

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

**Der Einfluß von Vascular endothelial growth factor auf die  
Knochenregeneration im Unterkiefer durch Beeinflussung der Angiogenese  
-lichtmikroskopische und histomorphometrische Untersuchung**

**INAUGURAL-DISSERTATION**

zur

Erlangung des doctor medicinae dentium  
der Medizinischen Fakultät  
der Westfälischen Wilhelms- Universität Münster

vorgelegt von

Erdal Bölükbasi

aus Sarkisla

2004

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. H. Jürgens

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

2. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. A. Wolowski

Tag der mündlichen Prüfung: 09. 07. 2004

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

Referent: Priv.-Doz. Dr. Dr. J. Kleinheinz  
Koreferent: Priv.-Doz. Dr. A. Wolowski

### **Zusammenfassung**

Der Einfluß von Vascular endothelial growth factor auf die  
Knochenregeneration im Unterkiefer durch Beeinflussung der Angiogenese  
-lichtmikroskopische und histomorphometrische Untersuchung

Bölkübbasi  
Erdal

Die kausale Behandlung von knöchernen Defekten stellt in der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie ein zunehmendes Problem dar. Die Beseitigung der funktionellen und ästhetischen Beeinträchtigungen kann nur durch eine gezielte Regeneration oder Rekonstruktion des ossären Gewebes erzielt werden. Dabei ist das autologe Knochenransplantat unübertroffen, jedoch mengenmäßig limitiert. Daher besteht die intensive Forderung nach Ersatzsystemen und biokompatiblen Ersatzmaterialien, die primär ein Grundgerüst zum Einwandern von Zellen darstellen, ferner aber auch, besonders als Träger aktiver Wirkstoffe, physiologisch ablaufende Kaskaden, die der Regeneration dienen, aktivieren. Für die Defektheilung ist neben der Osteogenese besonders die Angiogenese, die für die Gefäß- und Knochenregeneration wesentlich ist, die Voraussetzung.

In der vorliegenden Studie diente Typ-1 Kollagen als Ersatzmaterial und Träger für den Wachstumsfaktor VEGF<sub>165</sub> (Vascular endothelial growth factor<sub>165</sub>) zur Versorgung bikortikaler Bohrdefekte. Ferner lagen zwei Kontrollgruppen, K1 mit reinem Typ-1 Kollagen als Einlage und K2 als Leerprobe ohne Einlage zum Vergleich.

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.

Untersucht wurden Proben von 56 weißen New Zealand Kaninchen. Je Kaninchen wurden 4 bikortikale Bohrlöcher mit einem Durchmesser von 5mm im Unterkiefer angelegt und für die zwei Kontrollgruppen zwei Bohrungen ohne Einlage belassen (K1) und zwei mit reinem Typ-1 Kollagen gefüllt (K2) oder für die Studiengruppe alle vier Bohrungen mit Typ-1 Kollagen, komplexiert mit einer (in vitro) in der Konzentration und Freisetzungskinetik optimierten Ausgangsmenge von 0,8µg VEGF<sub>165</sub>, versehen. Nach einer Verweildauer von 3, 7, 14 und 28 Tagen wurden die Tiere geopfert, der Defektbereich als Gesamtprobe entnommen, verarbeitet und 1.) histologisch nach qualitativen Merkmalen wie endothelialen und osteoblastären Zelltypen und der Regenerationsrichtung untersucht, 2.) die Gefäßzahl bestimmt und 3.) die Proben nach 28 Tagen quantitativ mittels der Histomorphometrie bezüglich der regenerierten Knochenfläche und Knochendichte untersucht und statistisch analysiert.

Diese Studie beantwortet nach histologischer und histomorphometrischer Beurteilung die Frage, wie die Osteogenese über die Beeinflussung der Angiogenese nach dem Einsatz von VEGF<sub>165</sub> im Unterkieferdefektmodell am Kaninchen beeinflusst wird.

Das histologische Bild zeigte auf zellulärer und extrazellulärer Ebene ein den morphologischen Veränderungen zutreffendes Bild. Auch ein Verhältnis zwischen der osteogenen und angiogenen Front bestand, wobei die osteogene Front der angiogenen Front folgte.

Die Ergebnisse zeigten bis zum 14. Tag für alle Gruppen einen gleichbleibenden Anstieg der Gefäßzahl. Am 28. Tag konnte ein Abfall der Werte für die Gefäßzahl in den Kontrollgruppen bei gleichbleibend hoher Gefäßzahl unter dem Einfluß von VEGF<sub>165</sub> festgestellt werden.

Die histomorphometrische Beurteilung des Knochens nach 28 Tagen ergab für die Knochenflächendichte einen signifikant höheren Wert der Studiengruppe im Vergleich mit den Leerproben (p=0,022) und den reinen Kollagenfüllungen (p=0,002). Im Vergleich der regenerierten Knochenflächen bestanden statistisch keine signifikanten höheren Werte.

Daraus folgt, dass der VEGF<sub>165</sub> eine steigernde Wirkung auf die Gefäßzahl hat und zu einer höheren Knochenflächendichte führt.

