

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 –

Degradationsuntersuchung eines Komplexes aus VEGF₁₆₅ und
Kollagen Typ I in vitro im Kreislaufsimulationsmodell: Analyse der
Freisetzungskinetik des VEGF₁₆₅ und der licht- und
elektronenmikroskopischen Morphologie des Komplexes.

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung des doctor medicinae dentium

Der Medizinischen Fakultät der
Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von
Dr. med. Carsten Dirk Fischer
aus Nordhorn

2006

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Heribert Jürgens

1. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. Dr. med. dent. J. Kleinheinz

2. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. dent. C. Runte

Tag der mündlichen Prüfung: 25.07.2006

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: Priv.-Doz. Dr. Dr. J. Kleinheinz
Koreferent: Priv.-Doz. Dr. C. Runte

ZUSAMMENFASSUNG

Dr. Carsten Dirk Fischer

Degradationsuntersuchung eines Komplexes aus VEGF₁₆₅ und Kollagen Typ I in vitro im Kreislaufsimulationsmodell: Erörterung der Freisetzungskinetik des VEGF₁₆₅ und der licht- und elektronenmikroskopischen Morphologie des Komplexes.

Der Wiederaufbau von Knochendefekten stellt für den Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgen eine große Herausforderung dar. Das autologe Knochenransplantat stellt aktuell den Goldstandard dar, doch es bestehen weiterhin Bestrebungen nach Alternativen um Zweiteingriffe zu vermeiden. Ein Ansatz stellt die Osteoinduktion durch einen Komplex aus einer knochenähnlichen Grundsubstanz und Zytokinen dar, die im Knochendefekt eine für zügige und komplikationsarme Ausheilung sorgt.

In dieser Studie wurde ein Komplex aus Kollagen Typ I als Trägermatrix und Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF₁₆₅) als angiogenes Zytokin in vitro untersucht. In einem Kreislaufsimulationsmodell wurden die Komplexe in drei verschiedenen Konzentrationen (0,2µg - 10µg - 80µg VEGF pro Kollagenblock) über fünf Tagen von Pufferlösung umspült. In regelmäßigen Abständen wurde das VEGF in der Pufferlösung im ELISA-Verfahren bestimmt und die Freisetzungskinetik ermittelt. Es konnte eine hyperphysiologische VEGF-Konzentration im Kreislaufsystem über unerwartet lange 50 Stunden erreicht werden, bei einer parallel bestimmten Halbwertszeit des freien Kollagens von nur 90 Minuten. Daraus lässt sich eine Stabilisierung und Speicherung des sonst instabilen VEGF durch die Komplexierung mit dem Kollagen ableiten.

Das Zytokin VEGF wurde im Immunogoldverfahren markiert und in der Elektronenmikroskopie (REM und TEM) sichtbar gemacht. Die morphologische Aufarbeitung erfolgte zusätzlich durch die Lichtmikroskopie. Die goldmarkierten VEGF-Proteine stellten sich den Kollagenfibrillen eng benachbart dar und zeigten sich in Konglomeraten an die Fasern gebunden. Diese morphologische Darstellung untermauert die Theorie der Protein stabilisierung des VEGF durch die Komplexierung an das Kollagen.

Der VEGF-Kollagen-Komplex kann eine neue effektive Therapiemöglichkeit zur Behandlung von knöchernen Defekten darstellen. Nachfolgende Studien können diese These in vivo bestärken.

Tag der mündlichen Prüfung: 25.07.2006

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Grundlagen.....	1
1.1.1. Osteogenese.....	1
1.1.2. Zytokine und VEGF.....	3
1.1.3. Knochenersatzmaterial und Kollagen.....	6
1.2. Klinische Relevanz.....	11
2. Material und Methoden	13
2.1. Kombinationssystem Kollagen-VEGF.....	13
2.2. Versuchsaufbau Kreislaufpumpe.....	13
2.3. Versuchsprotokoll.....	16
2.4. Analysemethoden.....	17
2.4.1. ELISA.....	17
2.4.2. Lichtmikroskopische Darstellung.....	19
2.4.3. Elektronenmikroskopische Darstellung.....	21
2.4.3.1. Native Rasterelektronenmikroskopie.....	21
2.4.3.2. Immunologische Darstellung des VEGF in REM.....	22
2.4.3.3. Immunologische Darstellung des VEGF in TEM.....	22

3. Ergebnisse	24
3.1. Die Halbwertszeit des VEGF.....	24
3.2. VEGF-Konzentrationen im Vergleich.....	27
3.3. Histologie und Ultrastruktur.....	31
3.3.1. Lichtmikroskopie.....	31
3.3.2. REM.....	32
3.3.3. TEM.....	42
4. Diskussion	44
5. Zusammenfassung	48
6. Literatur	49
7. Danksagung	62
8. Lebenslauf	63

1. Einleitung

1.1. Grundlagen

1.1.1. Osteogenese

Der menschliche Knochen ist kein statisches Gewebe, sondern befindet sich im ständigen Zustand des An- und Abbaus. Abhängig von funktionellen Einflüssen, z.B. durch Druck oder Zug, erneuert der Organismus das knöcherne Skelett im Laufe eines Jahres in einem Umfang von fünf Prozent. Dieser relativ langsame Knochenumbau reicht zur Regeneration von knöchernen Defekten nicht aus. Die Ausheilung dieser Defekte wird durch komplexe biochemische Vorgänge gesteuert.

Die Knochenheilung im menschlichen Körper läßt sich in drei Varianten einteilen: Erstens die enchondrale Knochenheilung, zweitens die desmale Ossifikation und drittens die appositionale Knochenneubildung auf bereits bestehenden Knochenstrukturen. Die drei Varianten basieren auf unterschiedlichen Eintrittszeitpunkten in einer identisch ablaufenden Kaskade. Hier soll der Ablauf der enchondralen Ossifikation näher charakterisiert werden da dieser den vollständigen Ablauf der Kaskade beinhaltet.

Die enchondralen Ossifikation beginnt mit einem initialen Reiz im Bereich der extrazellulären Matrix [Reddi et al. 1984]. Eine Einblutung in einem Defekt führt zur Bildung eines Koagulums. Durch Stimulierung von Bindegewebsstammzellen durch Zytokine, z.B. den Bone Morphogenetics Proteins (BMP), werden osteogene Zellpopulationen induziert [Kübler et al. 1997, Schmidt et al. 1995]. Undifferenzierte mesenchymale Stammzellen wandeln sich um in Präosteoblasten als Vorstufe der Osteoblasten. Sie schütten eine extrazelluläre, knorpelartige Matrix aus, auch Osteoid genannt. Die Präosteoblasten differenzieren sich anschließend zu Chondrozyten [Buckwalter und Cooper 1987, Caplan 1990, Pechak et al. 1986, Recker 1992, Sevitt 1981]. Nach der Anlagerung des hyalinartigen Knorpels erscheint ein periostaler Überzug über der Wachstumsregion und beginnt, eine dünne Knochenmanschette

auszubilden. Nach teilweiser Mineralisation dieser Knochenmatrix vergrößern sich die Chondrozyten und vaskuläre Knospen bilden sich in der Wachstumszone. Osteoprogenitorzellen, die diese vaskulären Knospen begleiten, differenzieren in Osteoblasten und schließlich weiter zu Osteozyten. So formt sich eine knöcherne Matrix auf der Grundlage dieses präformierten mineralisierten Knorpels. Mehrkernige Osteoklasten übernehmen daraufhin den Abbau des kalzifizierten Knorpelgewebes und des unreifen Knochens, und Osteoblasten ersetzen den Komplex aus Knorpel und unreifem Knochen durch reifen lamellären Knochen. Im weiteren Verlauf bildet sich ein Gleichgewicht zwischen Neubildung und Resorption im äußerlich betrachtet statischen Knochengewebe aus (Bone-Remodelling). Die desmale Ossifikation und die apositionelle Knochenneubildung sparen die Stufen des knorpeligen Ersatzgewebes durch Aktivierung der Kaskade in den späteren Abschnitten aus.

Die Vaskularisation des Knochens ist ein wichtiger Faktor der Knochenregeneration und des physiologischen Bone-Remodellings [Collin-Osdoby 1994]. Hier spielt die Gefäßneubildung in der Heilungszone eine elementare Rolle. Durch die Permeabilität des Gefäßendothels wird der Austausch von Botenstoffen zwischen dem Blut und den umliegenden Geweben ermöglicht [DiCorleto und Cimbrone 1996]. Ohne eine adäquate vaskuläre Blutversorgung sind die für den Zellerhalt notwendigen Austauschprozesse von Nährstoffe, Mineralien und Abbauprodukten nicht möglich. Nur durch eine kontinuierliche Sauerstoffversorgung, Temperaturregulation und pH-Regulation läuft eine geregelte Ossifikation des knöchernen Skeletts ab. Bei Störungen der Knochenvaskularisation kommt es folglich zu lokaler Gewebshypoxie mit anschließender Entzündung. Die Folge ist eine Knochengewebsnekrose mit Substanzverlust. Diese Störung der Vaskularisation ist zum Beispiel eine Ursache der Osteomyelitis [Bartkowski et al. 1994] und der Osteoradionekrose [Marx und Johnson 1987].

Die Regeneration von Knochendefekten kann durch Implantation eines resorbierbaren Fremdmaterials gefördert werden [Kasper et al. 1998]. Die primäre Funktion liegt in der Stabilisierung des obligat vorhandenen Blutkoagulums im knöchern umgebenen Defekt nach operativen Eingriffen, z. B. nach Zystektomien [Hemprich et al. 1989]. Hier zeigt das heterolog implantierte Kollagen gegenüber anderen Materialien wie Hydroxylapatit

oder Tricalciumphosphat Vorteile in Biokompatibilität und Resorbierbarkeit [Joos, 1983]. Das optimale Fremdmaterial sollte keine Kanzerogenität oder antigene Wirkung aufweisen. Es sollte nicht wasserlöslich sein und eine definierte Bioabsorbierbarkeit zeigen. Die Oberfläche des Trägermaterials muss möglichst biokompatibel und der Zellmigration förderlich sein. Hier zeigt sich heterologes Kollagen als suffiziente Lösung und befindet sich seit den 80er Jahren in klinischer Praxis bei der Behandlung von Knochendefekten.

Die Knochenregeneration kann durch Anregung des körpereigenen Gewebes durch Zytokine verstärkt werden. Zytokine sind körpereigene Glycoproteine und wirken als Botenstoffe für Gewebefunktionen wie vermehrte Zellteilung oder Produktion von Extrazellulärsubstanz [Sauter et al. 1999]. Untersuchungen mit BMP (Bone Morphogenetic Protein) [Hollinger et al. 1996] und FGF (Fibroblast Growth Factor) [Schliephake et al. 1998] zeigen, dass Zytokine als nativer rekombinater Reinstoff ohne Trägermatrix schnell abgebaut werden und keinen Effekt auf die Knochenregeneration haben. Erst das an eine Trägermatrix gekoppelte Zytokin zeigte eine Verstärkung der Knochenheilung. Die Voraussetzung für die osteoinduktive Wirkung des Zytokins ist eine definierte Freisetzungskinetik aus der Trägermatrix. Die faktorspezifische Schwellendosis zum Erzielen einer biologischen Wirkung muss über einen definierten Zeitraum überschritten werden um einen therapeutischen Effekt zu erreichen. Die verwendete Gesamtmenge des Zytokins muss ebenfalls in vivo ermittelt werden zur Vermeidung von Überdosierung und Toxizität.

1.1.2. Zytokine und VEGF

Die Osteoblastenaktivität wird systemisch durch Hormoneinflüsse wie Parathormon, Vitamin D3, Calcitonin und Geschlechtshormone [Hollinger und Leong 1996] geregelt. Ebenso haben genetische Faktoren Einfluss auf die Knochenneubildung des Organismus. Das Skelettsystem reagiert unter funktionellen Belastungen mit Knochenmehrbiildung und unter Überlastung mit Knochenresorption. Die Veränderungen basieren auf der Ausschüttung von Zytokinen im lokalen Knochengewebe. Diese Botenstoffe zeigen lokale Effekte auf Knochenzellen und die

Knochenmatrix [Buckwalter et al. 1995]: Die Zytokine aktivieren in Kaskaden weitere Wachstumsfaktoren und führen zur Knochenneubildung. Bisher wurden die Kaskaden nur bruchstückhaft entschlüsselt und noch lassen sich nicht alle Einflüsse dieser Regelkreise überblicken. Es ist notwendig, weitere Untersuchungen über die Rolle dieser Regelkreise in der Knochenentwicklung durchzuführen [Canalis et al. 1984].

Lokal wirkende Zytokine, die bereits in Studien zur Anwendung kamen, sind das Bone Morphogenetic Protein (BMP), der Transforming Growth Factor (TGF- β 1+2), der Insulin-like growth factor (IGF), der Fibroblast Growth Factor (bFGF) und der Platelet-derived growth factor (PDGF) [Eymers und Preusse 1999, Hollinger und Wong 1996, Schaub und Wozney 1991, Terheyden und Jepsen 1999]. Die Zytokine beeinflussen sich sowohl synergistisch als auch antagonistisch in ihrer Wirkung. Der zeitlichen Ablauf der Knochenregeneration zeigt sich komplex und eine therapeutische Anwendung der Zytokine setzt Kenntnisse ihrer Schlüsselfunktionen und ihrer Reihenfolge in der Wirkungskaskade voraus [Hauschka et al. 1986, Moham und Baylink 1991, Russell et al. 1990].

Der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor (VEGF) ist ein für den klinischen-therapeutischen Einsatz höchst interessantes Zytokin, weil es eine wichtige Funktion im Regelkreislauf der Gefäßneubildung (Angiogeneese) aufweist. Die Angiogeneese ist wiederum ein essentieller Bestandteil der Knochenheilung.

Der VEGF ist ein dimerisches Glycoprotein mit einer Masse von 46-48 kDalton und einer Masse von 24 kDalton pro Unterheit, die durch Disulfidbrücken verbunden sind. Erstmals wurde das Zytokin 1989 von Ferrara beschrieben. Zahlreiche Untersuchungen [Brown et al. 1992, Drake und Little 1995, Leung et al. 1989, Schlaeppli et al. 1997, Wang et al. 1996, Coultas et al. 2005] haben gezeigt, dass er essentiell für die normale embryonale Entwicklung ist und dass er eine entscheidende Rolle bei physiologischen und pathophysiologischen Vorgängen der Angiogeneese spielt. Seine Expression wird durch Zellhypoxie reguliert. Ausgehend von einem Gen, welches mit acht Exons auf Chromosom 6p12-p21 codiert ist, werden fünf verschiedene VEGF-Isoformen von 121, 165, 183, 189 und 206 Aminosäuren durch alternatives "Splicing" gebildet. Zellen, die VEGF exprimieren, produzieren meistens mehrere Isoformen gleichzeitig. VEGF-121

und VEGF-165 sind frei im Plasma gelöste Formen, während VEGF-189 und VEGF-206 vorwiegend an Heparin oder an Basalmembranen gebunden sind.

Ein Rezeptor für VEGF mit einer Masse von 170 bis 235 kDalton wird auf Gefäßendothelzellen exprimiert. Die Interaktion von VEGF mit Heparin-ähnlichen Molekülen der Extrazellulärmatrix ist für eine Bindung an den Rezeptor notwendig. Dieser VEGF-Rezeptor wird als VEGF-R1 bezeichnet [Fong et al. 1995].

Ein weiterer Rezeptor, bezeichnet als VEGF-R2, bindet konkurrierend VEGF₁₆₅ und PlGF (Plazenta-Wachstumsfaktor). VEGF₁₆₅ wird zudem spezifisch an den Rezeptor Neuropilin-1 gebunden [Flamme et al. 1995].

Als Regulationsmechanismus von VEGF besteht das Alpha-2-Makroglobulin im Blutplasma, da es die Bindung des Faktors an seinen Rezeptor hemmt. Heparin und Heparansulfat hingegen unterdrücken diese Wirkung [Heits et al. 1998].

VEGF ist ein hochspezifisches Mitogen für Gefäßendothelzellen. In vitro stimulieren die Isoformen VEGF 121 und 165 die Vermehrung von Endothelzellen großer Gefäße. Außerdem erhöht VEGF signifikant die Gefäßpermeabilität. Es spielt eine Rolle in der Neubildung von Gefäßen in vivo. Es besteht ein starker Synergismus zwischen der Wirkung von FGF und VEGF in der Angiogenese.

In Endothelzellen induziert VEGF die Synthese des von-Willebrand-Faktors und spielt eine Rolle in der Chemotaxis der Monozyten. In kleinen Gefäßen bewirkt VEGF die Synthese von Plasminogen-Aktivator und Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-Typ 1. Es wurde ein Einfluss von VEGF auf die interstitielle Kollagenase beschrieben, welche interstitielles Kollagen I-III auflöst.

In vielen Organsystemen wie im Nieren- oder Herzmuskelgewebe wird VEGF während der Wachphase vermehrt ausgeschüttet [Ferrara et al. 1991].

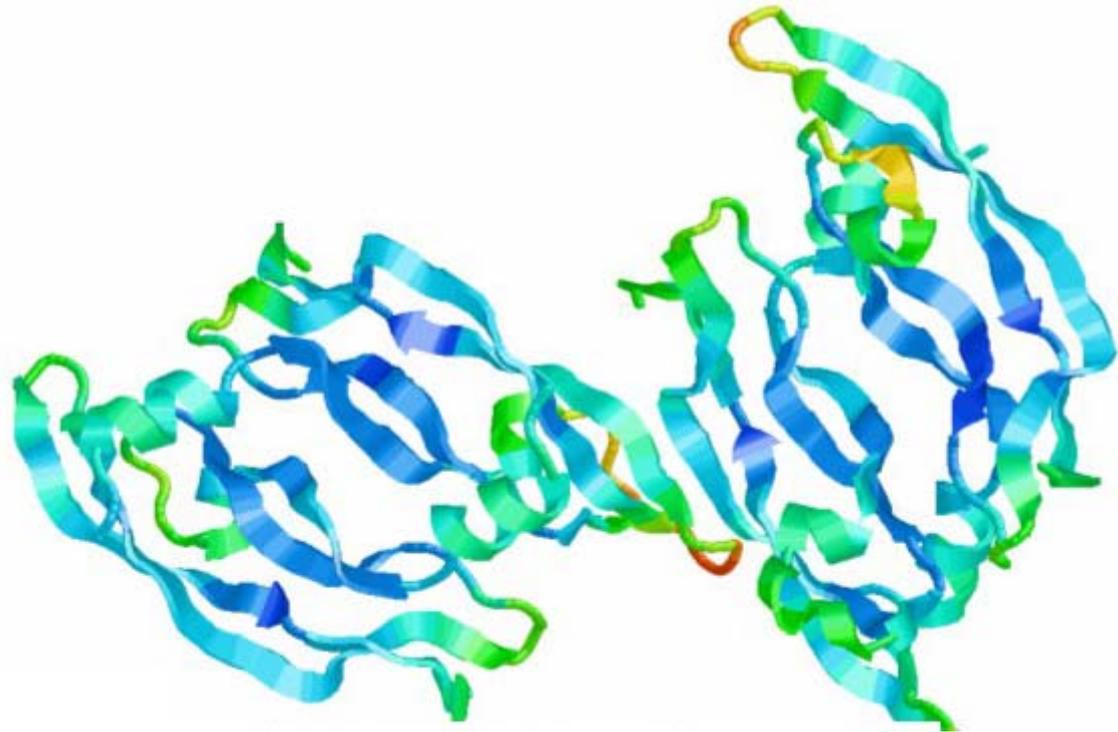


Abbildung 1: Ultrastruktur des humanen VEGF
(Quelle: <http://relic.bio.anl.gov/relicPeptides.aspx>)

1.1.3. Knochenersatzmaterial und Kollagen

Der Goldstandard der Knochenersatzmaterialien stellt das autologe Knochentransplantat dar, denn bei der Verwendung von körpereigenen Gewebe zum Auffüllen von Defekten zeigen sich die besten Regenerationsergebnisse. Die Knochenwachstumsinduktion beruht auf dem Vorhandensein einer knöchernen Matrix und auf der Wirkung natürlicher Wachstumsfaktoren durch das Transplantat [Bolander und Balian 1986]. Die Verwendung von körpereigenem Knochengewebe setzt aber das Setzen eines weiteren unerwünschten Knochendefektes im Entnahmegebiet voraus. Zweiteingriffe am Beckenknochen oder in der Mundhöhle verursachen eine erhöhte Morbidität des Patienten und auch Entnahmedefekte bedürfen einer suffizienten lokalen Behandlung. Auch Knochentransplantate von Fremdspendern sind durch das Restinfektionsrisiko

problematisch, ein regelmäßiger Einsatz stößt an logistische Grenzen und verursacht hohe Kosten.

