993)
Angiogenese und Anti-Angiogenese. Dtsch Ärzteblatt: 2006-2009
122. Rabie ABM (1997)
Vascular endothelial growth pattern during demineralized bone matrix induced osteogenesis. Connect Tiss Res 36: 337-345
123. Ramselaar M, Driessens F, Kalk W, De Wijn J, Van Mullem P (1991)
Biodegradation of four calcium phosphate ceramics; in vivo rates and tissue interactions. J Mat Sci 2: 63-70
124. Reddi AH, Anderson WA (1976)
Collagenous bone matrix-induced endochondral ossification hemopoiesis. J Cell Biol 69 : 557-572
125. Reddi A (1994)
Bone and cartilage differentiation. Curr Opin Gen Develop 4: 737-744
126. Ripamonti U (1992)
Calvarial reconstruction in baboons with porous hydroxyapatite. J Craniofac Surg 3: 149-159
127. Ripamonti U, Ma SS, van den Heever B, Reddi A (1992)
Osteogenin, a bone morphogenetic protein, adsorbed on porous hydroxyapatite substrata, induces rapid bone differentiation in calvarial defects of adult primates. Plast Reconstr Surg 90: 382-393

128. Risau W, Flamme I (1995)
Vasculogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 11: 73-91
129. Risau W (1995)
Differentiation of endothelium. *FASEB J* 9: 926-933
130. Risau W (1997)
Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 386: 671-674
131. Ritman E, Bolander M, Fitzpatrick L, Turner R (1998)
Micro-CT imaging of structure-to-function relationship of bone microstructure and associated vascular involvement. *Tech Health Care* 6: 403-412
132. Robb L (1996)
The Scl gene product is required for the generation of all hematopoietic lineages in the adult mouse. *EMBO J* 15: 4123-4129
133. Saadeh P, Mehrara B, Steinbrech D, Spector J, Greenwald J, Chin G, Ueno H, Gittes G, Longaker M (2000)
Mechanisms of fibroblast growth factor-2 modulation of vascular endothelial growth factor expression by osteoblastic cells. *Endocrinology* 141: 2075-2083
134. Safi J, Di Paula AF, Riccioni T, Kajstura J, Ambrosio G, Becker LC, Anversa P, Capogrossi MC (1999)
Adenovirus –mediated acidic fibroblast growth factor gene transfer induces angiogenesis in the nonischemic rabbit heart. *Microvasc Res* 58: 238-249

135. Sato T, Tozawa Y, Deutsch U, Wolburg-Buchholz K, Fujiwara Y, Gendron Maguire M, Gridley T, Wolburg H, Risau W, Qin Y (1995)
Distinct roles of the receptor tyrosine kinases Tie-1 and Tie-2 in blood vessel formation. *Nature*; 376: 70-74
136. Schaub RG, Wozney J (1991)
Novel agents that promote bone regeneration. *Curr Opin Biotechnol* 2: 868-871
137. Schenk R (1994)
Bone regeneration: biologic basis, Guided bone regeneration in implant dentistry. Buser D, Dahlin C, Schenk R (Hrsg.). Chicago, Berlin, London, Tokyo, Moskau, Prag, Sofia, Warschau, Quintessence Books, 49-101
138. Schlaeppli JM, Gutzwiller S, Finkenzeller G, Fournier B (1997)
1,25-Dihydroxivitamin D3 induces the expression of vascular endothelial growth factor in osteoblastic cells. *Endocr Res* 23: 213-229
139. Schlickewei W, Paul C (1991)
Experimentelle Untersuchungen zum Knochenersatz mit bovinem Apatit. *Hefte zur Unfallheilkunde* 216: 59-69
140. Schmidt K, Swoboda H (1995)
Die Bedeutung matrixgebundener Zytokine für die Osteoinduktion und Osteogenese. *Implantologie* 2: 127-148
141. Schmid J., Wallkamm B. and Hammerle C.H. et al, (1997)
The significance of angiogenesis in guided bone regeneration. A case report of a rabbit experiment, *Clin Oral Implants Res* 8: 244