*Für meine verstorbenen  
Eltern*

# INHALTSVERZEICHNIS

SEITE

## LISTE DER VERWENDETEN ABKÜRZUNGEN

<b>1. EINLEITUNG</b> .....	1
1.1. Grundlagen der Knochenregeneration .....	1
1.1.1. Osteogenese .....	2
1.2. Knochenersatzmaterialien .....	5
1.3. Gefäßversorgung des Knochens .....	10
1.3.1 Gefäßneubildung-Angiogenese-Vaskulogenese .....	11
1.3.2. Angiogene Faktoren .....	13
1.4. Problemstellung .....	18
<b>2. MATERIAL UND METHODEN</b> .....	19
2.1. Grundlagen .....	19
2.2. Tiermodell .....	19
2.3. Probeneinteilung – Implantate .....	20
2.4. Narkoseverfahren .....	23
2.5. Operatives Verfahren – Implantation .....	23
2.6. Operatives Verfahren – Explantation – Paraffineinbettung .....	26
2.7. Färbemethoden .....	30
2.8. Auswertungskriterien und Auswertungsmethoden .....	33
2.8.1. Histologische Untersuchung .....	33
2.8.2. Histomorphometrie – Knochenfläche und Knochenflächendichte .....	33
2.8.3. Auswertung der Gefäßzahl .....	37

<b>3. ERGEBNISSE</b> .....	38
3.1. Makroskopisch-klinische Beurteilung .....	38
3.2. Mikroskopisch-histologische Auswertung .....	40
3.3. Ergebnisse der histologischen Auswertung .....	53
3.4. Quantitative Auswertung der Histomorphometrie .....	53
3.4.1. Quantitative Ergebnisse – Knochenflächen .....	53
3.4.2. Quantitative Ergebnisse – Knochenflächendichten .....	55
3.5. Gefäße .....	57
3.5.1. Gefäßentwicklung .....	57
3.5.2. Gefäßzahl .....	62
<b>4. DISKUSSION</b> .....	64
<b>5. ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	74
<b>6. LITERATUR</b> .....	76
<b>7. DANKSAGUNG</b> .....	88
<b>8. LEBENSLAUF</b> .....	89
<b>ANHANG</b> .....	I-II

## **LISTE DER VERWENDETEN ABKÜRZUNGEN:**

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
$\pi$	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
PGE <sub>1+2</sub>	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- $\beta$ 1+2	Transforming growth factor- beta 1+2
Tie-1+2	tyrosine kinase with immunoglobulin and epidermal growth factor homology domains
TNF $\alpha$	Tumornekrosefaktor $\alpha$
u. a.	unter anderem
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VEGF-R	Vascular endothelial growth factor-Rezeptor
vergl.	Vergleiche
z. B.	zum Beispiel
>	größer als
$\geq$	größer / gleich
<	kleiner als
$\leq$	kleiner / gleich
x	-mal, -fach Multiplikator

# 1. EINLEITUNG

## 1.1. Grundlagen der Knochenregeneration

In der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie hat die Gewebeneubildung an Bedeutung zugenommen. Besonders die Knochenneubildung und die Knochenregeneration stellen in der Gewebsneubildung zentrale Mechanismen dar. Die Wiederherstellung der knöchernen Konturen nach Trauma oder Operation, die Augmentation von Atrophien oder die Rekonstruktion von Mißbildungen sind für den Erhalt der Kau-, Schluck-, Atem- und Sprechfunktion und die Ästhetik unanfechtbar [Hausamen und Neukam 1992]. Die Knochenregeneration stellt ein komplexes Geschehen dar, das vielen unterschiedlichen Regulationsmechanismen unterliegt. Grundvoraussetzung für eine Neubildung ist die Fähigkeit des Knochengewebes, Prozesse in Gang zu setzen, die ein Restitutio ad integrum erreichen. Dies ist zum Beispiel nach Fraktur oder Osteotomie der Fall [Rodan 1992]. Der Anteil älterer Menschen, die trotz allgemeiner Gesundheit an Zahnlosigkeit und der daraus bedingter Knochenatrophie leiden, hat in den letzten Jahrzehnten ständig zugenommen. Auch der irreversible Schwund von Knochen nach Entzündungen kann die Lebensqualität von Patienten genauso beeinträchtigen, wie die Knochendefizite nach Resektion von Tumoren im Knochen [Kloss und Neukam 1999]. Die Therapie von Altersatrophien und Osteoporosen (Knochenabbau), Pseudoarthrosen (nicht regelrechte Heilung), Nichtanlagen (z.B. Agnesie) oder rudimentäre Knochenanlagen (z.B. Mikrogenie) und entzündliche Veränderungen (Osteomyelitis, Parodontitis) stellen eine große Herausforderung in der Medizin dar. Besonders schwierig ist die Therapie von Defekten, die eine kritische Größe überschreiten und nicht mehr spontan regenerieren können. Um diese Defekte adäquat behandeln zu können, müssen der komplexe Aufbau des Knochens und die Grundprinzipien der Knochenformation und der Knochenregeneration bekannt sein. Ebenso müssen vorliegende und sich bewährte Reparaturmethoden und -materialien berücksichtigt werden. Ein Therapiemöglichkeit könnte der vollständige Ersatz der defekten oder fehlerhaften Knochensubstanzen sein. Dieser Ersatz muss sich im Organismus vollständig integrieren, funktionell sein und physiologisch belastet werden können. Zudem muss er nebenwirkungsfrei und physiologisch beständig sein. Die Existenz und die Funktionsfähigkeit der organischen und anorganischen Umgebung und die physiologischen Abläufe darin müssen berücksichtigt werden.