Neben dem oben genannten autologen Knochentransplantat wünscht sich der Behandler eine praktikable Behandlungsmöglichkeit in Form von allogenen Knochenersatzmaterial. Hier wurden in der Vergangenheit verschiedene Materialansätze beschrieben, z.B. synthetische organische und anorganische Materialien (Poly-Lactic-Acid, Poly-Glycolic-Acid und Hydroxylapatit, Trikalziumphosphat, Biogläser), natürliche organische und anorganische Materialien (Kollagen, Fibringel und Hydroxylapatit aus Korallen, gereinigte anorganische bovine Knochenmatrix, Autolyzed, antigen-extracted, allogeneic bone = AAA bone)

Diese Materialien haben sich im klinischen Alltag bewährt und stellen eine biologische Matrix zur Einleitung der Knochenregeneration dar. Die zweite Wirkkomponente des körpereigenen Transplantates, die Wirkung von Wachstumsfaktoren, bleibt Ihnen verwehrt. Die Nutzung dieser Wirkkomponente stellen so genannte „Drug Delivery Systems“ dar, in denen das Grundgerüst der Trägersubstanz mit dem biologisch wirksamen Wachstumsfaktor komplexiert ist.

Die Anforderungen der Matrixkomplexe bestehen in der präzisen Charakterisierung seiner physikalischen, biologischen und pharmakologischen Eigenschaften. Das Material muss biokompatibel sein und ein definiertes Resorptionsverhalten aufweisen [Agrawal et al. 1995, Hutmacher et al. 1998, Wang et al. 1996, Zellin und Linde 1997]. Die Matrixkomplexe sollten die aktiven Stoffe räumlich und zeitlich begrenzt aufnehmen und für lokale Anforderungen zur Verfügung stellen [Hollinger und Leong 1996]. Entscheidend dabei ist die Synchronisation zwischen Abbaurate des Carriers und Aufbaurate des Knochens [Hutmacher et al. 1998]

Die am weitest verbreiteten Implantattypen stellen sicherlich die Kalziumphosphate Hydroxylapatit und Trikalziumphosphat dar. Die synthetisch hergestellten Apatitkristalle des Hydroxylapatit zeigen eine ausgezeichnete Biokompatibilität und Osteokonduktivität und können als Granulat [Horch und Steegmann 1985] oder in vorgefertigten Formteilen verwendet werden. Hydroxylapatitzement kann problemlos intraoperativ an die lokalen Verhältnisse angepasst werden und härtet ohne Wärmebildung aus [Costantino et al. 1991]. Probleme zeigen sich bei der individuellen Ausformung der Blöcke, weil sie spröde sind und nicht im Bereich funktionell

belasteter Strukturen angewendet werden können. Durch die ausgedehnten Resorptionszeiten zeigen sich häufig Dislokationen des Granulates unter funktioneller Belastung. Deutliche kürzere Abbauraten zeigt das β -Trikalziumphosphat, welches aber nur zögerlich knöchern durchbaut wird und oft nicht die gewünschte Strukturstabilität im belasteten Knochen erreicht [Foitzik und Stamm 1997, Ramselaar et al. 1991]. Die Kalziumphosphate als Trägermatrix wurden bereits für das Bone Morphogenetic Proteins getestet [Ripamonti et al. 1992]. Hydroxylapatit in Kombination mit dem Bone Morphogenetic Protein (BMP) zeigte gegenüber dem reinen Hydroxylapatit eine deutlich verbesserte Knochenregeneration [Horisaka et al. 1994], erklärbar durch die biologische Wirkung des Wachstumsfaktors. Hydroxylapatitzement als Trägermatrix für BMP konnte die regenerative Wirkung nochmals steigern [Kamegai et al. 1994].

Das Kollagen, speziell das Kollagen I, stellt mit 90% den Hauptbestandteil der organischen Knochenmatrix dar. Es ist ein natürlicher Träger von Wachstumsfaktoren und stellt einen 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 BMP 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. Die komplexierten Proteine weisen osteoinduktive Eigenschaften auf [Arzt et al. 1996]. Des Weiteren wird

versucht, die Eigenschaften des Kollagens durch Kombination mit anderen Grundmaterialien (Polylactid (PLA) / Polyglycolid (PGA) oder Hydroxylapatit) zu verbessern.

Die natürlichen anorganischen Materialien werden von unterschiedlichen Spendern durch unterschiedliche Verfahren gewonnen. Neben phykogener 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 et al. 1997].

In dieser Versuchsreihe wird als Trägermaterial für das Zytokin ein Flies aus equinen Kollagen Typ I verwendet. Kollagen findet sich in faserigem Bindegewebe, Knorpel-, Knochengewebe u. Zahnbein als geformter Teil der Interzellulärsubstanz; Die Fasern bestehen aus „zusammengekitteten“, Kollagen-haltigen Fibrillen (Abbildung 2).

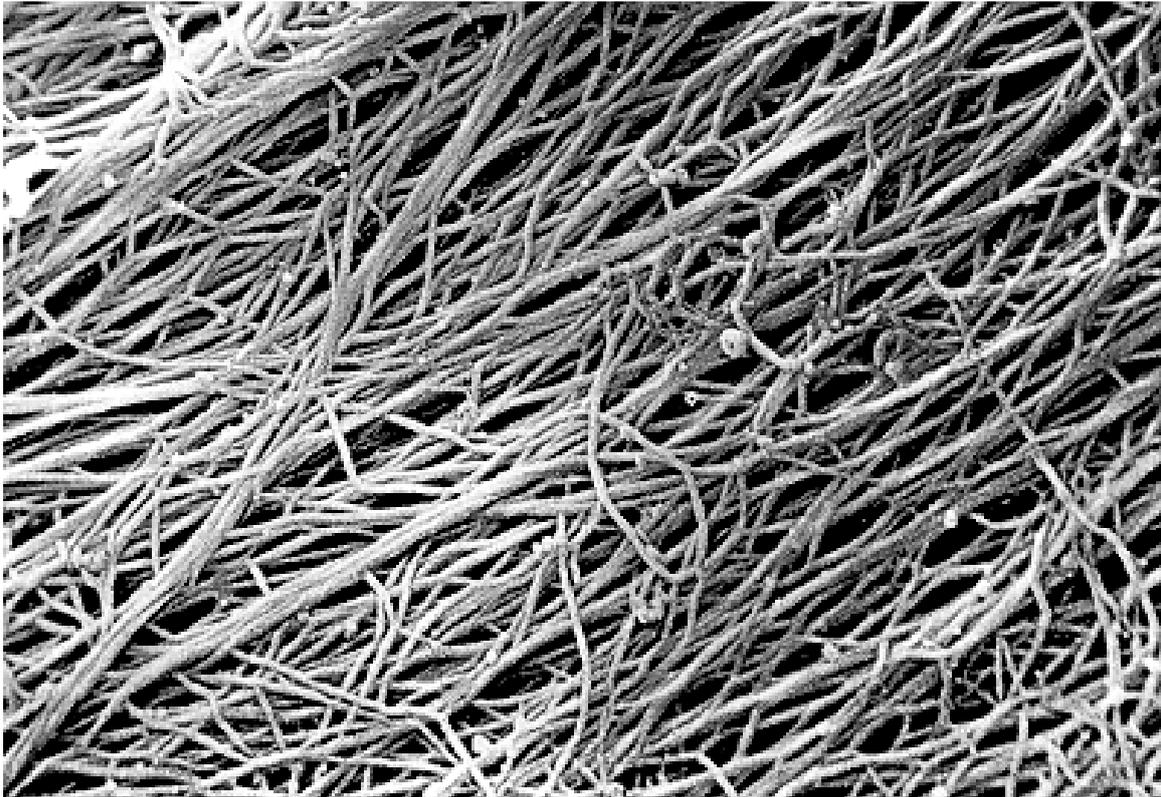


Abbildung 2: Elektronenmikroskopische Aufnahme von Kollagenfibrillen

Ultrastrukturell besteht Kollagen aus prolinreichen Gerüsteiweißkörpern (Skleroproteine), deren drei Eiweißketten mit linksläufiger Helixstruktur zu einer rechtsdrehenden Tripelhelix verdrillt sind (Abbildung 3).

Kollagen Typ I und III sowie Typ IV, V, VI und Elastin stellen die Hauptbestandteile der extrazellulären Matrix dar. Der Kollagenaufbau ebenso wie der Abbau findet in den Fibroblasten innerhalb des Interstitiums statt. Hier befindet sich auch eine interstitielle Kollagenase, die nach Aktivierung der Fibroblasten vermehrt exprimiert und durch Trypsin, Plasmin und Elastase aktiviert wird. Der Auf- und Umbau des Kollagens wird durch lokal produziertes Angiotensin II reguliert.

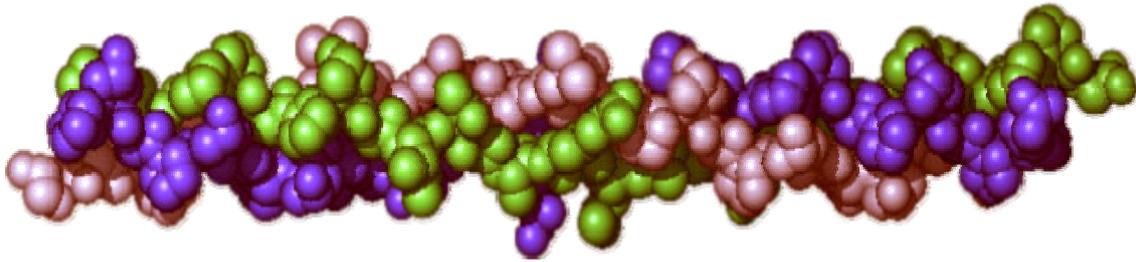


Abbildung 3: Kollagen-Tripelhelix

1.2. Klinische Relevanz

Aktuelle Erkenntnisse zur Wirkungsweise von Zytokinen lassen Ausblicke in neue Therapieverfahren zu, denn die Wirkung der Zytokine beeinflusst Regenerationsabläufe im geschädigten Körpergewebe. Komplexe knöcherne Defekte, zum Beispiel nach hochenergetischer Bestrahlung bei Tumorleiden, heilen nicht aus und zeigen multiple Komplikationen. In der täglichen Praxis stehen regenerative knöcherne Maßnahmen im Bereich der Implantologie im Interessenmittelpunkt der Behandler. Hier sind praktikable Ansätze zur Knochenaugmentation ohne Zweiteingriffe, zum Beispiel am gesunden Beckenkamm, gefordert. Bioaktive Zytokine geben dem Behandler neue Methoden zur Regeneration und Biomodulation in die Hand, zeigen aber den Nachteil einer erschwerten Anwendbarkeit: Die Zytokine werden im Organismus als Glykoproteine in lokalen Geweben produziert und zeigen sich in geringsten Mengen biologisch aktiv, werden aber durch natürlichen Zerfall nach kurzer Zeit wieder abgebaut. So zeigen sie eine ausgeprägte Instabilität bei äußerst kleinen applizierbaren Mengen.

Die lokale Applikation der Zytokine in flüssiger Reinform am erkrankten Gewebe ist problematisch. Der Behandler hat nur unpräzise Erkenntnisse über Konzentration und Einwirkdauer des Zytokins im lokalen Gewebe und es besteht die Gefahr der schnellen Deaktivierung, z.B. durch lokale Spülungen im Operationsgebiet. Auch die Lagerung

des reinen Zytokins unter Raumtemperatur führt unweigerlich zum Verlust seiner Wirkung durch natürlichen Zerfall.

Ein Lösungsansatz für diese Problematik besteht in der Applikation des bioaktiven Zytokins in Verbindung mit einer osteokonduktiven Trägersubstanz. Dies ermöglicht eine definierte lokale Zytokinkonzentration in Verbindung mit einem vereinfachten Handlings des Präparates. Ein solches Präparat sollte in einem Knochendefekt regenerativ und nebenwirkungsfrei einheilen und eine schnelle physiologische Belastung ermöglichen. Die Lagerungsfähigkeit der Zytokin-beladenen Trägersubstanz und eine einfache Applikation sind Voraussetzungen für eine spätere Anwendung im klinischen Alltag.

Es stand ein Kombinationssystem aus dem Trägermaterial Kollagen Typ I und dem darin gebundenen Zytokin Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) zur Verfügung. Die Zielsetzung dieser Studie lag in der Untersuchung der Freisetzungskinetik von dem Zytokin VEGF aus einer hochgereinigten equinen Kollagenmatrix. Ferner wurden morphologische Veränderungen des Komplexes im simulierten physiologischen Blutfluß *in vitro* dargestellt.

Die Kenntnis von Anflutungs- und Sättigungsverhalten in des VEGF *in vitro* bestimmt in einem reproduzierbarem Versuchsaufbau ist die Grundlage weitergehender Untersuchungen der VEGF-Kollagen-Kombination für die zukünftige klinische Anwendung.

2. Material und Methoden

2.1. Kombinationssystem Kollagen-VEGF

Die Herstellung des Kombinationssystem Kollagen-VEGF entsprach den Anforderungen an ein biologisch resorbierbares Trägersystem [Friess 1998]. Equines Kollagen Typ I wurde aus Sehnenpräparaten entnommen und anschließend von nicht-kollagenen Bestandteilen gereinigt, z.B. Fetten, Proteinen, Mineralien und Enzymen (Firma Resorba, Nürnberg). Nach Dissoziation der Kollagenfasern folgte das Überführen des Materials in eine flüssige Form. In dieser flüssigen Phase wurden an der bekannten ED₅₀ orientierte Mengen rekombinant humanes VEGF₁₆₅ zugeführt (Firma R&D Systems, Wiesbaden). Diese Emulsion wurde anschließend in eine halbkugelige Form mit einem Durchmesser von 5mm überführt. Zur Minderung des Abbaus dieser Applikationsform wurde Aldehydlösung zur Rekonstitution des Crosslinkings der Kollagenfibrillen beigemischt. Die Produktion dieses Kombinationssystems fand unter konstant neutralen pH-Wert und konstanter Temperatur statt. Die Gesamtmenge des Kollagens pro Applikation betrug 5,6mg/cm³. Das VEGF₁₆₅ lag in den drei Gesamtmengen 0,8µg, 10µg und 80µg vor. Die Lagerung war für zwei Wochen bei einer Temperatur von -28°C in physiologischem Milieu möglich. Die Kollagenblöcke wurden in trockener Form in sterilen Umverpackungen ohne Unterbrechung der Kühlkette angeliefert und innerhalb des obigen Zeitfensters in der Studie verwendet.

2.2. Versuchsaufbau Kreislaufpumpe

Für die Durchführung der Versuche wurde ein pumpengestütztes geschlossenes Kreislaufsystem verwendet welches die biophysikalischen Parameter möglichst physiologisch imitieren sollte. Die elektrisch betriebene Pumpe (Cole Parmer Masterlex Console Drive Pumpe) (Abbildung 4) förderte durch walzenförmiges Auspressen (Abbildung 5) der flexiblen Schlauchverbindung aus Poly-TetraFlour-Ethylen (PTFE) die wässrige Lösung des Versuchsaufbaus mit einer durchschnittlichen Flowrate von 27 ml/min. Die wässrige Lösung bestand aus 0,2 molaren Sörensenpuffer (PBS-Puffer) mit

einem Gesamtvolumen von 80 ml. Die Pufferlösung wurde ohne Lufteinschlüsse in das Kreislaufsystem eingebracht. Ähnlich einen Blutkreislauf durchströmte die Lösung eine Perfusionskammer aus Teflon-PFA (Tetrafluorethylen-perfluoralkyloxyvinyl-Äther) mit einem Rückhaltesieb (Abbildung 6). In der Kammer befand sich das Kombinationssystem Kollagen-VEGF. Die Versuchsbedingungen wiesen eine konstante Temperatur von 20°C und einen konstanten Durchfluss des Systems unter Lichtabschluss auf. Die Pufferlösung wurde regelmäßig mit einem pH-Meter kontrolliert und zeigte sich konstant bei pH 7,2. Die Auswahl des Materials erfolgte unter dem Aspekt der geringen Adsorptionseigenschaft von PTFE und PFA gegenüber Proteinen.



Abbildung 4: Pumpe mit Schlauchsystem

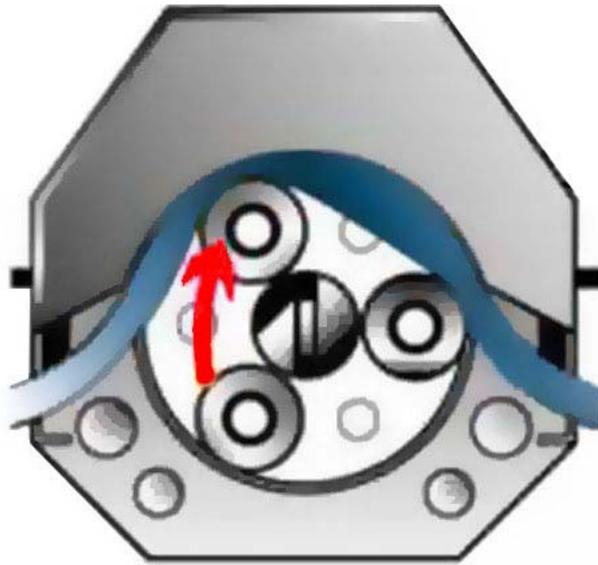


Abbildung 5: Roller-Pump-Prinzip



Abbildung 6: Pumpenkammer

2.3. Versuchsprotokoll

Das Kombinationssystem Kollagen-VEGF lag in drei Gruppen mit unterschiedlichen Zytokin-Konzentrationen vor: 0,8µg, 10µg und 80µg. Pro Gruppe wurden je drei Komplexe über fünf Tage im Kreislaufpumpensystem inkubiert. Das Gesamtvolumen der Pufferlösung wurde nach definierten Zeiträumen entnommen. Hier wurde auf eine asymmetrische Verteilung der Entnahmezeitpunkte mit Betonung der ersten acht Stunden geachtet um den initialen Degradationsvorgang der Kollagenblöcke engmaschig darstellen zu können. Die späteren Entnahmezeitpunkte ab dem zweiten Tag sollten langfristige Sättigungseffekte einbeziehen. So wurden pro Kollagenblock elf Proben der Pufferlösung entnommen und aufbereitet.