142. Schott RJ, Morrow LA (1993)
Growth factors and angiogenesis. *Cardiovasc Res* 27: 1155-1161
143. Schwartz Z, Mellonig JT, Carnes DL, de la Fontaine J, Cochran DL, Dean DD, Boyan BD (1996)
Ability of commercial demineralized freeze-dried bone allograft to induce new bone formation. *J Periodontol* 67: 918-926
144. Shah S, Cha Y, Pitt C (1992)
Poly(glycolic acid-co-DL-lactic acid): diffusion or degradation controlled drug delivery. *J Controlled Release* 18: 261-270
145. Shalaby F, Rossant J, Yamaguchi T, Gertsenstein J, Wu X, Breitman M, Schuh A (1995)
Failure of blood-island formation and vasculogenesis in FLK-1-deficient mice. *Nature*; 376: 62-66
146. Shibuya M (1996)
Involvement of the VEGF-Flt-receptor family in angiogenesis. *Nippon Yakurigaku Zasshi* 107: 119-131
147. Slavin J (1995)
Fibroblast growth factors: at the heart of angiogenesis. *Cell Biol Int* 19: 431-444
148. Stanley HR, Hall MB, Clark AE, King CJ, Hench LL, Berte JJ (1997)
Using 45S5 bioglass cones as endosseous ridge maintenance implants to prevent alveolar ridge resorption: a 5-year evaluation. *Int J Oral Maxillofac Implants* 12: 95-105

149. Steinbrech DS, Mehrara BJ, Saadeh PB, Chin G, Dudziak ME, Gerrets RP, Gittes GK, Longaker MT (1999)
Hypoxia regulates VEGF expression and cellular proliferation by osteoblasts in vitro. *Plast Reconstr Surg* 104: 738-747
150. Takano S, Yoshii Y, Kondo S, Suzuki H, Maruno T, Shirai S, Nose T (1996)
Concentration of vascular endothelial growth factor in the serum and tumor tissue of brain tumor patients. *Cancer Research*; 56: 2185-2190
151. Takeshita S, Weir L, Chen D, Zheng LP, Riessen R, Bauters C, Symes JF, Ferrara N, Isner JM (1996)
Therapeutic angiogenesis following arterial gene transfer of vascular endothelial growth factor in a rabbit model of hindlimb ischemia. *Biochem Biophys Res Commun* 227: 628-635
152. Terheyden H, Jepsen S (1999)
Hartgeweberegeneration durch Wachstumsfaktoren und morphogene Proteine. *Implantologie* 4: 359-378
153. Thurston G, Suri C, Smith K, McClain J, Sato TN, Yancopoulos GD, McDonald DM (1999)
Leakage-resistant blood vessels in mice transgenically overexpressing angiopoietin-1. *Science* 286: 2511-2514
154. Trueta J, Little K (1960)
The vascular contribution to osteogenesis. II. Studies with the electron microscope. *J Bone Joint Surg* 42: 367-376
155. Trueta J (1963)
The role of vessels in osteogenesis. *J Bone Joint Surg* 45B: 402-418

156. Urist MR, Siverman BF, Buring K, Dubuc FL, Rosenberg JM (1967)
The bone induction principle. Clin Orthop 53: 243-283
157. Walgenbach K, Bruenagel G, Lovett J, Shestak K, Stark G (1998)
Therapeutic angiogenesis in wounds: the influence of growth factors at a muscle flap-ischemic tissue interface. Biological matrices and tissue reconstruction. Stark G, Horch R, Tanczos E (Hrsg.). Berlin, Springer, 279-282
158. Wang DS, Yamazaki K, Nohtomi K, Shizume K, Ohsumi K, Shibuya M, Demura H, Sato K (1996)
Increase of vascular endothelial growth factor mRNA expression by 1,25-dihydroxyvitamin D3 in human osteoblast-like cells. J Bone Miner Res 11: 472-479
159. Wang DS, Miura M, Demura H, Sato K (1997)
Anabolic effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on osteoblasts are enhanced by vascular endothelial growth factor produced by osteoblasts and by growth factors produced by endothelial cells. Endocrinology 138: 2953-2962
160. Wang HU, Chen ZF, Anderson DJ (1998)
Molecular distinction and angiogenic interaction between embryonic arteries and veins revealed by ephrin-B2 and its receptor Eph-B4. Cell 93: 741-753
161. Wannfors K (1989)
Vascular changes after experimentally-induced inflammation in the mandible. Int J Oral Maxillofac Surg 18: 79-82