Die Funktionsfähigkeit des Organismus wird unter natürlichen Bedingungen über einen übergeordneten Regelkreis, der mit Hilfe sich gegenseitig beeinflussender Faktoren alle Mechanismen so im Gleichgewicht hält, dass eine balancierte äquivalente Existenz aller Zellen und Systeme möglich ist, gewährleistet. Besonders im Knochengewebe ist wegen dem komplexen Aufbau dieser Gewebeart die Beeinflussung und Aktivierung vieler Zellformen möglich. Die Wiederherstellung von Knochendefekten beruht auf drei wesentlichen Mechanismen. Diese sind neben der Osteogenese, die Osteoinduktion oder schleicher Ersatz, also die Bereitstellung einer Leitstruktur (Transplantat) zum Einsprossen von Gefäßen aus angrenzendem Knochen [Kübler 1997] und die Osteoinduktion, den Einfluß von Bone morphogenetic proteins auf pluripotente Mesenchymzellen, welche mit den einsprossenden Gefäßen in den Defekt gelangen und zu knochenbildenden Zellen differenzieren [Urist et al. 1967].

### **1.1.1. Osteogenese**

Voraussetzung für die Heilung, die Formation und das Wachstum des Knochens und die Beseitigung von Defekten im Knochen ist der Anbau von neuem Knochen während des ganzen Lebens [Buckwalter et al. 1995]. Beim Knochen eines erwachsenen Menschen beträgt der jährliche Knochenumsatz beziehungsweise die Knochenerneuerung durch Auf- und Abbau im Zuge des Bone remodeling ein Zwanzigstel des Gesamtknochenvolumens. Dieser Umsatz würde so nicht reichen um traumatisch, entzündlich oder iatrogen entstandene Defekte in einer hinlänglichen Zeit zu schließen. Daher müssten die Prozesse, die im Zuge der Regulationsmechanismen entstehen, durch andere Mechanismen beschleunigt werden [Kleinheinz 2000]. Solche Mechanismen können durch bestimmte Reize initiiert werden.

Die Osteogenese ist ein Prozess, der durch die Stimulierung mesenchymaler Zellen über die Induktion des Bone morphogenetic proteins, wovon mehr als 40 Typen bekannt sind und einige davon in geringen Konzentrationen im Knochengewebe vorkommen, aktiviert wird. Dieser aktivierende Vorgang wird als Osteoinduktion bezeichnet [Kübler 1998]. Dabei proliferieren mesenchymale Stammzellen zu knorpel- und knochenbildenden Progenitorzellen [Kübler 1997].

Die Ossifikation lässt sich aufgrund der Lokalisation und der vorzutreffenden Gewebe in

- 1.) die aus Knorpelgewebe hervorgehende, enchondrale,

- 2.) die aus organischer Matrixmembran entstehende, intramembranöse und
- 3.) die aus Addition von neuem Knochen auf bereits bestehendem Knochen, die appositionale Ossifikation, einteilen [Ogata und Uthoff 1990].

Die Unterschiede bestehen nur im Eintrittszeitpunkt in die Kaskade. In der vorliegenden Studie soll nur auf die enchondrale Ossifikation weiter eingegangen werden, da nur diese den vollständigen Ablauf der Knocheninduktionskaskade beinhaltet. In dieser Studie hat diese insofern eine größere Bedeutung, da der Kern dieser Studie, die stimulierende Wirkung eines Komplexes aus Kollagen als Trägermaterial und dem Vascular endothelial growth factor<sub>165</sub> als angiogener Wachstumsfaktor, weitestgehend der enchondralen Ossifikation entspricht. In der Literatur findet man dazu, dass die aus einer demineralisierten Matrix freigesetzten Wachstumsfaktoren die Knochenformation stimulieren, und diese Knochenneubildung durch enchondrale Ossifikation geschieht [DeSimone und Reddi 1992, Hulth et al. 1993, Katz et al. 1993, Muthukumaran und Reddi 1985, Reddi 1983, Reddi et al 1987, Ripamonti et al. 1993]. Der Ablauf der Knocheninduktionskaskade, d.h. die Bereitstellung von Fibroblasten und Endothelzellen und die Differenzierung von Fibroblasten zu Chondroblasten und Osteoblasten, wird durch einen Reiz, zum Beispiel eine Fraktur, angestoßen [Aubin et al. 1995, Reddi und Anderson 1976, Hollinger und Leong 1996]. Folge davon ist ein Regenerationsprozess mit Neubildung ohne Narben- oder Ersatzgewebsbildung. Dieser Heilvorgang (der Wundheilung) findet extrazellulär statt [Reddi 1984].