Ablaufschema der Probeentnahmen:

- | | | |
|---------------|--------|--------|
| - 30 Minuten | } | 1. Tag |
| - 1 Stunde | | |
| - 2 Stunden | | |
| - 4 Stunden | | |
| - 8 Stunden | | |
| - 12 Stunden | | |
| - 24 Stunden | | |
| - 48 Stunden | | |
| - 72 Stunden | 3. Tag | |
| - 96 Stunden | 4. Tag | |
| - 120 Stunden | 5. Tag | |

Die Pufferlösung wurde bei jeder Entnahme komplett erneuert um einer Sättigung der Pufferlösung mit freigesetzten VEGF₁₆₅ entgegen zu wirken. Von der Probe wurden zwei Milliliter bei -196°C in flüssigen Stickstoff eingelagert und bis zur weiteren Aufbereitung gesammelt. Nach der 120-Stunden-Probeentnahme wurde der Kollagenkomplex entnommen und halbiert. Auch diese Proben wurden bis zur weiteren Untersuchung in flüssigen Stickstoff gelagert.

Als Leerproben wurden VEGF-freie Kollagenblöcke in gleicher Weise in der Kreislaufpumpe inkubiert und aufbereitet.

Zur Darstellung der Stabilität des Zytokins VEGF wurde der natürliche Abbau unter Zimmertemperatur in Pufferlösung in einem inerten Polypropylen-Reagenzröhrchen gesondert getestet. Dieser Bestimmung wurde dreimal wiederholt, die Entnahmezeitpunkte waren mit den Zeitpunkten im obigen Hauptversuch identisch.

Die Überlagerung des obigen Hauptversuches mit der natürlichen Abbaurrate des VEGFs konnte in einen zusätzlichen Probendurchlauf mit einem 10 μ g-Kollagen analysiert werden. Hier wurde über 10 Stunden jeweils halbstündlich eine Probe entnommen.

2.4. Analysemethoden

2.4.1. ELISA (Enzyme Linked Immunoabsorbant Assay)

Die VEGF-Konzentration in den gewonnenen Proben wurde nach dem Auftauen mithilfe eines ELISA-Testes bestimmt (RDI, Research Diagnostics Inc., ELISA-Kit mit 96 Kammern für VEGF₁₆₅).

Die Proben, Standards und eine Nullprobe wurden in die Kammern des ELISA-Kits pipettiert und inkubiert. Hier kam es zu einer Reaktion mit den Kammern gebundenen VEGF₁₆₅ – Antikörpern (Verkettung). Nach mehreren Waschzyklen folgte die Zugabe eines farbmarkierten polyklonalen Antikörpers zur Markierung der VEGF-Antikörper-Komplexe (siehe Abbildung 7). Durch erneutes Auswaschen wurden alle ungebundenen Antikörper entfernt und nach Applikation einer Substratlösung folgte eine Farbreaktion. Die Stärke der Farbreaktion war mittels eines Photometers quantifizierbar und ihre Stärke stellte sich proportional zur Konzentration in der Probe dar.

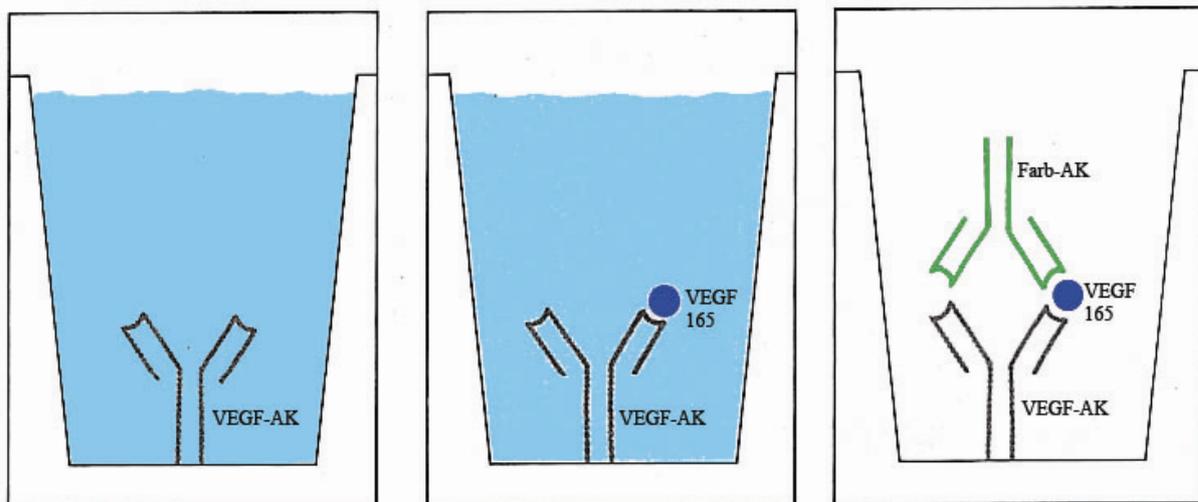


Abbildung 7: Ablaufschema ELISA

Die VEGF-Konzentration abhängige Färbung der Substratlösung wurde in einem Spektral-Plattenphotometer (Molecular Devices) bei 415nm Wellenlänge gegen die Standardproben gemessen. Es zeigte sich eine sigmoidale Kurvenform in halb-logarithmischer Darstellung, wobei auf der x-Achse der natürliche Logarithmus der Konzentration der Eichproben und auf der Y-Achse die optische Absorption (=Extinktion) aufgetragen war.

Um eine lineare Regression berechnen zu können, musste man diese sigmoidale Kurve linearisieren. Unter Beibehaltung x-Achse wurde die y-Achse in Logit-Werte umgerechnet. Hierfür wurde folgende Berechnung durchgeführt:

$$n = \frac{w - u}{o - u}$$

Der Normalwert n wurde aus der Absorption w und der unteren und oberen Asymptote u und o berechnet. Der Logit-Wert L konnte aus der Umkehrfunktion

$$w = u + n \times (o - u)$$

und der Logit-Gleichung

$$L = \ln\left(\frac{n}{1-n}\right) \quad \text{berechnet werden.}$$

Die Umkehrfunktion
$$n = \frac{e^L}{1 + e^L}$$

Die Werte-Paare der Logit-Darstellung aus dem x-Wert (natürlicher Logarithmus der Konzentration) und dem y-Wert (Logit der normalisierten Absorptionen) gingen dann in die Berechnung der linearen Regression ein. Diese lieferte dann die Höhe a und die Steigung b der Geraden.

$$y = a + b \times x$$

Nach Auflösung nach x konnte für die Interpolation von unbekanntem Messwert die so erstellte Eich-Kurve genutzt werden. Die höchste Genauigkeit wurde in der Nähe des in der Mitte der Sigmoiden liegenden Wendepunktes erreicht, weil an dieser Stelle ihre Steigung am größten ist. Die geringste Genauigkeit entstand in der Nähe ihrer Asymptoten.

Die Sensibilität des Testes lag bei 9 pg/ml und der Messbereich betrug 31,2 bis 2000 pg/ml VEGF in der Probenlösung.

2.4.2. Lichtmikroskopische Darstellung

Für die lichtmikroskopische Darstellung wurden die Kollagenproben in vierprozentiger Paraformaldehydlösung für 4 Stunden fixiert. Es folgte dreimaliges Spülen in 0.1 molaren PBS-Puffer bei physiologischem pH-Wert von 7,4. Zur Entwässerung der Kollagenproben wurde eine aufsteigende Ethanolreihe mit den Konzentrationen 50%, 70%, 90% und 96% jeweils über 24 Stunden inkubiert. Anschließend inkubierten die Proben in 100% Isopropanol nochmals über 24 Stunden zur kompletten Verdrängung des wässrigen Milieus.

Die Einbettung der Kollagenproben erfolgte in flüssiges Paraffin bei 60°C für 24 Stunden mit anschließendem Erkalten der Paraffinblöcke innerhalb von 12 Stunden. Mit einem Mikrotom wurden aus den Paraffinblöcken repräsentative Anschnitte der Kollagenproben angefertigt und auf Glasobjektträger aufgebracht.

Es folgte die Azan-Färbung [Romeis 1989] nach folgender Rezeptur:

1. Zweimaliges Einwirken für zehn Minuten in Xylol
2. Zweimaliges Einwirken für zehn Minuten in 100% Isopropanol
3. Zweimaliges Einwirken für zehn Minuten in 96% Alkohol
4. Einmaliges Einwirken für fünf Minuten in Celloidin-Äther
5. Einmaliges Einwirken für zehn Minuten in 70% Alkohol
6. Einmaliges Einwirken für zehn Minuten in Aqua dest.
7. Einmaliges Einwirken für zehn Minuten in Azocarmin bei 60°C
8. Einmaliges Einwirken für zwei Minuten in Aqua dest.
9. Einmaliges Einwirken für zwei Minuten in Anilinöl-Alkohol
10. Einmaliges Einwirken für zwei Minuten in Eisessig-Alkohol
11. Viermaliges Einwirken für zehn Minuten in 5% Phosphorwolframsäure
12. Einmaliges Einwirken für zehn Minuten in Aqua dest.
13. Einmaliges Einwirken für zehn Minuten in Anilinblau-Orange G
14. Einmaliges Einwirken für zwei Minuten in Aqua dest.
15. Einmaliges Einwirken für zwei Minuten in 50% Alkohol
16. Einmaliges Einwirken für zwei Minuten in 70% Alkohol
17. Einmaliges Einwirken für fünf Minuten in 96% Alkohol (I)
18. Einmaliges Einwirken für zehn Minuten in 96 % Alkohol (II)
19. Zweimaliges Einwirken für zehn Minuten in 100% Isopropanol (I/II)
20. Einmaliges Einwirken für zehn Minuten in Carboxyxylo
21. Zweimaliges Einwirken für zehn Minuten in Xylol (I/II)

Am Ende wurde das Präparat mit Metacrylat in einem Schutzglas eingebracht und anschließend getrocknet. Nach der Färbung mit Azan folgte die Endfixierung der Schnitte wie oben beschrieben in Metacrylat. In dieser fixierten Form konnten die Schnitte bei Raumtemperatur gelagert werden.

Mit einem handelsüblichen Lichtmikroskop (Zeiss Jena Axioscop) wurden alle Schnitte durchgemustert und exemplarische Regionen photodokumentiert. Eine qualitative Einteilung der verschiedenen Proben nach Entnahmezeitpunkt und VEGF-Konzentration wurde vorgenommen.

2.4.3. Elektronenmikroskopische Darstellung

2.4.3.1. Native Rasterelektronenmikroskopie

Die Fixierung für die Rasterelektronenmikroskopie erfolgte primär mit dreiprozentiger Glutaraldehydlösung bei 4°C über vier Stunden unter Lichtausschluss. Dies sollte der Schrumpfung beim anschließenden Trocknen der Präparate entgegenwirken. Nach dreimaliger Spülung mit 0,1 molarem PBS-Puffer (Phosphate Buffered Saline der Firma Sigma) bei physiologischen pH-Wert von 7,4 über 30 Minuten entwässerten die Proben in aufsteigender Alkoholreihe. Wie in der Lichtmikroskopie wurden die Konzentrationen 50%, 70%, 90%, 96% Ethanol mit abschließenden 100%iger Isopropanol für jeweils 24 Stunden verwendet.

Für die Elektronenmikroskopie musste die Probe nicht nur trocken sondern auch elektrisch leitfähig sein. Um dies zu erreichen wurden die Proben mit Metallen bedampft, was auch „Besputtern“ genannt wird. Es handelt sich dabei genauer gesagt um eine Kathodenzerstäubung mit einer Gold-Palladium-Legierung oder mit Kohle. Wir verwendeten Kohle mit einer Schichtdicke von zehn Nanometern.

Nun mussten die Proben komplett getrocknet werden. Um eine Schrumpfung zu verhindern wurde die Kritisch-Punkt-Trocknung verwendet: Die in 100 % Aceton befindlichen Präparate wurden unter Luftabschluss in geeignete Probenhalter übertragen. In einer Proben-Druckkammer wurden diese Halter auf 9 °C heruntergekühlt und anschließend das Medium Aceton mit dem flüssigen Medium CO₂ ausgetauscht. Dies wurde solange wiederholt, bis kein Aceton mehr in der Kammer enthalten ist (in der Regel sieben Waschvorgänge). Danach wurde die Kammer auf eine Temperatur von 40 °C erhitzt. Bei einer Temperatur von 31 °C und einem Druck von 73,8 bar war der kritische Punkt für CO₂ erreicht und schlug abrupt von flüssig auf gasförmig um. Temperatur und Druck sollten noch weiter erhöht werden, um Feuchtigkeitseffekte bei zu schnellem Gasablassen zu vermeiden. Anschließend wurde das Gas kontrolliert langsam abgelassen und die Präparate konnten entnommen werden. Die trockenen Präparate wurden anschließend in einem feuchtigkeitsgeschütztem Exsikkator aufbewahrt.

2.4.3.2 Immunologische Darstellung des VEGF in der Rasterelektronenmikroskopie

Für die immunhistologische Auswertung erfolgte die Fixierung des Präparates für 30 Minuten bei vier °C in vierprozentiger Paraformaldehydlösung. Nach dreimaligen Spülen mit 0,1 molaren PBS-Puffer folgte die Inkubation mit monoklonalen Primärantikörpern Anti-VEGF₁₆₅ für eine Stunde bei Raumtemperatur. Durch dreimalige Spülung mit PBS-Puffer wurden die nicht gebundenen Antikörper entfernt. Der zweite Antikörper (spezifisch für den obigen IgG-AK) war mit einem zehn Nanometer großem Goldpartikel markiert und wurde bei Raumtemperatur eine Stunde mit dem Präparat inkubiert. Nach erneuter dreimaliger Spülung mit PBS-Puffer folgte die Stabilisierung des Präparates mit 2,5 prozentiger Glutaraldehydlösung für 15 Minuten bei vier °C (Quervernetzung). Eine aufsteigende Alkoholreihe dehydrierte nun das Präparat so dass eine Beschichtung des Kollagenblocks mit Kohle möglich wurde (Bespatterung mit 8nm Schichtdicke).

In dieser Form konnte nun die Untersuchung mit Photodokumentation im Rasterelektronenmikroskop erfolgen. Die Goldpartikel identifizierten sich als kugelförmige Gebilde von zehn Nanometern Größe im Sichtfeld des Betrachters.

2.4.3.3. Immunologische Darstellung des VEGF in der Transmissionselektronenmikroskopie

Für die Transmissionselektronenmikroskopie wurden die Proben für 24 Stunden bei Raumtemperatur in dreiprozentiger Glutaraldehyd fixiert, anschließend dreimalig mit PBS-Puffer über 30 Minuten gespült und für eine Stunde in einprozentiger Osmiumsäure inkubiert. Es folgte eine erneute Spülung mit PBS-Puffer (3x30 Minuten) und eine anschließende Entwässerung der Probe in aufsteigender Alkoholreihe (jeweils 3x30 Minuten). Zur Fixierung wurde das Kollagen in Araldit eingebettet und in ein Mikrometer starke Slices geschnitten.

Zur besseren Beurteilbarkeit folgte die Färbung der Slices mit Toluidinblau. Nach einer Übersicht im Lichtmikroskop wurden exemplarische Regionen festgelegt und der Aralditblock durch Trimmen verkleinert. Anschließend wurden mit einem

Ultramikrotom Dünnschnitte von 70 Nanometern erstellt. Diese wurden auf Kupfernetze platziert und im Transmissionsmikroskop untersucht.

Die immunologische Markierung folgte nach nativer Untersuchung nach dem im Abschnitt 2.4.3.2. angegebenen Ablauf mit Anti-VEGF165- und goldmarkierten Anti-IgG-Antikörpern. Die Goldpartikel stellten sich optisch als kugelförmige dunkle Areale im Präparat dar.

3. Ergebnisse

3.1. Die Halbwertszeit des VEGF₁₆₅

Drei Proben von freien VEGF wurden zur Ermittlung des natürlichen Zerfalls des Zytokins untersucht. Der natürliche Zerfall des freien VEGF₁₆₅ in wässriger Lösung unter Raumtemperatur zeigte in graphischer Darstellung folgendes Bild (Abbildung 8):