162. Wannfors K, Gazelius B (1991)
Blood flow in jaw bones affected by chronic osteomyelitis. *Br J Oral Maxillofac Surg* 29: 147-153
163. Weidner N, Semple J, Welch W, Folkman J (1991)
Tumor angiogenesis and metastasis: correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med* 324: 1-8
164. Weinbaum S, Cowin S, Zeng Y (1994)
A model for the excitation of osteocytes by mechanical loading-induced bone fluid shear stresses. *J Biomech* 27: 339-360
165. Winet H, Hollinger J, Stevanovic M (1995)
Incorporation of polylactide-polyglycolide in a cortical defect: neoangiogenesis and blood supply in a bone chamber. *J Orthop Res* 13: 679-689
166. Winet H (1996)
The role of microvasculature in normal and pertubated bone healing as revealed by intravital microscopy. *Bone* 19: 39S-57S
167. Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW, Rudge JS, Wiegand SJ, Holash J (2000)
Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature* 407: 242-248
168. Zellin G, Linde A (1997)
Importance of delivery systems for growth-stimulatory factors in combination with osteopromotive membranes. An experimental study using rhBMP-2 in rat mandibular defects. *J Biomed Mater Res* 35: 181-190

7 Danksagung

Ich möchte mich bei Herrn Priv.- Doz. Dr. med. Dr. med. dent. Johannes Kleinheinz (Klinik und Poliklinik für Mund- und Kiefer-Gesichtschirurgie) für die Überlassung dieses interessanten Themas und das freundliche und produktive Klima in der Arbeitsgruppe bedanken. Er sorgte für eine hervorragende wissenschaftliche Betreuung.

Des Weiteren möchte ich Herrn Priv.- Doz. Dr. H.-P. Wiesmann (Klinik und Poliklinik für Mund- und Kiefer-Gesichtschirurgie, Institut für Biomaterialisation) für die Unterstützung bei der Umsetzung der Experimente danken.

Ebenfalls möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. U. Stratmann (Institut für Anatomie) bedanken, der mir stets Zugang zu seinen Laboratorien ermöglichte und Unterstützung bei den mikroskopischen Untersuchungen leistete.

Ein besonderer Dank geht an Frau K. Cebulla (Institut für Anatomie), die mich durch ihre Lebenserfahrung und Kompetenz in medizinisch-technischen Angelegenheiten vor Fehlern und auch zeitraubenden Umsetzungen von Verarbeitungsverfahren bewahren konnte und für klare Fakten sorgte.

Ein Dank an meine Arbeitsgruppenkollegen E. Bölükbasi, J Brockmann und C. Fischer für die gute Zusammenarbeit an den bis in die Nacht dauernden Labortage.

Herzlichen Dank auch an alle Mitarbeiter der zentralen tierexperimentellen Einrichtung für die Tierliebe und sorgfältige Betreuung der Tiere.

Meinen ganz herzlichen Dank geht auch an meine Freunde und Kollegen, insbesondere Robert für die geduldige Hilfe bei der Lösung von Problemen mit der Arbeit.

Ausdrücklich möchte ich meiner Frau für den moralischen Beistand und ihre Unterstützung während meiner Arbeit danken.

Lebenslauf

Geburtsdatum:	27.10.1971
Geburtsort:	Höxter
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Familienstand:	verheiratet
Schulbildung:	
06/1992	Abitur, Herder-Gymnasium in Minden
Zivildienst	
01/1993 – 4/1994	Kinderklinik, Klinikum Minden
Studium	
04/1994 -	Studium der Humanmedizin an der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster
	Famulaturen
	<i>Pädiatrie</i>
	bei Herrn Prof. Dr. med. Tillmann Kinderklinik, Klinikum Minden
	<i>Radiologie</i>
	bei Herrn Prof. Dr. Ritter Institut für ZÄ Röntgenologie, WWÜ-Münster
	<i>Mund- und Kiefer-Gesichtschirurgie</i>
	bei Herrn Prof. Dr. Dr. Dr. Joos Klinik und Poliklinik für Mund- und Kiefer- Gesichtschirurgie, WWU-Münster
	<i>Plastische Chirurgie</i>
	bei Herrn Dr. Tillkorn/ PD Dr. Schwipper Fachklinik Hornheide
10/2000-10/2001	Praktisches Jahr
	in Städt. Kliniken Bielefeld Mitte Wahlfach: Hals-, Nasen-, Ohrenheilkunde
10/2001	3. Abschnitt der ärztlichen Prüfung