Bei der Sequenz aus dynamischen Ereignissen nach einer Knochenfraktur spielen viele biologische Zellregulatoren eine Schlüsselrolle um den Knochen neu zu formen [Hollinger und Wong 1996]. Der Knochen besitzt eine erhebliche Kapazität der Anpassung, die durch die Fähigkeit der Osteoblasten begründet ist, auf äußere Reize zu reagieren. Dabei haben hormonelle, nervale und mechanische Reize und Umgebungsmilieu Einfluß auf ihre Ausformung [Sevitt 1981]. Lokal und systemisch regulierend wirkende Moleküle wie Wachstumsfaktoren und Hormone lenken zelluläre Interaktionen über autokrine, parakrine und endokrine Wege, interagieren mit den Osteoblasten und passen die Osteogenese den Bedingungen an [Hollinger und Leong 1996]. Zusammengefasst kann gesagt werden, dass der osteogenetische Prozeß durch biomechanische- (belastungsabhängige Knochenadaptation, Knochendistraktion), biophysikalische- (Schallwellen, magnetische Felder, Bewegung- und Belastungsapplikation), nervale- und biochemische Reize (Wachstumsfaktoren, Hormone) beeinflusst wird. Neben der Embryogenese wird Knochen auch bei von Aussen einwirkenden Faktoren wie Weichgewebsverletzungen sogar in unphysiologisch hohem Maße, bis zu einer

heterotopen Verknöcherung, gebildet. So verhält es sich auch zum Beispiel bei der Myositis ossificans, einer Knochenformation innerhalb des Skelettmuskels [Ahrengart et al. 1987, Coventry et al. 1981, Puzas et al. 1989]. Darüber hinaus wird die Umformung der Knochenmorphologie durch Beeinflussung der orofacialen Weichgewebe in der Funktionskieferorthopädie zur Behandlung von Dysgnathien und Dysharmonien schon sehr früh beschrieben[Roux 1885, Wolff 1892].

Mit den Fortschritten in der gezielten Knochenregulierung könnte Knochen in verschiedenster Weise ersetzt, modelliert und den Bedingungen und der Beanspruchung angepasst werden um damit Patienten bestmöglich zu behandeln.

## 1.2. Knochenersatzmaterialien

Die Suche nach optimalen Knochenersatzmaterialien und Trägersubstanzen für osteogene Faktoren ist sicherlich nicht einfach und noch Schwerpunkt vieler Studien. Als Alternative zum autologen Knochentransplantat, das die Osteogenese, die Osteokonduktion und die Osteoinduktion in sich vereint und durch seine natürlichen Vorgaben wie der vorliegenden Knochenmatrix, den Wachstumsfaktoren und den Proteinen in physiologischer Menge [Bolander und Balian 1986] große Vorteile bietet, gibt es eine ganze Reihe von Ersatzmaterialien. Gerade weil die Entnahme und der Einsatz von autologen Knochentransplantaten nicht immer ohne Schwierigkeiten möglich ist, drängt die Suche nach geeigneten Ersatzmaterialien. Einerseits ist die vorliegende Menge an autologem Knochentransplantat, da es nicht als Überschuss vorliegt oder von einem Reservoir entnommen wird, nicht unbegrenzt. Andererseits liegen oft schwierige Bedingungen vor der Entnahme der Transplantate vor, zumal die Patienten oft in einem geschwächten Zustand (Trauma, Tumor) sind. Die Transplantate aus kortikalem und spongiösem Knochen werden für die Anwendung in der Parodontal-, Oral- und Mund- und Kiefer-Gesichtschirurgie in der Regel aus der Tuberreion, aus zahnlosen Kieferabschnitten oder für größere Defekte von der Crista iliaca entnommen [Ehmke und Flemmig 1998].

Unter den klinisch ausgetesteten Ersatzmaterialien werden folgende drei Gruppen diskutiert:

### 1. alloplastische Implantate

- organisch: Polylacticacid (PLA), Polyglycolicacid (PGA), Polyepsiloncaprolacton (PEC)
- anorganisch: Kalziumcarbonat, Hydroxylapatit (HA), Trikalziumphosphat (TCP),  
Bioglas, Polymethylmethacrylate

### 2. natürliche organische Implantate: Kollagen

### 3. natürliche anorganische Implantate: xenogene Knochenimplantate (bovin), allogene Knochenimplantate (autolyzed antigen extracted allogenic bone) [Kleinheinz 2000].

Der Vorteil von Ersatzmaterialien ist die Möglichkeit der Herstellung auf Vorrat und die Modifizierbarkeit des Materials. Verbesserungen der Grundsubstanz und der darin applizierten Substanzen zur Förderung der Regeneration sind Ziel zahlreicher Studien [Costantino et al 1991, Herr et al. 1993, Kübler et al. 1993, Reddi und Anderson 1976].

Sowohl den organischen und anorganischen Gewebearten wie auch den synthetischen Komplexen können aus Knochen isolierte Proteine und aktive Faktoren zugeführt werden [Bolander und Balian 1986, Herr et al. 1993, Kamegai et al. 1994, Kübler et al. 1998, Schwartz et al. 1996]. Eine komplette Reossifikation von Defekten nach Implantation von verschiedenen Biomaterialien (bovine Knochenmatrix, Algipore, Trikalziumphosphat, Hydroxylapatit, Bioglas, Bio-Oss, resorbierbarem Co-Polymer und Kollagen) mit Zusatz von rekombinantem BMP-2 konnte bereits nachgewiesen werden. Eine alleinige Implantation der Biomaterialien in der Kontrollseite führte in der selben Studie zu keiner signifikanten knöchernen Überbrückung, allerdings zur vollständigen Resorption oder zur bindegewebigen Einkapselung [Kübler et al. 1998].