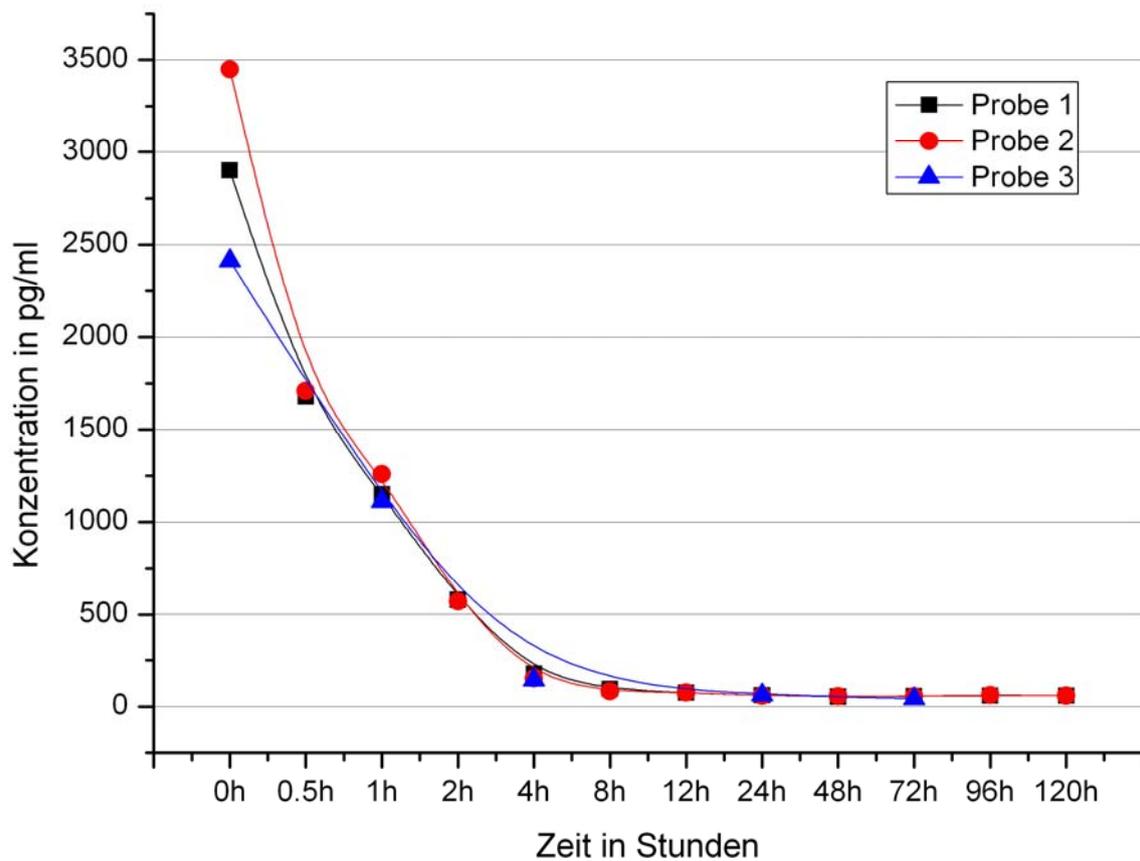


Abbildung 8

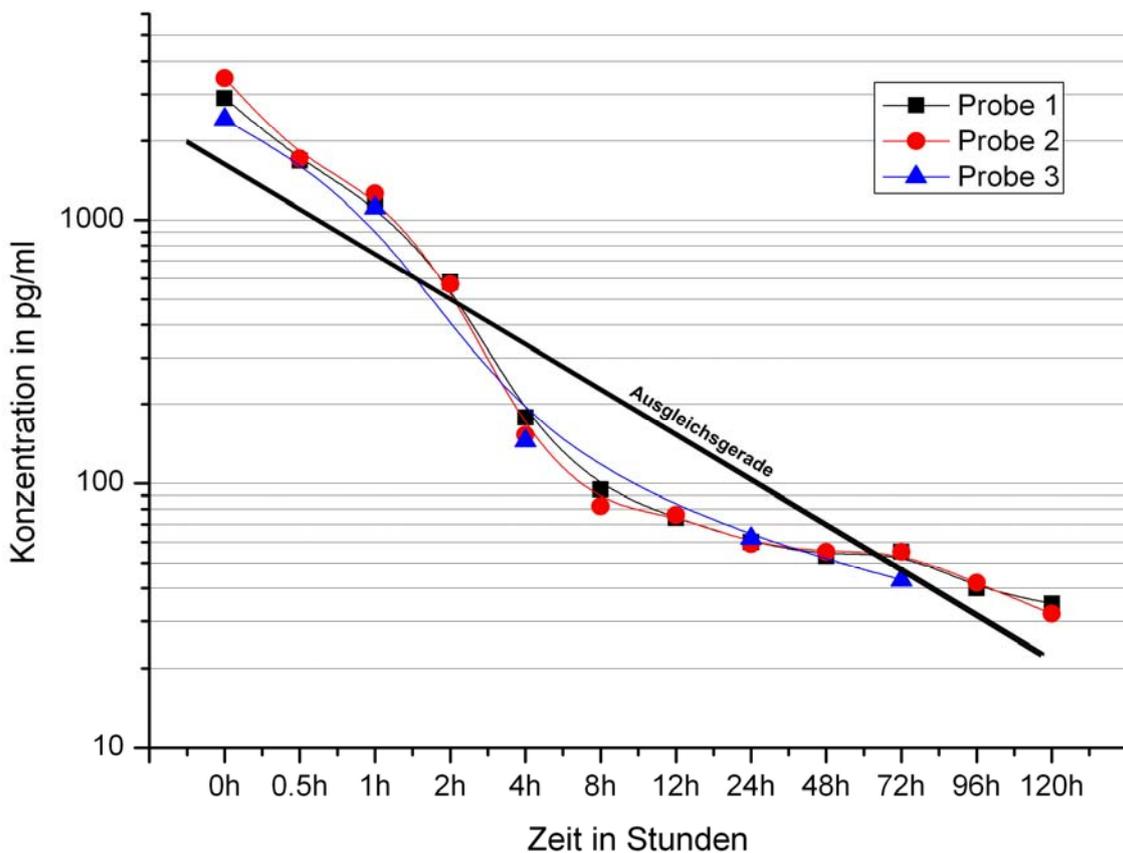


Abbildung 9

Für die mathematische Quantifizierung des natürlichen Zerfalls des VEGFs sollte die Halbwertszeit bestimmt werden. Die biologische Halbwertszeit $t_{1/2}$ bezeichnet die Zeitspanne, in welcher in einem biologischen Organismus die Konzentration einer inkorporierten Substanz durch biologische oder physikalische Prozesse auf die Hälfte abgesunken ist.

Die oben genannte Konzentrationsreihe wurde logarithmisch gegen die Zeit in Abbildung Nr 9 aufgetragen. Zur Erleichterung wurde eine Ausgleichsgerade eingefügt. Anschließend lies sich über das Gefälle der Ausgleichsgeraden eine Halbwertszeit des VEGF₁₆₅ von **$t_{1/2} = 90$ Minuten** bestimmen.

Die unregelmäßigen Entnahmezeitpunkte können eine Fehlerquelle darstellen, weil der natürliche Zerfall bei den Probenentnahmen in den späteren Abschnitten das Ergebnis verfälscht. Zur Verifizierung dieser Fehlerquelle wurden ein Kollagenblock mit 10 μg VEGF im Versuchsaufbau engmaschig über 12 Stunden untersucht und die Messwerte gegen die bereits vorhandenen Kurven der 10 μg -Proben aufgetragen (Abbildung 10).

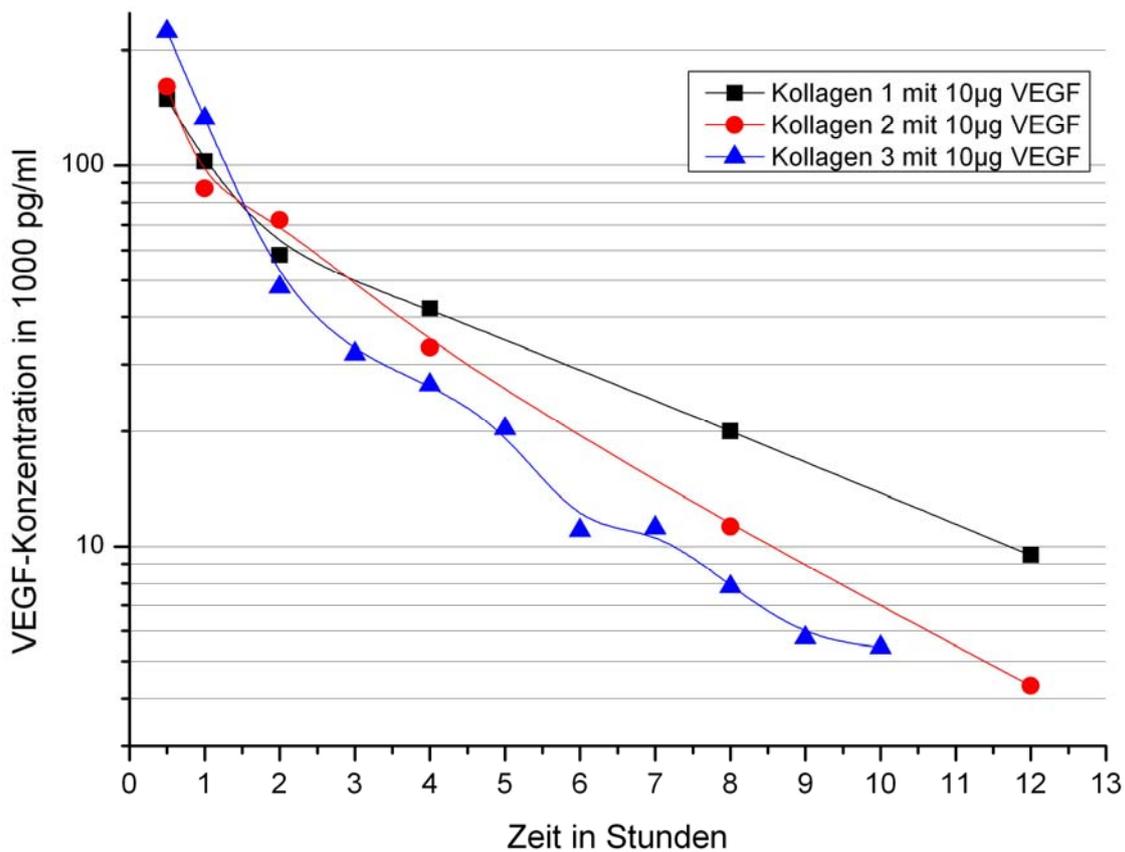


Abbildung 10

Hier zeigte sich eine konstante Differenz zwischen der engmaschigen Messung und der Messung im Hauptversuch. Durch die geringere Akkumulation des VEGFs bei weiteren Messabständen zeigte sich im Summationsbild des ausgewaschenen Zytokins ein annähernd konstanter Unterschied von 100 Nanogramm (Abbildung 11). Erklärbar war der Unterschied durch den konstant ablaufenden Zerfalls des VEGFs im Versuchsaufbau. Diese Messungenauigkeit lies sich durch ihre Konstanz leicht korrigieren, z.B. durch Addition der 100 Nanogramm im Hauptversuch.

So zeigte sich, dass der Einfluss der des Messfehlers durch größere Abstände zwischen den Messungen im späteren Versuchsablauf vernachlässigbar ist.

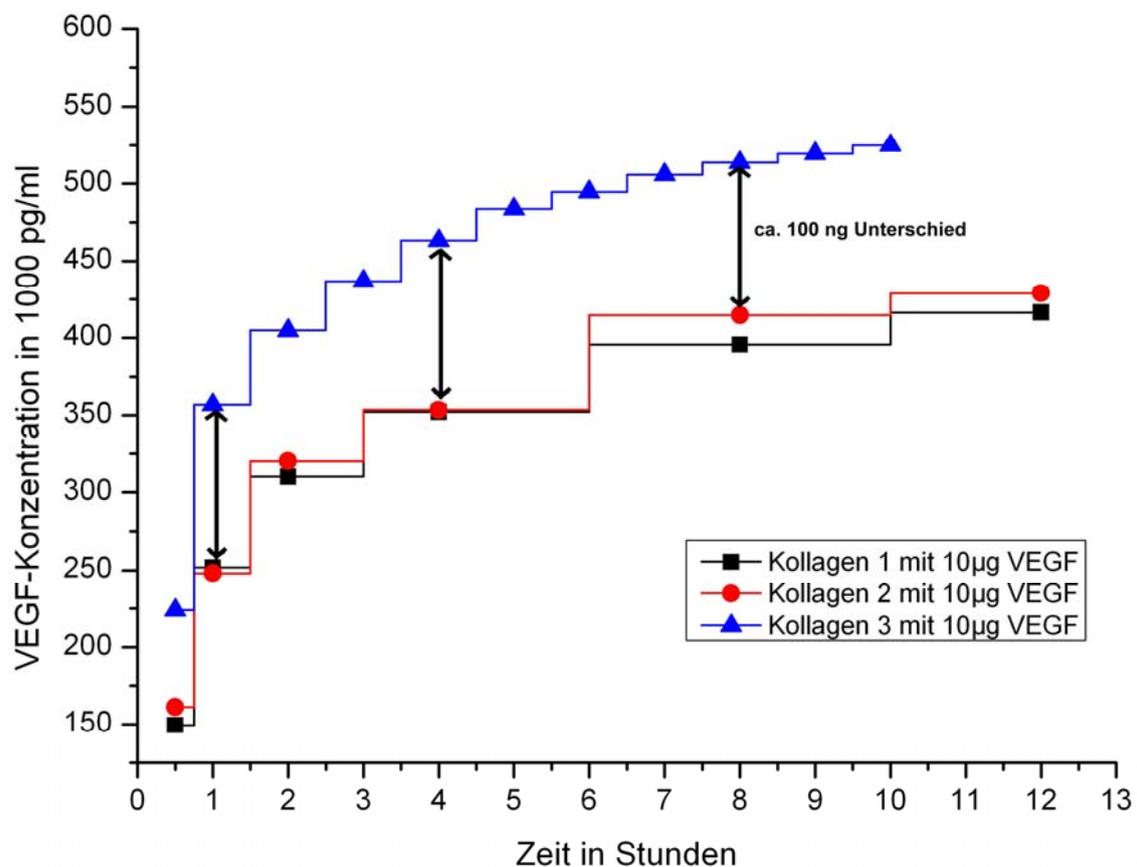


Abbildung 11

3.2. VEGF-Konzentrationen im Vergleich

Die drei Versuchsreihen mit den unterschiedlichen VEGF-Gesamtkonzentrationen von 0,8µg, 10µg und 80µg pro Kollagenblock wurden innerhalb jeder Gruppe gemittelt und in eine Konzentrations-Zeit-Kurve halblogarithmisch übertragen. Die jeweiligen Standardabweichungen und Mittelwerte wurden in das Diagramm integriert (Abbildung 12). Zusätzlich wurden die jeweiligen abgegebenen Gesamtmengen VEGF in ein Summationsdiagramm übertragen, in dem wieder Konzentration halblogarithmisch gegen die Zeit aufgetragen wurde (Abbildung 13). Es zeigte sich ein charakteristischer zeitlicher Verlauf der Degradation der Kollagenblöcke. Von der initialen höchsten Konzentration wiesen alle Gruppen einen abfallend linearen Verlauf in der halblogarithmischer Darstellung auf. Die Verläufe waren parallel und proportional zu den Differenzen der VEGF-Gesamtmenge und die Freisetzungskinetik stellte sich in allen drei Gruppen als konzentrationsunabhängig dar. Der Messfehler im Bereich der

Gruppen mit 0,8 μ g und 10 μ g VEGF waren vernachlässigbar gering, nur zeigte sich nach 48 Stunden die abgegebene VEGF-Menge als zu gering für die Testung dar. Hier war die Sensibilitätsgrenze der ELISA-Methodik erreicht.

Im Summationsbild (Abbildung 13) zeigte sich nach initialer starker Degradation des VEGF-Kollagen-Komplexes eine Plateaubildung nach ca. 12 Stunden Versuchsdurchlauf dar. Die Gesamtmenge des abgegebenen VEGFs steigerte sich nur noch geringfügig und in der Gruppen 0,8 μ g und 10 μ g zeigt sich nach 48 h die Sensibilitätsgrenze des ELISA-Testes erreicht. Sättigungseffekte im wässrigen Milieu des Versuchsaufbaus zeigten sich nicht.

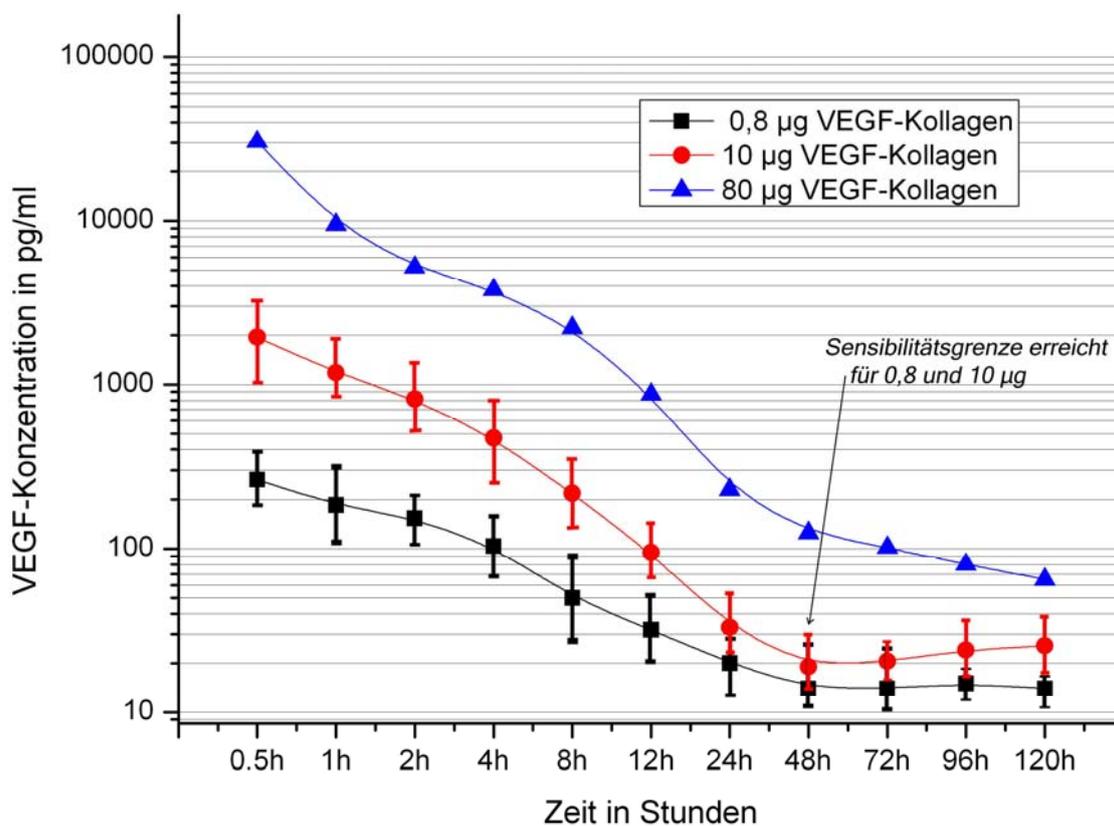


Abbildung 12

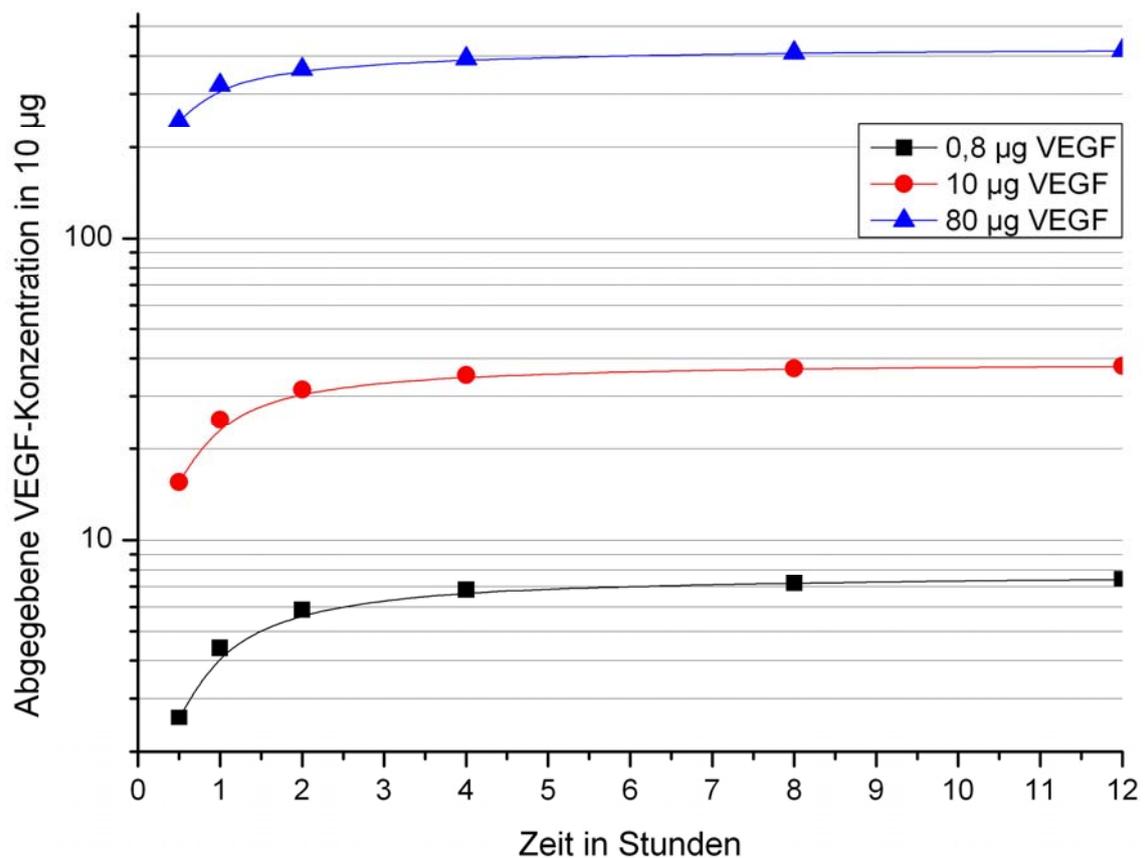


Abbildung 13

In der Abbildung 14 wurde die Effizienz der VEGF-Degradation aufgetragen. Die Effizienz stellt den prozentualen Anteil des im Versuch nachgewiesenen VEGFs gegenüber dem initial im Kollagenblock vorhandenen VEGFs dar. Es zeigte sich, dass vom 0,8µg VEGF nur zehn Prozent nachweisbar waren. 90% waren bereits bei der Herstellung oder dem Transport verloren gegangen. Bei den Konzentrationen 10µ und 80µg gingen sogar 96%, bzw. 97% verloren.