11/2001 – 4/2003

Arzt im Praktikum

Klinikum Minden

Klinik für Hals- Nasen-Ohrenheilkunde,
Plastische Operationen und Logopädie

Chefarzt Prof. Dr. med. M.Schrader

05/2003 -

Assistenzarzt

Universitätsklinik Bonn

Klinik und Poliklinik für
Hals-Nasen-Ohrenheilkunde/Chirurgie

Direktor Prof. Dr. med. F. Bootz



Bezirksregierung Münster

Bezirksregierung Münster - 48129 Münster

Gegen Empfangsbekanntnis

Westfälische Wilhelms-Universität Münster
Klinik und Poliklinik für Mund- und
Kiefer-Gesichtschirurgie
Herrn Dr. Johannes Kleinheinz
Herrn Prof. Dr.Dr.Dr. h.c. Ulrich Joos
Waldeyerstr. 30

Dienstgebäude
Alter Steinweg 22-24
Telefon: (0251) 411-0
Durchwahl: 2110
Zimmer: G 106
Frau Möllers

Aktenzeichen
23.0835.1.0 (G 46/97)

12 . Januar 1998

48149 Münster

Betr.: Tierschutz;
hier: Durchführung von Versuchen an Wirbeltieren

Bezug: Ihr Antrag vom 10.11.1997

G e n e h m i g u n g s b e s c h e i d :

Sehr geehrter Herr Dr. Kleinheinz,
sehr geehrter Herr Prof. Dr. Joos,

gemäß § 8 Tierschutzgesetz (TierSchG) in der Neufassung vom 17.
Februar 1993 (BGBI. I S. 254) in geltender Fassung wird Ihnen
die Genehmigung zur Durchführung nachstehenden Versuchsvorhabens
erteilt:

**Stimulation der Angiogenese während der Knochenregeneration in
definierten Kieferdefekten durch angiogene Wachstumsfaktoren.**

Leiter des Versuchsvorhabens und sein Stellvertreter sind:

Herr
Dr. Johannes Kleinheinz
Klinik u. Poliklinik f. Mund-
u. Kiefer-Gesichtschirurgie
Waldeyerstr. 30

Herr
Prof. Dr.Dr.Dr. h.c. U. Joos
Klinik u. Poliklinik f. Mund-
u. Kiefer-Gesichtschirurgie
Waldeyerstr. 30

48129 Münster

48129 Münster

Diese Genehmigung gilt bis zum 31. 01. 2000.

Zur Durchführung des Versuchsvorhabens dürfen folgende Tiere verwendet werden:

136 Kaninchen.

Auflagen:

Mit dem Versuchsvorhaben darf erst nach Vorliegen dieser Genehmigung begonnen werden.

Sofern der Leiter des Versuchsvorhabens oder sein Stellvertreter wechselt, ist mir dieser Wechsel unverzüglich anzuzeigen.

Diese Genehmigung wird zurückgenommen, wenn bei der Erteilung die Voraussetzungen nach § 8 Abs. 3 TierSchG nicht gegeben waren.

Sie wird widerrufen, wenn die Voraussetzungen nach § 8 Abs. 3 TierSchG nicht mehr gegeben sind und dem Mangel nicht innerhalb einer von mir zu bestimmenden Frist abgeholfen wird; sie kann widerrufen werden, wenn ihre Bedingungen und Auflagen nicht erfüllt werden oder den Vorschriften des § 9 Abs. 2 TierSchG wiederholt oder grob zuwidergehandelt worden ist.

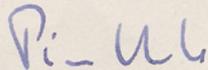
Da das Versuchsvorhaben überwiegend im öffentlichen Interesse erfolgt, wird von der Erhebung einer Verwaltungsgebühr Abstand genommen.

Rechtsbehelfsbelehrung:

Gegen diesen Bescheid kann innerhalb eines Monats nach Bekanntgabe Widerspruch erhoben werden. Der Widerspruch ist bei mir unter der oben genannten Anschrift schriftlich oder zur Niederschrift einzureichen.

Sollte die Frist durch das Verschulden eines von Ihnen Bevollmächtigten versäumt werden, so würde dessen Verschulden Ihnen zugerechnet werden.

Mit freundlichen Grüßen
Im Auftrag



(Dr. Piontkowski)