Grundsätzlich wird an das Ersatzmaterial die Anforderung der Verträglichkeit und Nebenwirkungsfreiheit gestellt. Die Biokompatibilität, mechanische Eigenschaften und die Sterilisierbarkeit bei Kollagen und aliphatischen Polyestern (PGA, PLA, PEC) wurden bereits diskutiert [Hutmacher et al. 1996]. Die Geschwindigkeit, mit der das Ersatzmaterial abgebaut wird, sollte mit der Regenerationsgeschwindigkeit des Gewebes übereinstimmen. Im Zusammenhang damit muss auch die Wirkungsweise und Wirkdauer der aktiven Faktoren mit der Freisetzungskinetik des Carriers übereinstimmen.

Des Weiteren muss die biomechanische Stabilität des Trägermaterials gegenüber dem Druck im Weichteillager beachtet und eine Dislokation vermieden werden [Kübler et al. 1998].

Sehr gute Ergebnisse hinsichtlich der Eigenschaften als Ersatzmaterial und auch als Carrier zeigten als resorbierbare Materialien PLA und PGA [Hollinger und Leong 1996]. Zellin und Linde haben bei mit PLA/PGA und BMP-2 behandelten Defekten nach 24 Tagen eine vollständige Regeneration erreicht [Zellin und Linde 1997].

HA und TPC finden unter den synthetischen Implantatmaterialien häufiger Anwendung und waren oft Thema tierexperimenteller und klinischer Studien [Costantino et al 1991, Decker et al 1995, Herr et al. 1993, Würzler et al. 2002]. HA ist biokompatibel und wirkt regenerationsfördernd. Es liegt in fester Form und als Zement zum Einsatz vor. HA-Zement erweist sich nur in Applikation in nicht lasttragenden Regionen als nützlich [Costantino et al. 1991]. Unter Belastung kommt es zur Lockerung des Implantats. Die Affinität von Osteogenin (BMP) zu HA wurde zur Bestimmung des Ausdrucks der biologischen Aktivität von Osteogenin in nicht heilenden knöchernen Defekten bei Primaten ausgenutzt [Ripamonti et al. 1992].

Auch als Carrier für osteoinduktive Proteine zeigte HA Erfolge und HA-Composit mit BMP-Zusatz wurde als Augmentationsmaterial in klinischer Anwendung im Bezug auf die Freisetzung von BMP favorisiert und durch den Ersatz des resorbierten HA durch neugebildeten Knochen bestätigt [Kamegai et al. 1994].

Unter der Vielzahl alloplastischer Materialien haben sich HA und Beta-Trikalziumphosphat als befriedigend erwiesen. Bei einer Untersuchung der BMP-2-induzierten Knochenregeneration bewies  $\alpha$ -TCP in Kombination mit BMP-2 eine akzeptable Resorptionsdauer [Würzler et al. 2002]. Allerdings kommt es bei alleiniger Anwendung dieser alloplastischen Materialien ohne BMP nicht zu einer Regeneration, sondern vielmehr zu einer bindegewebigen Einkapselung des Implantats [Flemmig 1993, Kübler et al. 1998].

Als ein weiteres alloplastisches Ersatzmaterial sind Biogläser bekannt. Biogläser können Verbindungen mit dem ortsständigen Knochen eingehen und finden deshalb als äußerst stabiler und lasttragender Knochenersatz und auch wegen ihrer raschen Ersetzung durch Knochen häufig Anwendung. [Stanley et al. 1997]. Würzler et al. 2002 zeigte, dass die Implantation von Biogläsern mit Zugabe von rhBMP-2 nahezu zur vollständigen Auffüllung eines definierten Defektes, jedoch nicht zu einer Mineralisation des Osteoids in der Umgebung der Bioglaspartikel führte. Jedoch konnten sich Biogläser bisher nicht als erfolgreiche Carrier für angiogene Wachstumsfaktoren beweisen.

Durch seine vielfältige Form und einfache Verarbeitung und Anwendung bietet das Kollagen viele Vorteile. Es wird überwiegend aus Rindern und Pferden gewonnen und hat damit eine praktisch unbegrenzte Verfügbarkeit. Das Kollagen kann in Form von Schwämmen, Blöcken oder Granulat Anwendung finden. Es ist sehr gut modellierbar und an alle Oberflächen adaptierfähig, immunologisch unbedenklich resorbierbar und in die Defektregeneration inkorporierbar [Hollinger und Leong 1996]. Mit 90% als Hauptbestandteil der organischen Knochenmatrix eignet sich Kollagen sehr gut als natürlicher Träger von aktiven Wachstumsfaktoren und als Konduktor für Osteoblasten [Basle et al. 1998]. Die Tatsache, dass es nicht abgebaut, sondern in den regenerierenden Knochen eingebaut wird, beschleunigt die Regeneration und verhindert die Entstehung von Spaltprodukten und Nebenwirkungen [Horisaka 1994, Joos 1983]. In einem Defekt eingelagertes Kollagen verhindert die Bildung eines Blutkoagels und ermöglicht damit ein rasches Einsprossen neuer Gefäße und beschleunigt die Knochenregeneration [Joos 1983].



Kollagen wurde in präklinischen Tierstudien als bevorzugtes Trägermaterial für das BMP verwendet und lieferte in diesem Kombinationseinsatz die überzeugendsten Ergebnisse [Hollinger und Leong 1996, Kübler et al. 1998].