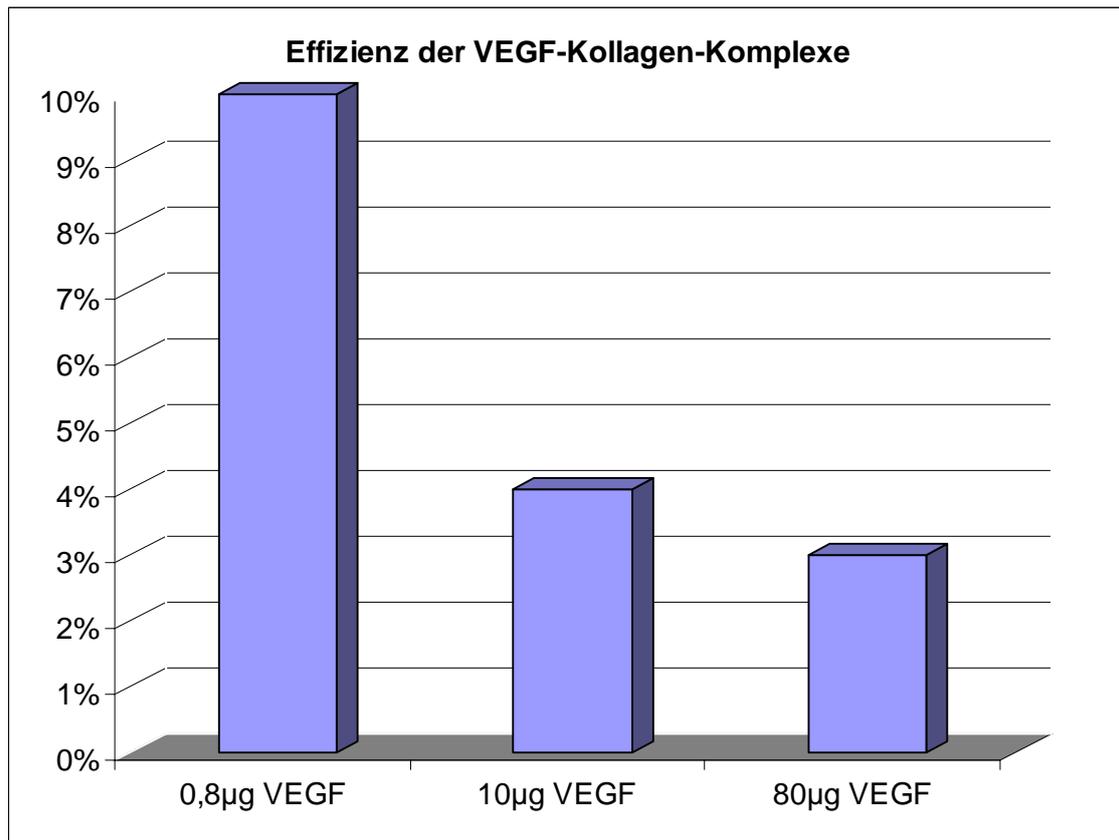


Abbildung 14

3.3. Histologie und Ultrastruktur

3.3.1. Lichtmikroskopie

Bei der lichtmikroskopischen Untersuchung wies der VEGF₁₆₅-Kollagen-Komplex netzartige Strukturen in den zentralen Anteilen auf (Abbildung 15). Teilweise zeigten sich Artefakte in Form von zusammengeballten retikulären Strukturen, welche am ehesten durch die Fixierung verursacht wurden. Die verwendete Azan-Färbung stellte Kollagenfasern blau und elastische Fasern rötlich dar.

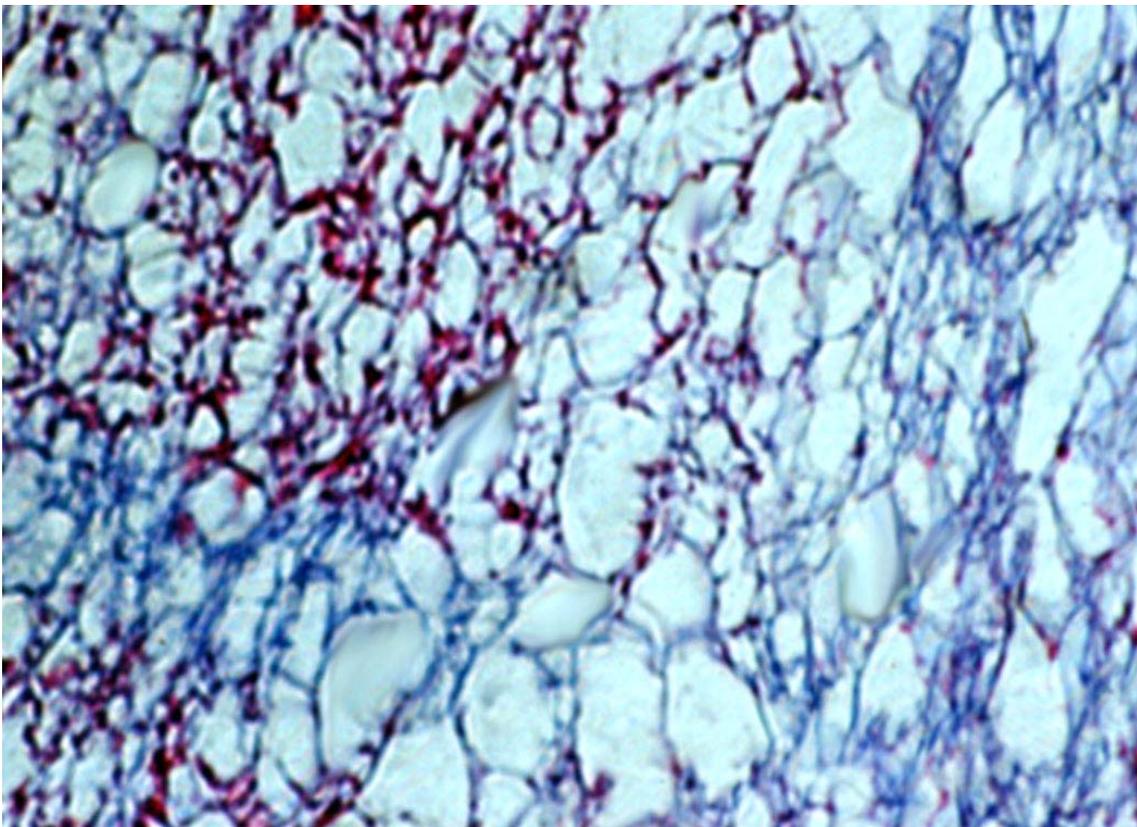


Abbildung 15: Kollagenmatrix, zentraler Bereich (100x) - Azan-Färbung

Im Randbereich der Kollagenblöcke stellten sich eher solide Ansammlung von Kollagenfibrillen dar, teils in Klumpen oder in Schuppen angeordnet (Abbildung 16). Hier sind Schrumpfungsfaktoren, z.B. durch Trocknung, bei der Herstellung des komplexierten VEGF₁₆₅-Kollagens als Ursache anzusehen.

Insgesamt stellte sich aber der Kollagenverbund im Übersichtsbild homogen und ohne strukturelle Schäden durch Herstellung oder Fixierung dar.

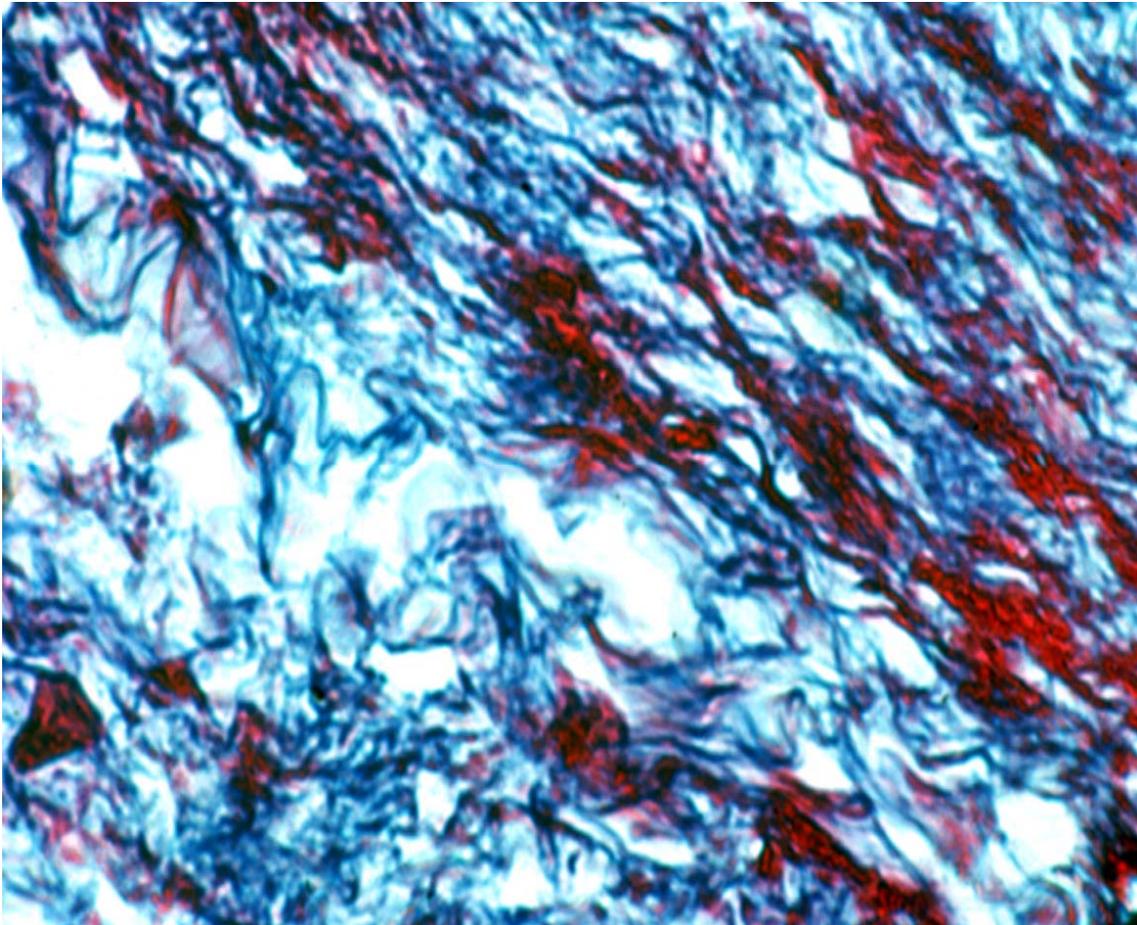


Abbildung 16: Kollagenmatrix, peripher (100x) - Azan-Färbung

3.3.2. Rasterelektronenmikroskopie

Im rasterelektronenmikroskopischen Bild zeigten sich ähnliche Verhältnisse wie in der Lichtmikroskopie: Im zentralen Präparatbereich stellte sich das Kollagen retikulärnetzartig dar, im peripheren Präparatrand lagen die Kollagenfibrillen verklumpt aneinander.

Ein Vergleich zwischen einem unbehandelten Kollagenblock (Abbildung 17) zu einem VEGF₁₆₅ beladenen Kollagenblock wiesen aber Unterschiede auf: Die periphere Außenfläche war deutlich kompakter als beim nativen Kollagen, teilweise zeigten auch

die zentralen Abschnitte des Kollagen mehr Verklumpungen auf (Abbildung 18). Hier musste der Komplexierungsprozeß zu einer vermehrten Verklebung von Kollagenanteilen geführt haben, so dass Schollen und Faserkonglomerate dominieren.

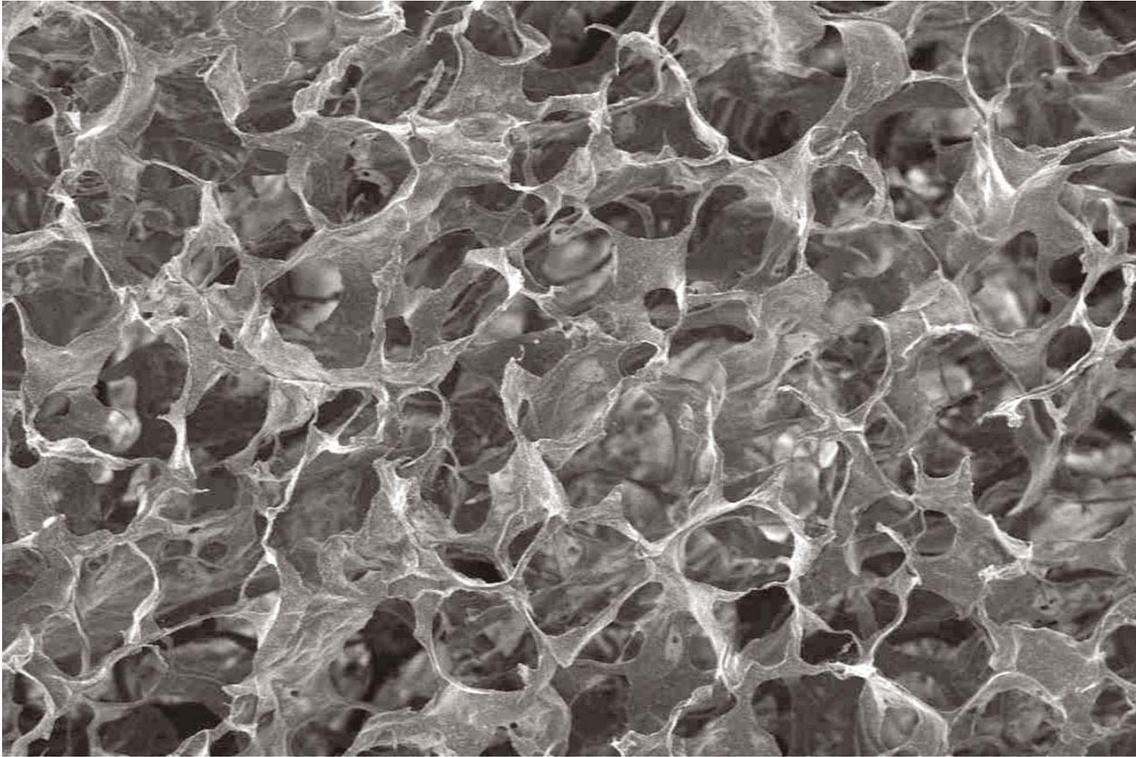


Abbildung 17: REM-Bild Kollagenmatrix ohne VEGF (100x)

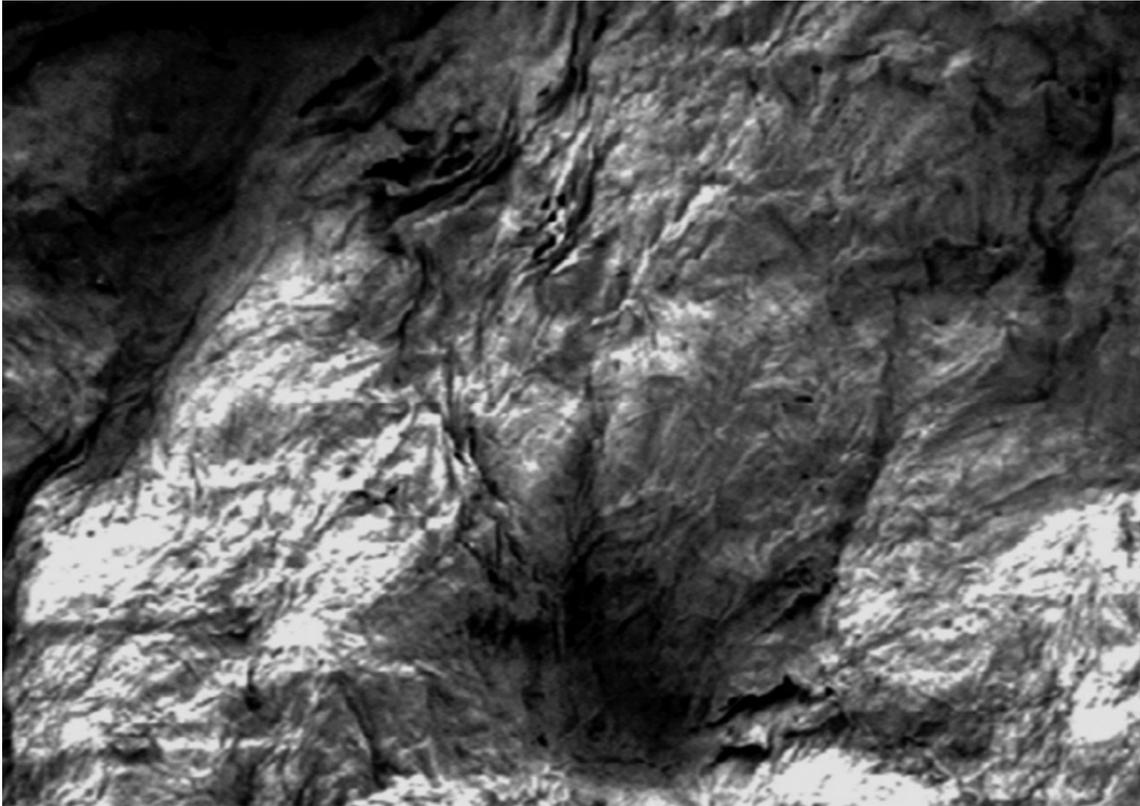


Abbildung 18: REM-Bild VEGF-Kollagenblock (100x)

Bei Betrachtung der Präparatoberfläche stellten sich Veränderungen im Versuchsverlauf dar. Während sich die Ultrastruktur des unbehandelten Kollagens im Verlauf von fünf Tagen im Medium nur unwesentlich änderte, zeigten die Strukturen des komplexierten Implantates einen deutlichen Wandel.

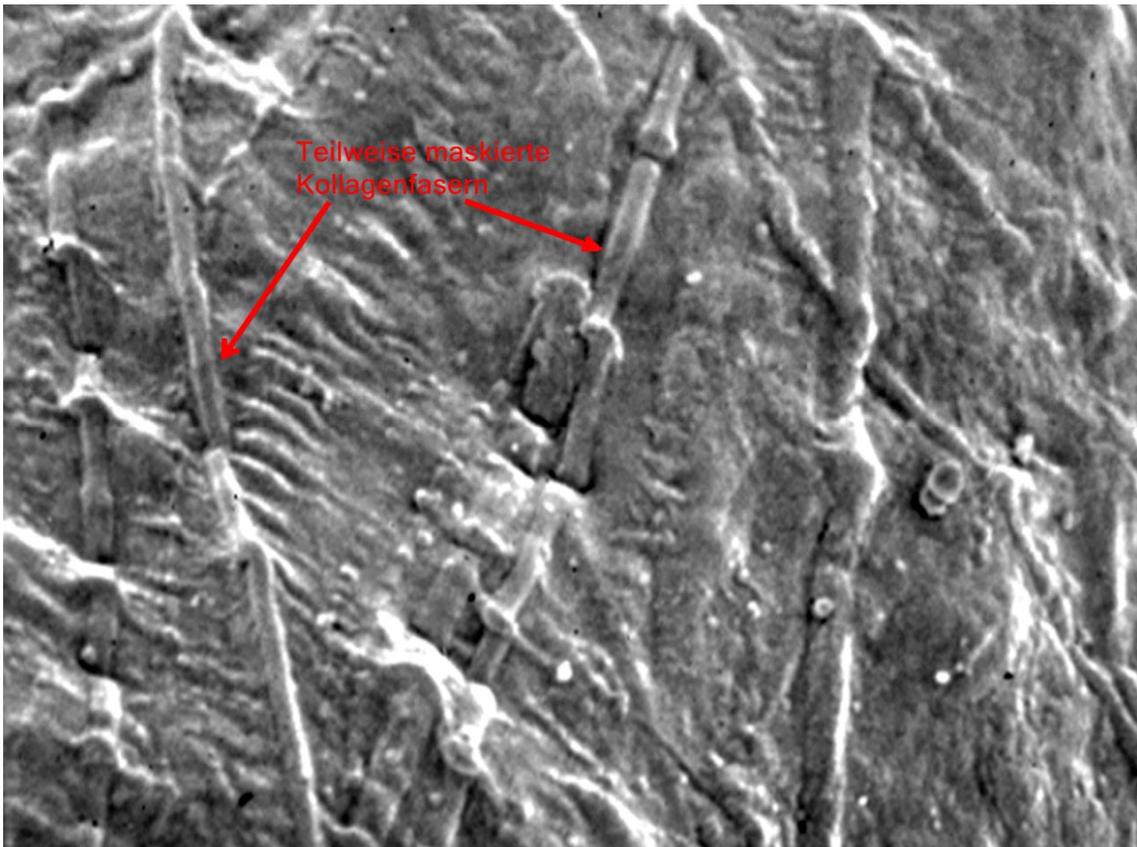


Abbildung 19: REM-Bild Peripherer Bereich des Kollagenblocks Tag 0 (20000x)

Vor der Verwendung im Kreislaufsystem zeigten sich im peripheren Bereich des Präparates nur einzelne Fasern, die wie mit einem Film belegt erschienen. So war auch die typische Querstreifung überdeckt und im Bild nicht sichtbar. Die Verklebung der Oberfläche zeigte sich homogen im gesamten Präparat und ist ein Hinweis auf den Komplexierungsvorgang während der Herstellung.

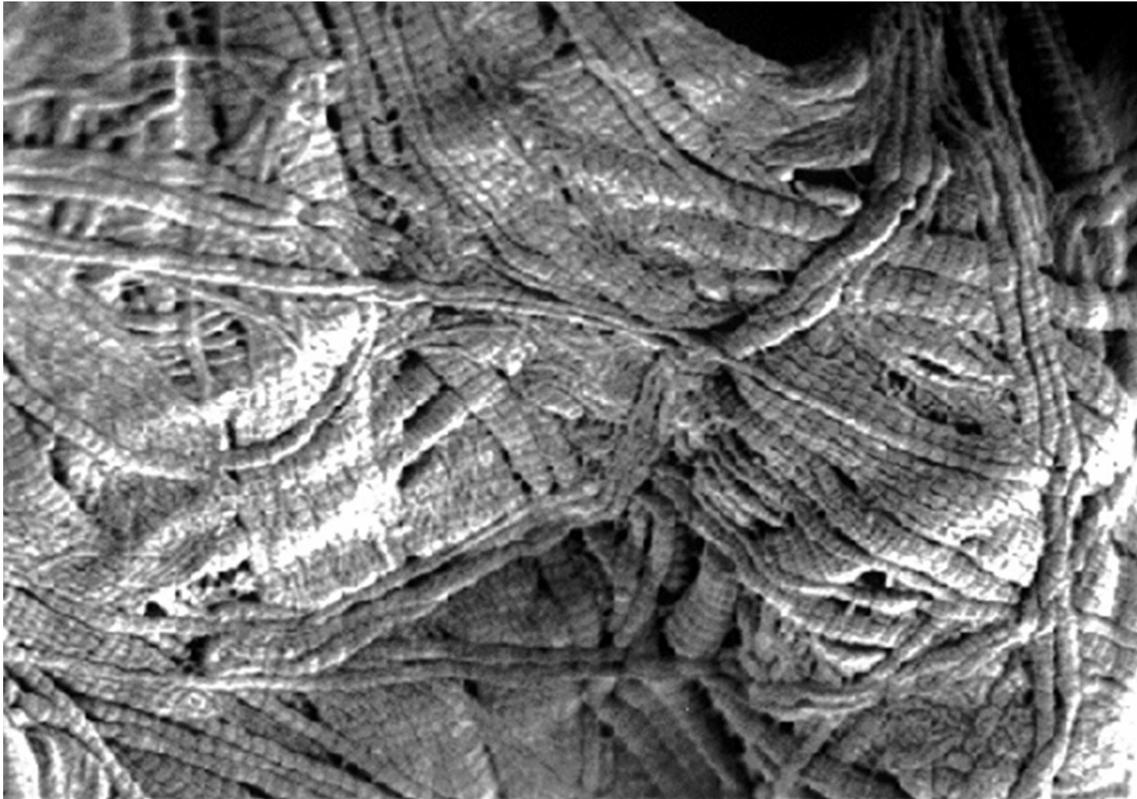


Abbildung 20: REM-Bild Peripherer Bereich des Kollagenblocks Tag 3 (20000x)

Nach dem Einbringen in die Versuchsanordnung und drei Tagen kontinuierlichem Durchlauf wurde ein Präparat identisch aufbereitet. In 20000facher Vergrößerung zeichneten sich nun einzelne Kollagenfasern schärfer ab. Der Filmüberzug zeigte sich teilweise dünner, teilweise komplett verschwunden. Die Querstreifung einzelner Kollagenfibrillen war erkennbar und das Gesamtbild erschien weniger homogen als beim frischen Präparat. Der Degradationsvorgang hatte deutliche Veränderungen am Präparat durch Auswaschung der Deckschicht verursacht (Abbildung 20).

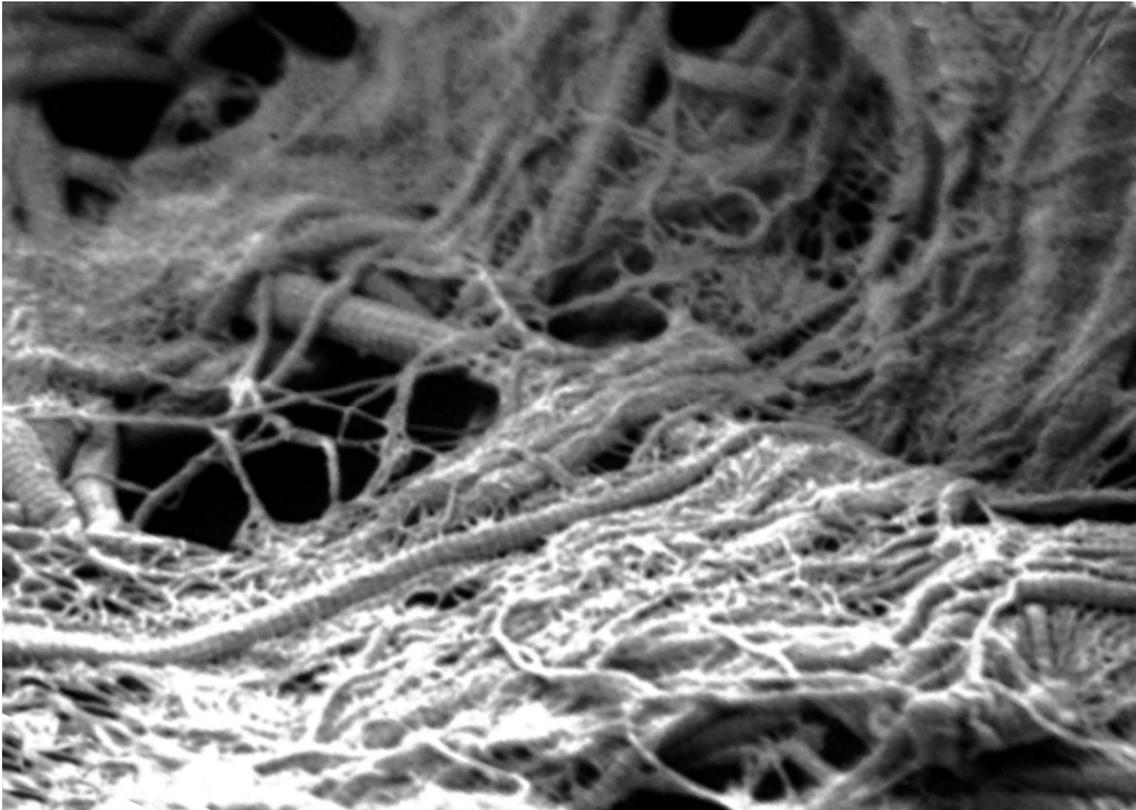


Abbildung 21: REM-Bild Peripherer Bereich des Kollagenblocks Tag 5 (20000x)

Nach fünf Tagen Versuchsdurchlauf zeigte sich der Effekt noch deutlicher. Durch die nahezu komplette Degradation der Deckschicht zeigten sich nun große Mengen Kollagenfibrillen frei flottierend, teilweise hatten sich auch die Verklebungen der Fasern untereinander gelöst. Zwischen den Fibrillenverbänden zeigten sich nun Poren unterschiedlicher Größe, die ein Eindringen der Pufferlösung in die Tiefe des Präparates ermöglichten (Abbildung 21). Makroskopisch zeigte sich der Kollagenblock zerfasert und porös.

Das Zytokin VEGF konnte auf den bisherigen Aufnahmen nicht beurteilt werden. Die Markierung der VEGF-Antikörper mit einem Goldpartikel ermöglichte den direkten morphologischen Nachweis des Antikörpers und somit indirekt des VEGFs im Präparat. Die zehn Nanometer großen rundlichen Goldpartikel präsentierten sich als helle Punkte im Bildmaterial.

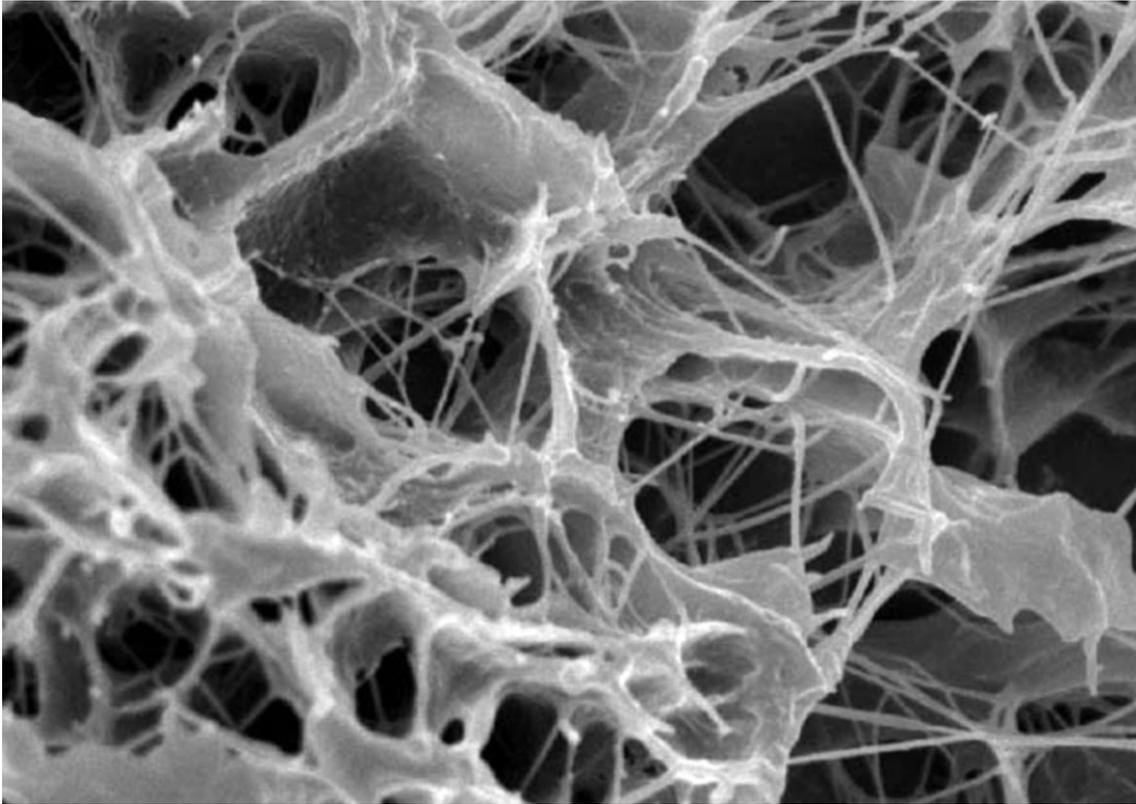


Abbildung 22: REM-Bild Retikuläre Struktur des Kollagenblocks (5000x)

In der Abbildung 22 ist ein unbehandeltes Kollagenpräparat dargestellt. Die retikuläre Struktur zeigte keine Hinweise auf Goldpartikel in Form von hellen Flecken.

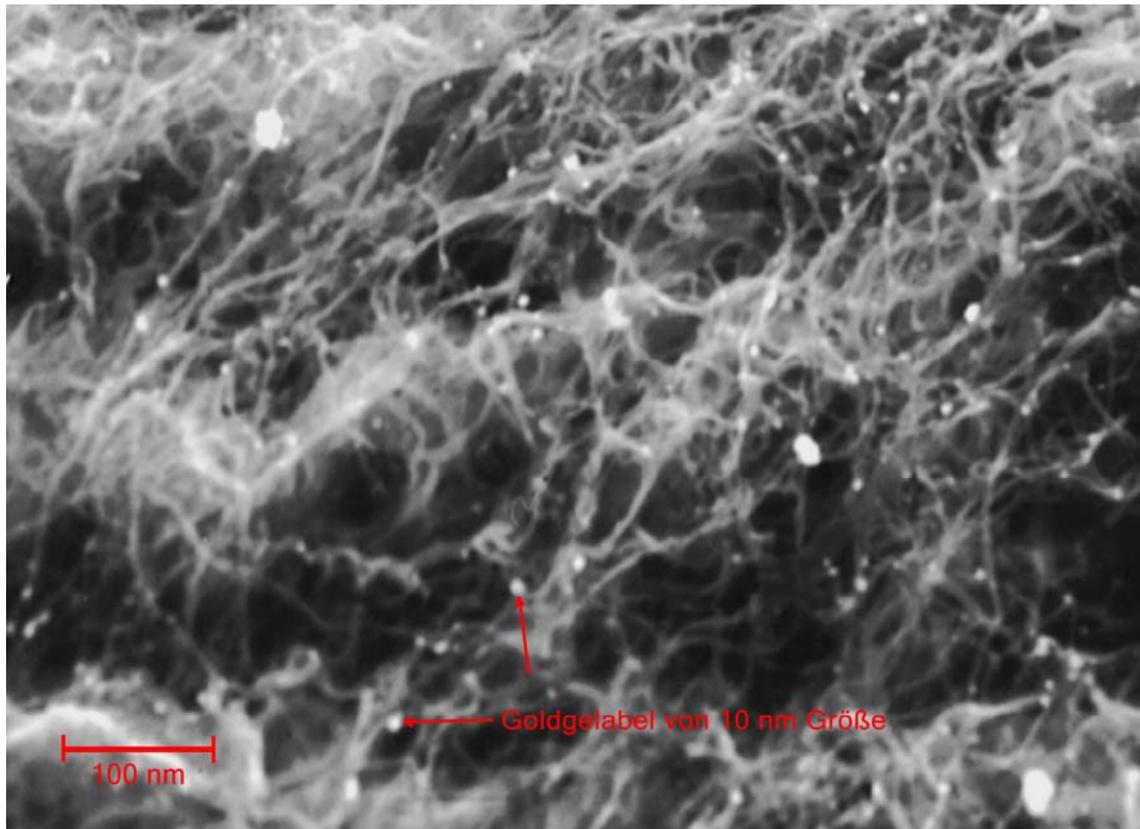


Abbildung 23: REM-Bild Kollagenblock mit 0,2 µg VEGF₁₆₅ (5000x)

Ein mit 0,2µg VEGF₁₆₅ komplexiertes Kollagenpräparat wird in Abbildung 23 dargestellt. Auffällig zeigten sich die mit Gold markierten VEGF-Antikörper als hell aufleuchtende, kugelförmige Strukturen von cirka 10 Nanometer Größe.

Ungeordnet lagen die Goldlabel im retikulären Kollagengewebe verteilt. Teilweise zeigten sie sich untereinander verklumpt, in der Mehrzahl standen die einzelnen Goldmarkierungen isoliert im Präparat. Insgesamt zeigte sich eine homogene Verteilung der Goldpartikel.

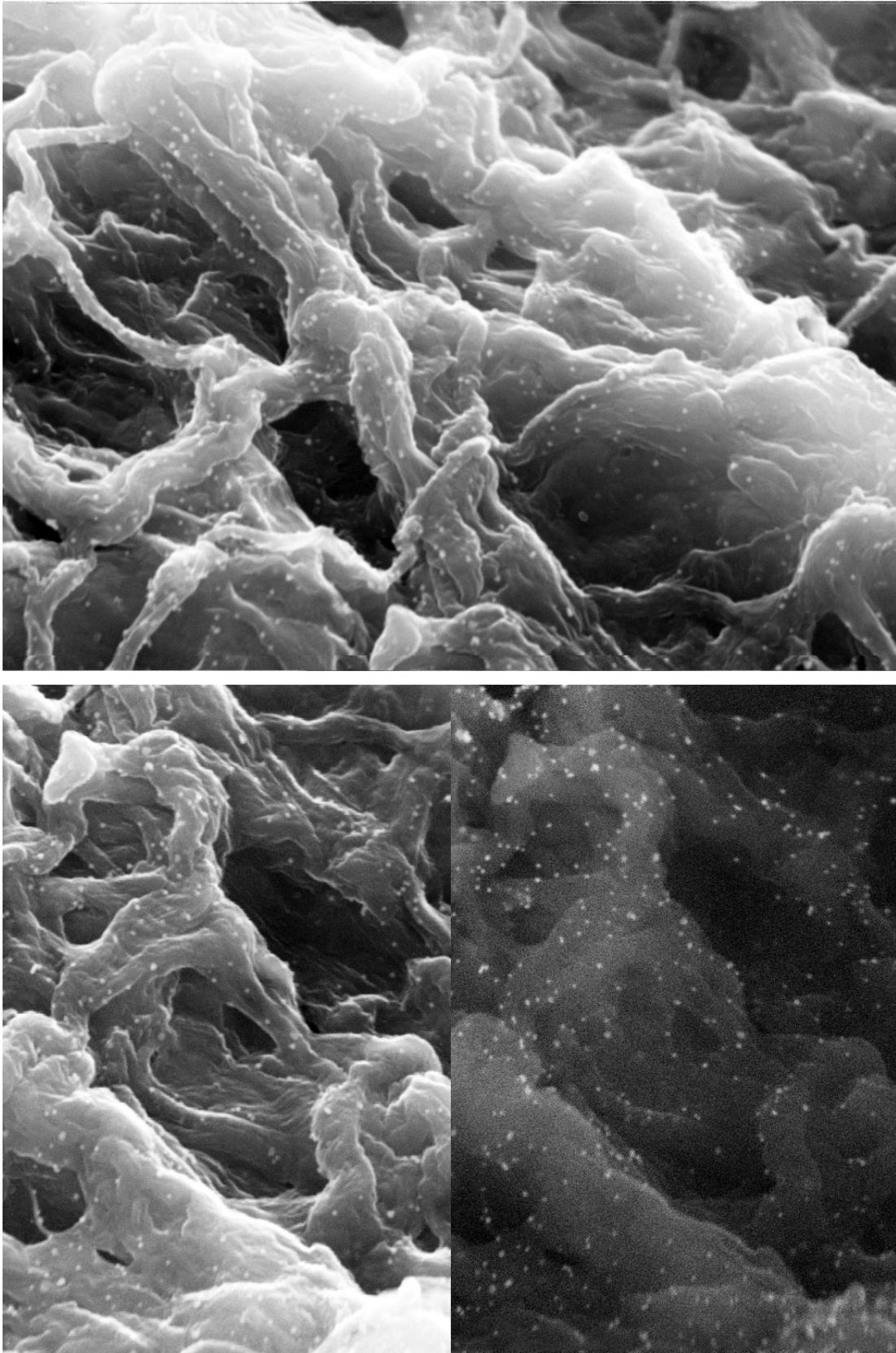


Abbildung 24 und 25: REM-Bild Kollagenblock mit 10 µg VEGF₁₆₅ (5000x)