Ferner scheint Kollagen eine stabilisierende Wirkung auf Zytokine zu haben. So zeigte *Kleinheinz 2000*, dass der VEGF<sub>165</sub> trotz einer Halbwertszeit von 1,5 Stunden und einem nahezu komplettem Zerfall nach 4-8 Stunden im Zusammenhang mit Typ-1 Kollagen als Carrier noch nach 48-54 Stunden nachweisbar ist.

An Ratten konnte mit einem System aus Kollagen Typ I als Carrier und BMP-2 als aktiver Faktor, neben einer intramuskulären Osteoinduktion und der Formation von Knochenmark, die Einsprossung von angioiden Strukturen in das Kollagen nach vier Wochen gezeigt werden [Kusumoto et al. 1997]. Die Beeinflussung der Mineralisation des Knochens während der Regeneration durch ein System aus bovinem Kollagen und BMP wurde ebenfalls an Ratten gezeigt [Horisaka et al. 1994]. Die fehlende Festigkeit und Stabilität von Kollagen verhindern eine Kraftübertragung. Dadurch ist die Belastung nach Implantation eingeschränkt. Auch die schnelle Lösung und die hohe Abbaurrate des Kollagen in physiologischem Milieu gehören zu den negativen Eigenschaften. Durch günstige Kombination des Kollagen mit anderen Implantatmaterialien könnten hinsichtlich der Abbaurrate und der Festigkeit Verbesserungen erreicht werden.

Autolysierter, Antigen-extrahierter, allogener Knochen wird aus humanem kortikalen Knochen präpariert und bezüglich den morphologischen, biomechanischen und osteoinduktiven Besonderheiten unehandeltem sowie gefriergetrocknetem Knochen gleichgestellt [Kübler et al. 1993].

Durch seine osteoinduktive Potenz, zurückzuführen auf die konservierten Knochenmatrixproteine (BMP's), ist der autolysierte, Antigen-extrahierte, allogene Knochen in der Lage eine enchondrale Knochenformation zu induzieren [Flemmig et al. 1998].

Die BMP's können aus den demineralisierten, allogenen Knochenimplantaten in das Implantatlager diffundieren und induzieren dort die Bildung von neuem Knochengewebe. Bei einer Vielzahl von Indikationen in der Parodontologie, der zahnärztlichen Chirurgie, der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie, der Orthopädie und der Neurochirurgie war der Einsatz osteoinduktiver Knochenimplantate in den letzten Jahren zunehmend [Kübler 1998]. Demineralisierter und gefriergetrockneter Knochen wird schon umfassend in der Parodontaltherapie angewandt [Schwartz et al. 1996]. Allerdings darf die Möglichkeit der Krankheitsübertragung und der Allergisierung nicht vernachlässigt werden. Eine

Demineralisierung und Gefriertrocknung kann das Risiko der Infektion mit Krankheitserregern und Allergenen reduzieren [Flemmig 1999]. Die Möglichkeit einer HIV-Infektion des Empfängers durch Implantation allogenen Knochens eines HIV-positiven Spenders besteht [Cohen et al. 1995] und wird auf 1:8 Mio. geschätzt [Buck et al. 1989]. Xenogene Knochenimplantate werden aus Tierknochen gewonnen und werden kommerziell deproteiniert angeboten. Eine Allergisierung des Empfängers nach Implantation xenogenen Knochens ist im Tiermodell nicht aufgetreten. Auch die Übertragungsmöglichkeit von Krankheitserregern, insbesondere Prionen, bei adäquater Aufbereitung wird als extrem niedrig eingeschätzt [Ehmke und Flemmig 1998].

Nach Implantation boviner Knochenmatrix mit BMP-2-Zusatz konnte an Ratten eine weitgehende Intergration des Implantats in den Knochen mit direkter Mineralisation und Durchsetzung durch vitale Osteozyten gezeigt werden [Würzler et al. 2002]. Ebenso wie bei den allogenen Knochenimplantaten besteht bei xenogenen Transplantaten nahezu unbegrenzte Verfügbarkeit, sofern ausreichend Spender oder eine ausreichende Heranzucht an geeigneten Tieren gibt.

Aufgrund der großen Zahl an Studien mit Knochenersatzmaterialien und Kombinationen mit Wachstumsfaktoren wird eine Reproduzierbarkeit der Studie und Vergleichbarkeit der Ergebnisse gefordert.

In der Wahl des Trägermaterials wurde durch die Verwendung des Kollagen Typ I auch der momentanen Entwicklung in der Forschung Rechnung getragen, da sich die Wissenschaft mehr den fundamentalen Prinzipien der Osteogenese, nämlich der Osteoinduktion und der Osteokonduktion zuwendet und nicht nur dem reinen Knochenersatz [Hollinger und Kleinschmidt 1990].