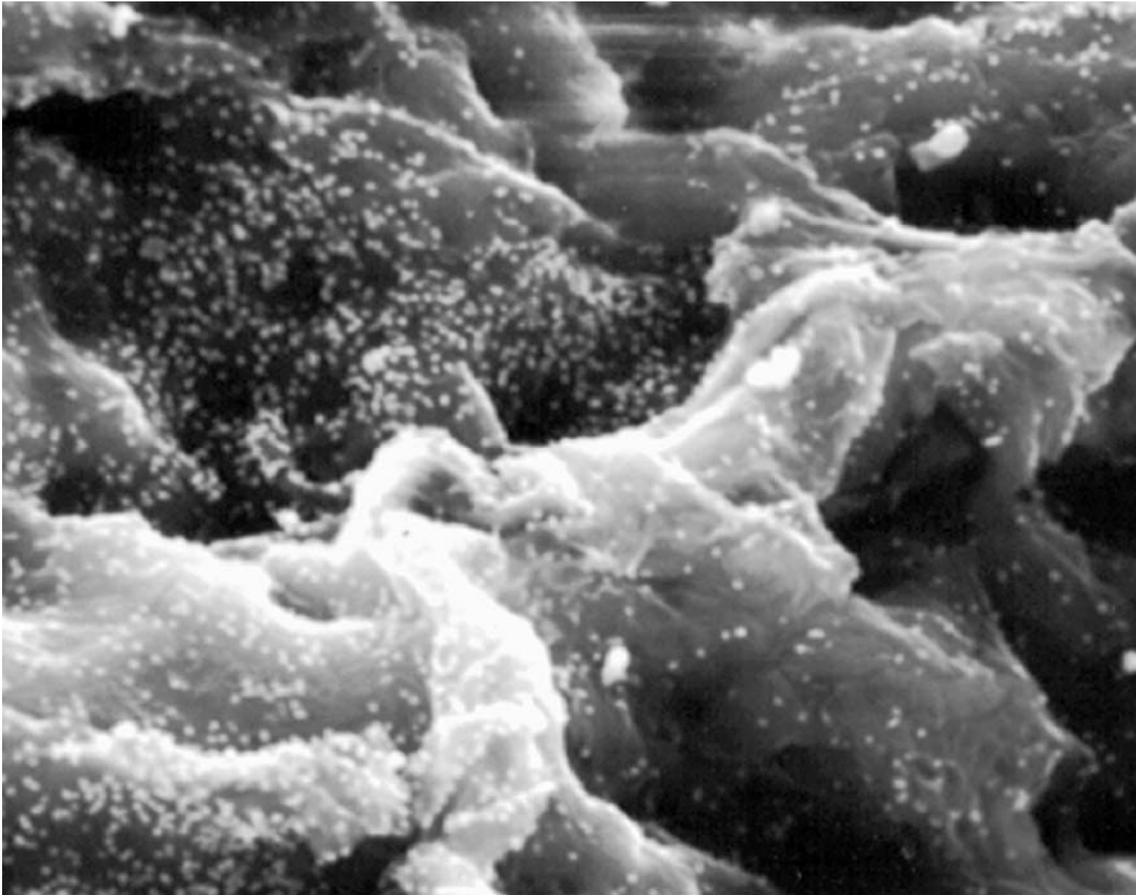


Abbildung 26: REM-Bild Kollagenblock mit 10 µg VEGF₁₆₅ (5000x)

Auf der Abbildung 24 bis 26 ist die Oberfläche eines Kollagenpräparates mit 10 µg VEGF₁₆₅ dargestellt. In Bild 25 ist zur Verdeutlichung des Aufleuchtens der Goldpartikel eine Fensterung im oberen Graustufenbereich durchgeführt worden. Im Gegensatz zum 0,2µg-Präparat war eine deutlich höhere Anzahl an Partikeln zu beobachten. Es kam vermehrt zum Konfluieren der Goldmarkierungen (Abbildung 26). Dies war ein Hinweis auf einzelne VEGF-Proteine mit multiplen Antikörpern, die an dem VEGF gebunden sind. Insgesamt zeigte sich eine homogene Durchmischung des Kollagens mit dem Zytokin VEGF.

3.3.3. Transmissionselektronenmikroskopie

In der Transmissionselektronenmikroskopie zeigten sich die Kollagenpräparate wie folgt: Die Goldpartikel stellten sich im TEM-Bild rundlich schwarz dar. Einzelne VEGF-Antikörper-Goldpartikel-Komplexe ließen sich präzise einzelnen Kollagenfibrillen zuordnen. An der Außenfläche der Fibrillen fixiert lagen die Komplexe im Präparat verteilt (Abbildung 27). Die in den REM-Bildern beschriebene Verklumpung der Goldpartikel zeigte sich auch hier, ein Überschuss an VEGF-Antikörpern ist zu vermuten.

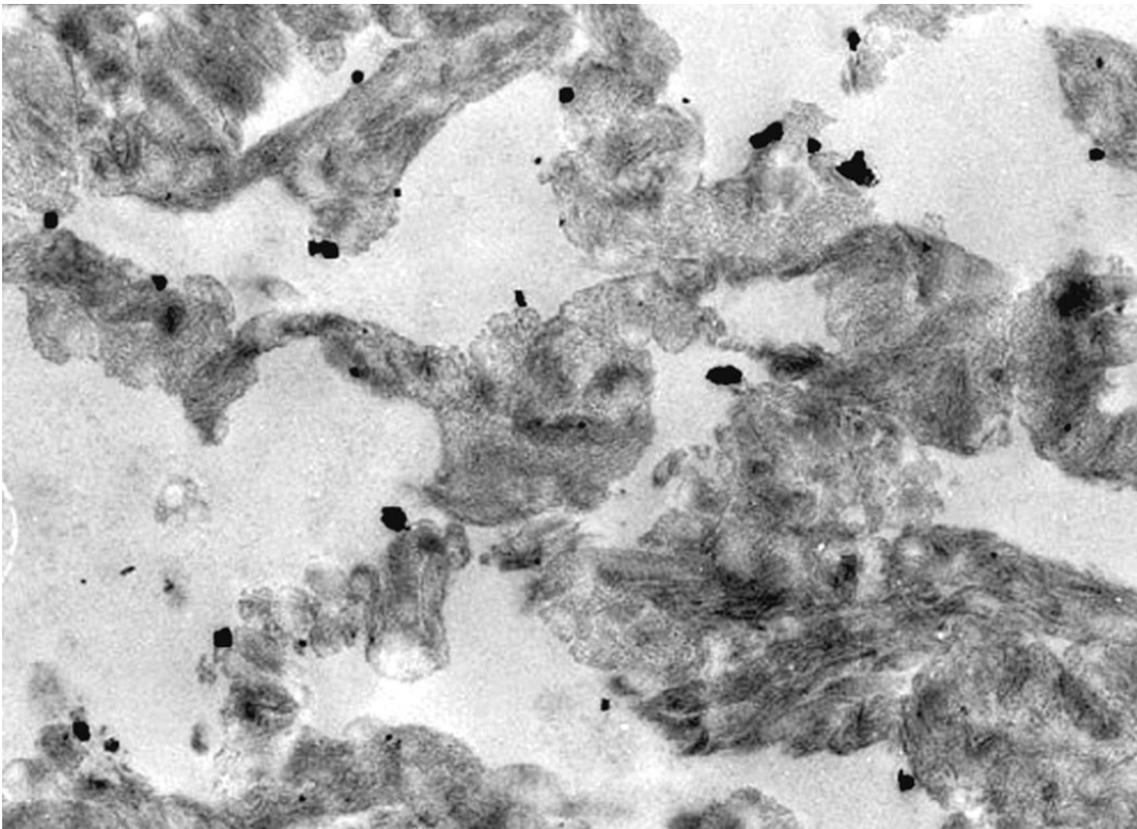


Abbildung 27: TEM-Bild Kollagenblock mit 10 µg VEGF₁₆₅ (3400x)

Bei der Darstellung eines einzelnen Goldpartikels mit hoher Vergrößerung zeigte sich im TEM-Bild eine enge Lagebeziehung zwischen einer Kollagenfibrille und dem Goldpartikel (Abbildung 28). Hier ist eine direkte Bindung des VEGF an die Kollagenfibrille zu postulieren. Die Adhäsion war stark genug um die Fixierungsprozedur zur Transmissionselektronenmikroskopie zu überstehen.

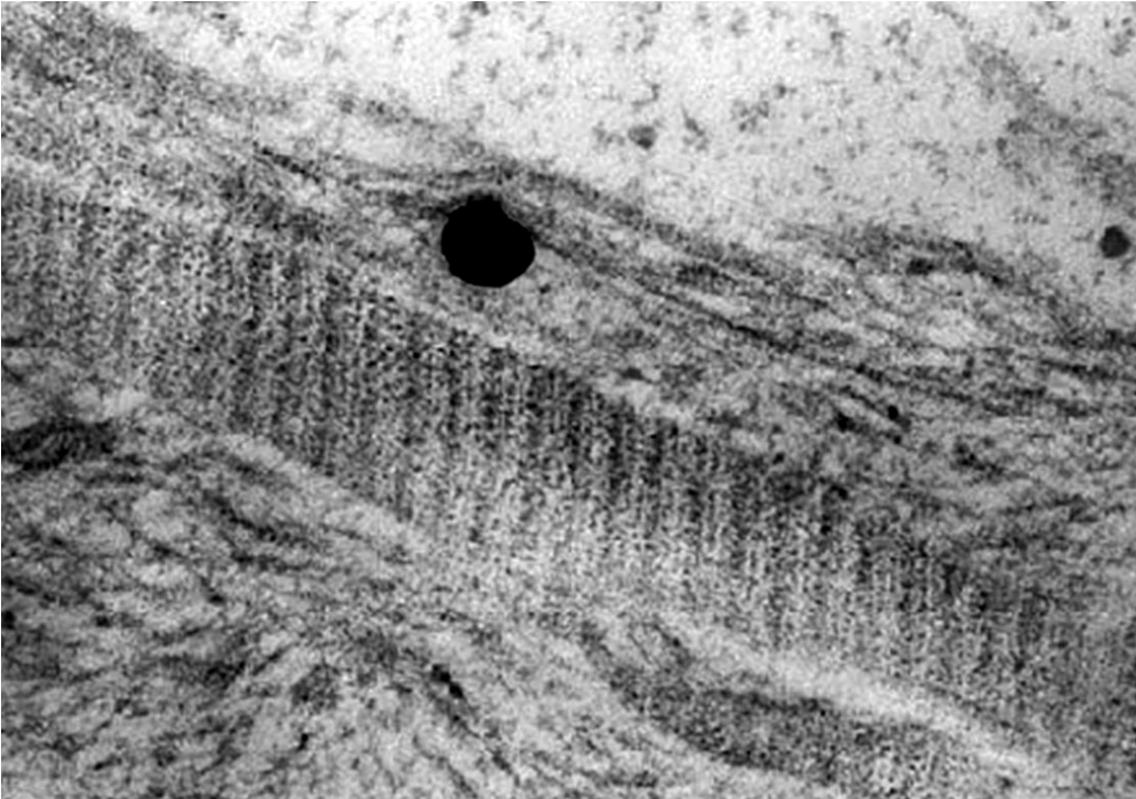


Abbildung 28: TEM-Bild Kollagenblock mit 10 µg VEGF₁₆₅ (21500x)

4. Diskussion

Die Gefäßversorgung im bestehenden Knochendefekt ist ein entscheidender Schlüsselfaktor für die Ausheilung und Wiederherstellung von Form und Funktion. Avaskuläre knöcherne Strukturen, z.B. bei Tumoren, Osteomyelitiden oder Traumata, zeigen eine starke Neigung zur Atrophie und zu sekundären Komplikationen wie Entzündungen oder Frakturen. In den meisten klinischen Studien zeigt der minderdruckblutete Knochen des Erwachsenen eine geringe Proliferation [Burchardt 1987].

Durch den Mangel vitaler Zellbestandteile im erkrankten Knochenlager sind die Angiogenese und das Knochenwachstum vermindert. Für die Wiederherstellung des Blutflusses im erkrankten Knochenlager sind die Rezirkulation und die Neovaskularisation verantwortlich [Leunig et al. 1994]. Knochenzellen produzieren Wachstumsfaktoren, welche die Kaskade der Angiogenese induzieren [Globus et al. 1989, Arnold und West 1991]. Folglich besteht ein Zusammenhang zwischen der Angiogenese und der Osteogenese, denn durch eine gezielte Beeinflussung der Vaskularisation kann die Knochenneubildung gefördert werden. Beschrieben wurde die Stimulierung der Osteoneogenese mit Wachstumsfaktoren von Kübler et al. 1998 und Ripamonti et al. 1992. Die therapeutische Einflussnahme auf die Osteogenese mithilfe rekombinanten Zytokinen zeigten entsprechend viel versprechende Erfolge [Crotts und Park 1998]. Die praktische Anwendbarkeit erfordert neue Strategien, denn die geringen Applikationsmengen und die Instabilität der Zytokine erweisen sich als erschwerend im klinischen Alltag. Das „Tissue Engineering“ (Gewebsdesign) zeigt neue Wege in der Anwendbarkeit von Wachstumsfaktoren, Zytokinen, Hormonen oder Impfstoffen.

Der Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) spielt als angiogenes Protein in der Kaskade der Osteoneogenese eine zentrale Rolle, da die Neubildung von Blutgefäßen und die Perfusion die Schlüsselposition für die Knochenneubildung einnimmt [Paralkar et al. 1991]. Durch die Auswahl des VEGF als angiogenes Zytokin kann die Knochenregeneration über physiologischem Wege, in diesem Fall über die Angiogenese, stimuliert werden [Hollinger und Kleinschmidt 1990]. Dabei ist die

optimale Balance zwischen Stimulatoren und Inhibitoren für die Angiogenese entscheidend [Iruela-Arispe und Dvorak 1997].

Kollagen als Trägermaterial für die Medikamentenapplikation wurde erprobt und ist im klinischen Einsatz. Als gefriergetrockneter, steriler Schwamm mit offenen, miteinander in Kontakt stehenden Poren ist das Material gut anwendbar und lagerungsfähig. Durch die gute Verträglichkeit und Kompatibilität zeigt sich das xenogene Kollagen ideal zur Erprobung als Trägermatrix für Zytokine.

Die Kombination der Trägersubstanz Kollagen mit dem rekombinanten Zytokin VEGF₁₆₅ wurde in dieser Studie pharmakologisch und bildgebend untersucht. Diese Grundlagenerhebung sollte vor dem Einsatz im Tierversuch erfolgen, denn ohne die dargestellte Freisetzungskinetik des VEGFs sind Ergebnisse der Folgestudien nur teilweise interpretierbar. Im Tierversuch überlagern biologische Effekte die therapeutische Wirkung des VEGF-Kollagen-Komplexes und können die Resultate beeinflussen.

Das Ziel der pharmakologischen Untersuchung ist eine therapeutische Konzentration des VEGFs im knöchernen Regenerationsgebiet über einen definierten Zeitraum zu erzielen. In Zellkulturstudien konnte die VEGF-spezifische halbmaximale Wachstumsstimulation ermittelt werden [Kremer et al. 1997]. Die Wirkung des zugeführten VEGFs sollte möglichst oberhalb dieser Grenze liegen. Der definierte Zeitraum der Wachstumsstimulation muss in Relation zur Halbwertszeit des freien VEGFs gesetzt werden.

Im Ergebnisteil zeigte sich, dass die VEGF₁₆₅-Freigabe aus dem Kollagenträger bis zu 48 Stunden anhält. Anhand der nachgewiesenen Halbwertszeit des freien VEGFs von 90 Minuten sollte eine deutlich kürzere Freigabe erwartet werden, denn nach 8-10 Stunden sind selbst die hohen Konzentrationen von freien 10 und 80 µg VEGF durch schnellen Abbau unter die Nachweisbarkeitsgrenze gefallen. Hier muss ein Zusammenhang mit dem Trägermaterial angenommen werden. Durch die Bindung an einzelne Kollagenfibrillen kann eine Stabilisierung des Zytokins VEGF erzielt werden. Hier liegt zwar nur der indirekte Nachweis eines solchen Effektes vor, doch lässt sich dieser in der gesamten Versuchsreihe ermitteln. Die postulierte Stabilisierung ist eine Problemlösung für die Instabilität des VEGFs.

In den ersten 50 Stunden des Versuches konnte eine initial hohe Freisetzungsrates des VEGFs beobachtet werden, ähnlich den Berichten von Agrawal et al. [1995], der mit einem System aus BMP und PLA arbeitete. Entsprechend dieser Literatur konnte in den Versuchsergebnissen dieser Arbeit eine zweiphasige Freisetzungskinetik bestätigt werden: Nach dem oben beschriebenen schnellen Auswaschen des VEGFs durch Diffusion im Spülmedium folgt eine zweite Phase der langsamen Degradation des Trägermaterials Kollagen. In den tieferen Schichten der Kollagenmatrix gebundenes VEGF wird in dieser zweiten Phase kontinuierlich an das Spülmedium abgegeben. Diese Effekte spiegeln sich in der morphologischen Aufarbeitung im Elektronenmikroskop wieder. Durch hydrolytische Erosion der Ultrastruktur des Kollagens werden die einzelnen Fibrillen demaskiert und eine prolongierte Freigabe des VEGFs ermöglicht.

Die Gesamtmenge des in das Trägermaterial Kollagen eingebrachten VEGFs konnte im Degradationsversuch nicht ausgewaschen werden. Bei Kumulation der gemessenen VEGF-Konzentrationen zeigt sich, dass von eingebrachten 0,8 µg VEGF nur 0,09 µg VEGF übrig blieben. Dies entspricht einer Effizienz von zehn Prozent. Bei den Konzentrationen 10 µg und 80 µg VEGF wurden Effizienzen von vier und drei Prozent erreicht. Die nicht nachweisbaren 90, 96 und 97 Prozent der Gesamtmenge VEGF sind trotz optimaler Bedingungen bereits bei der Herstellung, Transport oder Lagerung verloren gegangen. Hier zeigt sich nochmals die ausgeprägte Instabilität des Zytokins. In der Literatur wurde dieser Effekt bereits beschrieben [Schliephake et al. 1998]. Die sinkende Effizienz in den hohen Konzentrationen beweist aber auch einen Sättigungseffekt des Kollagen-VEGF-Komplexes. Es ist nicht anzunehmen, dass durch eine noch höhere Beladung des Kollagengewebes eine bessere VEGF-Ausschüttung erzielt werden kann.

Als Fazit zeigt sich die untersuchte VEGF₁₆₅-Kollagen-Kombination als höchst effektiv: Die zweiphasige Freisetzungskinetik ermöglicht eine hyperphysiologische Stimulation durch das VEGF über 50 Stunden im Regenerationsbereich und stellt eine deutliche Verbesserung gegenüber der Applikation der Zytokinreinform dar. Eine Dosiserhöhung im Präparat brachte keine durchgreifende Verbesserung, da die ausgeschüttete Gesamtmenge nicht proportional zunimmt. Es steigt vielmehr die Verlustrate des Zytokins in Herstellung und Transport. Die notwendige biologische Aktivität des VEGF

lässt sich aus der physiologischen Kaskade im Verlauf der Knochenheilung ableiten. Nach cirka drei bis fünf Tagen zeigen sich im Defektbereich die ersten Gefäßaussprossungen [Farmand et al. 1988, Hollinger et al. 1999, Leunig et al. 1997, Urist et al. 1992]. Unter Berücksichtigung einer Latenzzeit zwischen VEGF-Stimulation und dem morphologischen Gefäßwachstum lässt sich ein idealer Wirkzeitraum in den ersten 50 Stunden nach Defekteintritt feststellen. In diesem Zeitraum könnte der hier untersuchte VEGF-Kollagen-Komplex ideal Verwendung finden, belegt durch die dargestellte Freisetzungskinetik. Die weitere Untersuchung des verwendeten VEGF-Kollagen-Komplexes in vivo ist der nächste Schritt zur klinischen Anwendung, denn die in-vitro zeigt noch zu viele Variablen. So ist das Puffermedium nur ein unzureichendes Modell für Blutfluß in den biologischen Geweben. Die enzymatische Degradation des Kollagens konnte in dem Modell keine Berücksichtigung finden. Auch der Faktorennachweis mit Antikörpern lässt Unsicherheiten zu, denn die Bindungsstelle an Antigenstruktur des VEGFs muss nicht identisch mit der aktiven Region des Zytokins sein.

Andere Wege der Zytokinapplikation wurden bereits beschrieben, so zeigte Crofts und Park 1998 den Transport des Zytokins in Mikrosphären. Eine weitere Entwicklung zeigt sich in der Kopplung der Zytokin-RNA-Information an einen viralen Vektor [Safi et al. 1999, Franceschi 2005] oder die direkte Applikation von Zytokin-Plasmid-DNA ins Gewebe [Isner et al. 1996].

5. Zusammenfassung

Der Wiederaufbau von Knochendefekten stellt für den Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgen eine große Herausforderung dar. Das autologe Knochentransplantat stellt aktuell den Goldstandard dar, doch es bestehen weiterhin Bestrebungen nach Alternativen um Zweiteingriffe zu vermeiden. Ein Ansatz stellt die Osteoinduktion durch einen Komplex aus einer knochenähnlichen Grundsubstanz und Zytokinen dar, die im Knochendefekt eine für zügige und komplikationsarme Ausheilung sorgt.

In dieser Studie wurde ein Komplex aus Kollagen Typ I als Trägermatrix und Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF₁₆₅) als angiogenes Zytokin *in vitro* untersucht. In einem Kreislaufsimulationsmodell wurden die Komplexe in drei verschiedenen Konzentrationen (0,2µ - 10µg - 80µg VEGF pro Kollagenblock) über fünf Tagen von Pufferlösung umspült. In regelmäßigen Abständen wurde das VEGF in der Pufferlösung im ELISA-Verfahren bestimmt und die Freisetzungskinetik ermittelt. Es konnte eine hyperphysiologische VEGF-Konzentration im Kreislaufsystem über unerwartet lange 50 Stunden erreicht werden, bei einer parallel bestimmten Halbwertszeit des freien Kollagens von nur 90 Minuten. Daraus lässt sich eine Stabilisierung und Speicherung des sonst instabilen VEGF durch die Komplexierung mit dem Kollagen ableiten.

Das Zytokin VEGF wurde im Immunogoldverfahren markiert und in der Elektronenmikroskopie (REM und TEM) sichtbar gemacht. Die morphologische Aufarbeitung erfolgte zusätzlich durch die Lichtmikroskopie. Die goldmarkierten VEGF-Proteine stellten sich den Kollagenfibrillen eng benachbart dar und zeigen sich in Konglomeraten an die Fasern gebunden. Diese morphologische Darstellung untermauert die Theorie der Protein stabilisierung des VEGF durch die Komplexierung an das Kollagen.

Der VEGF-Kollagen-Komplex kann eine neue effektive Therapiemöglichkeit zur Behandlung von knöchernen Defekten darstellen. Nachfolgende Studien können diese These *in vivo* bestärken.

6. Literatur

- 1) Agrawal C, Best J, Heckman J, Boyan B (1995)
Protein release kinetics of a biodegradable implant for fracture non-unions.
Biomaterials; 16: 1255-1260
- 2) Arnold F, West D (1991)
Angiogenesis in wound healing.
Pharm Ther; 52: 407-422
- 3) Arzt T, Maschtowski J, Wimmer F, Schmidt K (1996)
Sinuselevation durch Osteogenese mittels eines osteoinduktiven
Proteinkomplexes.
Z Zahnärztl Implant; 12: 3-10
- 4) Bartkowski S, Heczko P, Lisiewicz J, Dorozynski J, Kurek M, Kusmiderski
J, Kasprzyk J (1994)
Combined treatment with antibiotic, heparin and streptokinase - a new approach
to the therapy of bacterial osteomyelitis.
J Cranio Maxillofac Surg; 22: 167-176
- 5) Basle M, Lesourd M, Grizon F, Pascaretti C, Chappard D (1998)
Typ-I-Kollagen im xenogenen Knochenmaterial reguliert Anbindung und
Verbreitung von Osteoblasten über die β 1-Integrin-Untereinheit.
Orthopäde; 27: 136-142
- 6) Bolander M, 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; 68: 1264-1274

-
- 7) Brighton C, Lorich D, Kupcha R, Reilly T, Jones A, Woodbury R (1992)
The pericyte as a possible osteoblast progenitor cell.
Clin Orthop; 275: 287-299

 - 8) Brouwers JE, van Donkelaar CC, Sengers BG, Huiskes R
Can the growth factors PTHrP, Ihh and VEGF, together regulate the
development of a long bone?
J Biomech. 2005 Nov 17

 - 9) 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

 - 10) 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

 - 11) 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

 - 12) Burchardt H (1987):
Biology of bone transplantation.
Orthop Clin North Am 18: 187-196

 - 13) Caplan A I (1990)
Cartilage begets bone versus endochondral myelopoests.
Clin Orthop 261: 257-267

-
- 14) Canalis E, MacCarthy T, Centrella M (1994)
Growth factors and the regulation of bone remodelling.
J Clin Invest. 81:277-281
- 15) Collin-Osdoby P (1994)
Role of vascular endothelial cells in bone biology.
J Cell Biochem; 55: 304-309
- 16) Coultas L, Chawengsaksophak K, Rossant J.(2005)
Endothelial cells and VEGF in vascular development
Nature. 2005 Dec 15;438(7070):937-45.
- 17) Costantino P, Friedman C, Jones K, Chow L, Pelzer H, Sisson Sr. G (1991)
Hydroxyapatite cement - I. Basic chemistry and histologic properties.
Arch Otolaryngol Head Neck Surg; 117: 379-384
- 18) Crofts G, Park T (1998)
Protein delivery from poly(lactic-co-glycolic acid) biodegradable microspheres:
release kinetics and stability issues.
J Microencapsulation; 15: 699-713
- 19) DiCorleto P, Cimbrone M (1996)
Vascular endothelium. Atherosclerosis and coronary artery disease. Foster V,
Ross R, Topol E (Hrsg.).
Philadelphia, Lippincott-Raven, 387-397
- 20) Drake C, Little C (1995)
Exogenous vascular endothelial growth factor induces malformed and
hyperfused vessels during embryonic neovascularization.
Proc Natl Acad Sci USA; 92: 7657-7661

-
- 21) Eymers 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
- 22) Farmand M (1988)
Experimentelle Ergebnisse zur spontanen Unterkieferregeneration beim
wachsenden Organismus.
Kiefer Gesichtschirurgie; 1: 53-56
- 23) Feifel H, Gerner A, Schmidt K, Wimmer K, Schmitz H (1995)
Die Beeinflussung der Knochenregeneration in phylogener
Hydroxylapatitkeramik durch einen osteoinduktiven Proteinkomplex.
Dtsch Z Mund Kiefer Gesichtschir; 19: 25-27
- 24) Ferrara N, Winer J, Burton T (1991):
Aortic smooth muscle cells express and secrete vascular endothelial growth
factor.
Growth Factors 5: 141-148
- 25) Ferrara N, Carver-Moore K, Chen H, Dowd M, Lu L, O'Shea K, Powell-
Braxton L, Hillan K, Moore M: (1996)
Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF
gene.
Nature; 380: 439-443
- 26) 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.
Devel Biol; 169: 699-712

-
- 27) Foitzik C, Stamm M (1997)
Einsatz von phasenreinem β -Tricalciumphosphat zur Auffüllung von ossären Defekten biologische Materialvorteile und klinische Erfahrungen.
Quintessenz; 48: 1365-1377
- 28) 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
- 29) Franceschi RT. Biological approaches to bone regeneration by gene therapy.(2005)
J Dent Res. 2005 Dec;84(12):1093-103.
- 30) Friess W (1998)
Collagen - biomaterial for drug delivery. Europ
J Pharma Biopharma; 45: 113-136
- 31) 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
- 32) Gross P, Heistad D, Marcus M (1979)
Neurohumoral regulation of blood flow to bones and marrow.
Am J Physiol; 237: H440-H448
- 33) Günther K, Scharf H, Pesch H, Puhl W (1996)
Osteointegration lösungsmittel-konservierter Knochenimplantate im Tiermodell.
Osteologie; 5: 4-12

-
- 34) Hauschka P, Mavrakos A, Iafrazi M, Doleman S, Klagsbrun M (1986)
Growth factors in bone matrix.
J Biol Chem; 261: 12665-12674
- 35) 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
- 36) Hemprich A, Lehmann R, Khoury F, Schulte A, Hidding J (1989)
Filling cysts with type 1 bone collagen.
Dtsch Zahnarztl Z; 44: 590-592
- 37) Herr G, Wahl D, Küsswetter W (1993)
Osteogenic activity of bone morphogenetic protein and hydroxyapatite
composites implants.
Ann Chir Gyn; 82: 99-108
- 38) Hollinger J, Kleinschmidt J (1990)
The critical size defect as an experimental model to test bone repair materials.
J Craniofac Surg; 1: 60-68
- 39) Hollinger J, Leong K (1996a)
Poly(α -hydroxy acids): carriers for bone morphogenetic proteins.
Biomaterials; 17: 187-194
- 40) Hollinger J, Wong M (1996b)
The integrated process of hard tissue regeneration with special emphasis on
fracture healing.
Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod; 82: 594-606

-
- 41) Hollinger J, Buck D, Bruder S (1999)
Biology of bone healing: its impact on clinical therapy, Tissue engineering.
Edited by Lynch S, Genco R, Marx R. Chicago,
Quintessence Publishing Co, 1999, pp 17-53
- 42) 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
- 43) Horisaka Y, Okamoto Y, Matsumoto N, Yoshimura Y, Hirano A, Nashida M,
Kawada J, Yamashita K, Takagi T (1994)
Histological changes of implanted collagen material during bone induction.
J Biomed Mater Res; 28: 97-103
- 44) Hutmacher D, Hürzeler M, Schliephake H (1996)
A review of material properties of biodegradable and bioresorbable polymers
and devices for GTR and GBR applications.
Int J Oral Maxillofac Implants; 11: 667-678
- 45) 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
- 46) Iruela-Arispe M, Dvorak H (1997)
Angiogenesis: a dynamic balance of stimulators and inhibitors.
Thrombosis and Haemostasis; 78: 672-677

-
- 47) Isner J, Pieczek A, Schainfeld R, Blair R, Haley L, Asahara T, Rosenfield K, Razvi S, Wash K, Symes J (1996)
Clinical evidence of angiogenesis after gene transfer of phVEGF165 in patient with ischemic limb.
Lancet; 348: 370-374
- 48) Joos U (1983)
Die Beschleunigung der Knochenregeneration in chirurgisch bedingten Defekten am Kiefer durch Kollagen.
Habilitationsschrift, Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg
- 49) 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 cement composite as a delivery system.
Bio Med Mat Eng; 4: 291-307
- 50) Kasper C, Ewers R, Simons B (1988)
Knochenersatzmaterial aus Algen.
Dtsch Zahnärztl Z; 43: 116-119
- 51) 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
- 52) Kleinheinz J, Joos U (1999)
Serum concentration of VEGF and bFGF in patients with sagittal split ramus osteotomy.
Int J Oral Maxillofac Surg; 28: 53

-
- 53) Kleinheinz J, Wiesmann H, Fischer C, Brockmann J, Joos U (2000)
In vitro model for analysis of degradation and release kinetics of a cytokin-carrier complex.
J Cranio Maxillofac Surg; 28: 96
- 54) Kremer C, Breier G, Risau W, Plate KH.(1997)
Up-regulation of flk-1/vascular endothelial growth factor receptor 2 by its ligand in a cerebral slice culture system.
Cancer Res. Sep 1;57(17):3852-9
- 55) Kusumoto K, Bessho K, Fujimura K, Ogawa Y, Iizuka T (1997)
Intramuscular osteinduction and bone marrow formation by the implantation of rhBMP-2 with atelopeptide type I collagen.
Br J Oral Maxillofac Surg; 35: 433-437
- 56) Kübler N, 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
- 57) Kübler N (1997)
Osteoinduktion und -reparation.
Mund Kiefer GesichtsChir; 1: 2-25
- 58) Kübler N (1997)
Knochenbildung durch Osteoinduktion. Berlin,
Quintessenz Verlags-GmbH,
- 59) Kübler N, Würzler K, Biebl S, Käding C, Faller G, Sieber E, Kirchner T, Sebald W, Reuther J (1998)
Die Rekonstruktion von Unterkieferdefekten mit BMP-2.
Dtsch Zahnärztl Z; 53: 871-875

-
- 60) Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, Goeddel DV, Ferrara N (1989):
Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen.
Science 246: 1306-1309
- 61) Leunig M, Yuan F, Berk D, Gerweck L, Jain R (1994)
Methods in laboratory investigation. Angiogenesis and growth of isografted
bone: quantitative in vivo assay in nude mice.
Lab Invest; 71: 300-307
- 62) Leunig M, Yuan F, Gerweck L, Jain R (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; 17: 1-9
- 63) Marx R, Johnson R (1987)
Studies in the radiobiology of osteoradionecrosis and their clinical significance.
Oral Surg Oral Med Oral Path; 64: 379-390
- 64) Mohan S, Baylink DJ (1991)
Bone growth factors.
Clin Orthop 263: 30-48
- 65) Paralkar V, Vukicevic S, Reddi A (1991)
Transforming growth factor b type I binds to collagen IV of basement
membrane matrix: implication for development.
Dev Biol; 143: 303-308
- 66) Pechak DG, Kujawa M J, Caplan A I (1986)
Morphological and histochemical events during first bone formation in
embryonic chick limbs.
Bone 7: 441-458

-
- 67) 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
- 68) Reddi A (1994)
Bone and cartilage differentiation.
Curr Opin Gen Develop; 4: 737-744
- 69) Recker RR (1992)
Embryology, anatomy, and microstructure of bone. In: Coe FL, Favus MJ (ed)
- 70) Disorders of Bone and Mineral Metabolism.
Raven Press, New York pp. 219-240
- 71) Ripamonti U, Ma S, 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
- 72) Russell RGG, Bunning RAD, Hughes DE, Gown M (1990)
Humoral and local factors affecting bone formation and resorption.
In: Stevenson JC (ed) New Techniques in Metabolic Bone Disease. Butterworth, London, pp. 1-29
- 73) Safi J, DiPaula A, Riccioni T, Kajstura J, Ambrosio G, Becker L, Anversa P, Capogrossi M (1999)
Adenovirus-mediated acidic fibroblast growth factor gene transfer induces angiogenesis in the nonischemic rabbit heart.
Microvasc res; 58: 238-249

-
- 74) Sauter E, Nesbit M, Watson J, Klein-Szanto A, Litwin S, Herlyn M (1999)
Vascular endothelial growth factor is a marker of tumor invasion and metastasis
in squamous cell carcinomas of the head and neck.
Clin Cancer Res; 5: 775-782
- 75) Schaub R, Wozney J (1991)
Novel agents that promote bone regeneration.
Curr Opin Biotechnol; 2: 868-871
- 76) 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
- 77) Schlickewei W, Paul C (1991)
Experimentelle Untersuchungen zum Knochenersatz mit bovinem Apatit.
Hefte zur Unfallheilkunde; 216: 59-69
- 78) Schliephake H, Jamil M, Knebel J (1998)
Experimental reconstruction of the mandible using polylactic acid tubes and
basic fibroblast growth factor in alloplastic scaffolds.
J Oral Maxillofac Surg; 56: 616-626
- 79) Schmidt K, Swoboda H (1995)
Die Bedeutung matrixgebundener Zytokine für die Osteoinduktion und
Osteogenese.
Implantologie; 2: 127-148
- 80) Sevitt S (1981)
Bone Repair and Fracture Healing in Man.
Churchill Livingstone, New York, pp. 1-34

-
- 81) Terheyden H, Jepsen S (1999)
Hartgeweberegeneration durch Wachstumsfaktoren und morphogene Proteine.
Implantologie; 4: 359-378
- 82) Urist M (1992)
Bone morphogenetic protein, Bone grafts and bone substitutes.
Habal M, Reddi A (Hrsg.). Philadelphia, WB Saunders, 70-83
- 83) Wang D, 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
- 84) Wang D, 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
- 85) 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

Danksagung

Für die freundliche Unterstützung und äußerst kooperative Zusammenarbeit und Hilfe bei der Erstellung dieser Promotionsarbeit möchte ich mich ganz herzlich bei allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Biomineralisation der Klinik und Poliklinik für Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster bedanken. Ganz besonderer Dank gilt Priv.-Doz. Dr. Dr. J. Kleinheinz.

8. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Dr. med. Carsten Fischer
Anschrift	Gescherweg 59, 48161 Münster
Geburtstag und –ort	28.05.1968 in Nordhorn
Familienstand	verheiratet

Schulbildung

1975 – 1979	Waldschule Nordhorn
1979 – 1988	Missionsgymnasium St. Antonius in Bardel
Abschluß	<u>Allgemeine Hochschulreife</u>

Zivildienst

1988 – 1990 20monatiger Zivildienst beim Deutschen Roten Kreuz,

Studium

Okt. 1990 - April 1991	Chemie an der WWU Münster
April 1991 - April 1993	Humanmedizin an der WWU Münster, vorklinischer Abschnitt
April 1993 – Okt. 1996	Klinischer Abschnitt an der WWU Münster
Okt. 1996 – Okt. 1997	Praktisches Jahr in Minden und Kapstadt
Okt. 1997 – Mai 2001	Zahnmedizin an der WWU Münster
Examina	<u>Staatsexamen Humanmedizin Oktober 1997</u> <u>Staatsexamen Zahnmedizin Mai 2001</u>
Promotion	Humanmedizin März 2000

Facharztweiterbildung

Juni 2001 – Mai 2005	Assistenzarzt an der Klinik und Poliklinik der Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie der ME der Universität Münster
Juni 2005	<u>Facharztanerkennung für Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie</u>
Seit Oktober 2005	Annerkennungszeit in MKG-Chirurgischer Praxis

Münster, den 24.04.2006