### 1.3. Gefäßversorgung des Knochens

Einen hohen Stellenwert in der Osteogenese hat die Gefäßversorgung. Die Mikrovaskularisation des Knochens stellt in der Knochenphysiologie eine Schlüsselfigur dar und ist nicht zu unterschätzen [Collin-Osdoby 1994]. Die Eigenschaft der Permeabilität ermöglicht dem Gefäßendothels die Funktion als Schnittstelle zur Übertragung von Stoffen zwischen dem Blut und Organen und Geweben [DiCorleto und Cimbrone 1996]. Es ist ohne eine adäquate vaskuläre Versorgung nicht möglich die Austauschprozesse (Nährstoffe, Minerale, Hormone, Abbauprodukte des Zellstoffwechsels), den Transport der für die Differenzierung und das Wachstum unverzichtbaren Substrate, den Transport von Kommunikationsstoffen (Hormone, aktive Faktoren), die Sauerstoffzufuhr, die Temperaturregulation und die pH-Regulation und somit eine sorgfältige Ossifikation zu gewährleisten. Daraus wird ersichtlich, dass ohne eine Gefäßbahn, ebenso wie ohne Osteoblasten (Differenzierung und Proliferation), einer Matrixsynthese und Mineralisation sowie biologischen, biochemischen und mechanischen Stimuli eine Knochenneubildung in einem Defekt nicht stattfinden kann. Daneben ist der Zerfall des Blutgefäßsystems als Ursache für einige Knochenerkrankungen bekannt. Die Verschlechterung der Blutversorgung des Knochens (Störung der Mikrozirkulation) durch vaskuläre Insuffizienzen und die Nekrose der Gefäße spielt in der Ätiopathologie der Osteomyelitis [Bartkowski et al. 1994], der Osteoradionekrose [Marx und Johnson 1987] und der gestörten Heilung der Extraktionswunde [Amler 1999] die Hauptrolle. Deshalb wird dem Gefäßsystem und seinem regenerativen Potential in Fällen unzureichender oder gestörter Vaskularisation, z.B. bei der Osteomyelitis, Osteoradionekrose oder Verletzungen, die entscheidende Rolle in der Regeneration des Knochens zugesprochen. Die Gefäßbahn stellt das effektivste Infrastruktursystem dar. Ferner wird in der Vaskularisation des Knochens 11% des kardialen Auswurfs gespeichert [Gross et al. 1979]. Die Zusammenhänge zwischen der Gefäßentwicklung und der Knochenentwicklung bzw. knochenbildenden Zellen werden an der Produktion von Vascular endothelial growth factor durch humane Osteoblasten deutlich [Wang et al. 1997]. Auch die Differenzierung von Osteopräkursorzellen aus kapillären Perizyten wird suggeriert [Brighton et al. 1992].

### 1.3.1. Gefäßneubildung – Angiogenese - Vaskulogenese

Das Gefäßsystem und die Blutversorgung spielen in der Physiologie und bei der Regeneration des Knochens eine entscheidende Rolle. Hinsichtlich der Gefäßentstehung werden zwei nicht streng voneinander getrennte, aber auf unterschiedlichen Voraussetzungen basierende Systeme unterschieden. Zum einen gibt es die Vaskulogenese, die Entstehung von Blutgefäßen aus in situ differenzierenden Endothelzellen und zum anderen die Angiogenese, die Abzweigung von Kapillaren aus bereits existierenden Gefäßen [Iruela-Arispe und Dvorak 1997, Risau 1997]. Die Angiogenese hat für die Regeneration des ausgereiften Knochens im Erwachsenenalter eine größere Bedeutung, da die Vaskulogenese überwiegend im embryonalen Stadium [Risau und Flamme 1995 ], in geringem Maße auch in der postnatalen Entwicklung [Asahara et al. 1999a] dominiert. Kennzeichnend für die Vaskulogenese ist die Differenzierung von Angioblasten aus dem Mesoderm und die Formation von primitiven Blutgefäßen aus Angioblasten [Risau und Flamme 1995]. Diese beiden Schritte erfolgen nach Induktion des Mesoderms durch Faktoren der Familie des fibroblast growth factors (FGF). Es wird angenommen, dass durch die Mesoderminduktion als Zwischenstufe zuerst Hämangioblasten entstehen [Bikfalvi und Han 1994, Risau 1997]. Anschließend erfolgt nach Initiierung durch den VEGF-Rezeptor 2 (Flk-1) die Bildung von Angioblasten [Flamme et al. 1995]. Für diesen Vorgang, sowie für die anschließende Bildung von ersten funktionellen Gefäßen und für das Überleben der Angioblasten ist eine ausreichende Konzentration an VEGF als Ligand der Rezeptoren notwendig [Breier et al. 1997, Ferrara et al. 1996, Yancopoulos et al. 2000]. Nach der Ausbildung des primären vaskulären Plexus im Embryo durch die Vaskulogenese, werden weiter Blutgefäße durch die sogenannte sprouting und non-sprouting Angiogenese gebildet und in das funktionelle Zirkulationssystem des Erwachsenen umgeformt [Risau 1997]. Die Vaskulogenese ist nach Abschluß der Entwicklung der Blutgefäße inaktiv und überlässt ihre Funktion bei Notwendigkeit, z. B. nach pathologischer Reizung [Ali et al. 1997], der Angiogenese.

Die Angiogenese stellt die Fort- und Neubildung von existierenden Gefäßen entsprechend der Anforderung der lokalen Umgebung [Cockerill et al. 1995] dar. Das normale Knochenwachstum und die Knochenheilung basieren auf der Angiogenese [Saadeh et al 2000]. Diese spielt bei der Formation von neuen Blutgefäßen und bei einer Vielfalt von physiologischen Prozessen, wie der Regeneration des weiblichen Reproduktionssystems- Endometriums- nach der Ovulation und nach der Gestation [Iruela-Arispe und Dvorak 1997 ], der Embryogenese und der Gewebeorganisation und –erhaltung [Shibuya 1996], der

Wundheilung [Arnold und West 1991, Haroon et al. 2000, Risau 1990, Swift et al. 1999] und Entzündungsreaktionen [Cid et al. 2000, McCourt et al. 1999] eine bedeutende Rolle. Auch die Rolle in pathologischen Prozessen wie dem Tumorwachstum und der Metastasierung [Carmeliet und Jain 2000, Desai und Libutti 1999, Folkman 1995, Iruela-Arispe und Dvorak 1997, Risau 1990, Shibuya 1996, Sauter et al. 1999], der vaskulären Missbildungen während der embryonalen Entwicklung [Drake und Little 1995], sowie rheumatoiden Krankheiten und der diabetischen Retinopathie [Folkman 1995, Shibuya 1996] ist entscheidend. Sie ist ein komplexer, mehrstufiger Prozess, der die Migration und Proliferation von kapillären Endothelzellen nach sich zieht [Risau 1990]. Für die skelettale Entwicklung und die skelettale Reparatur ist die Angiogenese von fundamentaler Bedeutung [Schlaeppli et al. 1997]. Zahlreiche Studien haben die entscheidende Rolle der Angiogenese für eine erfolgreiche Osteogenese während der enchondralen Ossifikation und der Frakturheilung gezeigt [Steinbrech et al. 1999].

Die Angiogenese wird auch von verschiedenen Faktoren mit angiogenem Potential, welche in Gruppen eingeteilt werden, beeinflusst [Schott und Morrow 1993].

### **1.3.2. Angiogene Faktoren**

Neben der biomechanischen und der biophysikalischen Förderung des Knochenwachstums nimmt die Stimulierung durch biochemische Reize eine besondere Stellung ein. Die Regulation der Knochenneubildung wird zum Teil durch lokale Wachstumsfaktoren kontrolliert. Diese beeinflussen den Knochen einschließlich der Differenzierung von Vorläuferzellen, der Proliferation von Osteoblasten, der Stimulation der Matrixsynthese und der Angiogenese [Schaub und Woznej 1991]. Die Bedeutung der Gefäßversorgung für die Knochenregeneration wurde bereits geschildert und es ist naheliegend, dass die Angiogenese und ihre Beeinflussung durch Wachstumsfaktoren für die Knochenregeneration folglich entscheidend sind.

Die Kontrolle des Kapillarwachstums erfolgt durch ein Wechselspiel von Wachstumsfaktoren, die entweder stimulierend oder inhibitorisch wirken [Iruela-Arispe und Dvorak 1997]. Diese Regulierung hat den Verlauf einer Kaskade [Risau 1997]. Dabei herrscht eine regelrechte Faktorhierarchie, wobei vorbereitende initiale Faktoren günstige Bedingungen für spätere ausführende Faktoren schaffen [Marden et al. 1990].

Beim Erwachsenen kippt das Gleichgewicht zwischen Inhibitoren und Stimulatoren unter gesunden Umständen zugunsten der Inhibition und das kapilläre Wachstum wird unterdrückt. Unter bestimmten pathologischen Umständen sind lokal Inhibitoren jedoch untauglich, die zunehmende Aktivität der angiogenen Induktoren zu unterdrücken [Iruela-Arispe und Dvorak 1997]. Genauso kann eine Veränderung der Umgebungsbedingungen (z.B. pH-Wert, Temperatur etc.) am Zytokin stimulierende als auch inhibierende Wirkungen hervorrufen [Agrawal et al. 1995].

#### **Vascular endothelial growth factor (VEGF):**

Zu den wichtigsten Wachstumsfaktoren gehört der Vascular endothelial growth factor (VEGF) [Iruela-Arispe und Dvorak 1997]. Er spielt eine wesentliche regulatorische Rolle in der physiologischen und pathologischen Angiogenese [Breier 2000, Ristimaki et al. 1998]. 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]. Neben der Regulierung der Angiogenese ist auch die regulatorische Wirkung auf die Vaskulogenese bekannt [Asahara et al. 1999b]. Vorausgegangene Studien haben gezeigt, dass der VEGF in die Knochenformation und –reparatur verwickelt ist [Schlaeppli et al. 1997]. VEGF ist als heparin bindendes Polypeptid-Mitogen mit einer Zielzellspezifität, begrenzt auf vaskuläre Endothelzellen, identifiziert [Ferrara et al. 1991, Goad 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]. Der Beitrag zur postnatalen Neovaskularisierung durch Mobilisierung der vom Knochenmark hergeleiteten endothelialen Progenitorzellen wurde im Tiermodell und am Menschen gezeigt [Asahara et al. 1999b]. Die Expression von VEGF wird durch verschiedene Zellen induziert und ist an die Anwesenheit von Hormonen und anderen Wachstumsfaktoren gebunden [Goad et al. 1996, Shibuya 1996]. Zu diesen verschiedenen Zellen zählen glatte Muskelzellen der Aorta [Ferrara et al. 1991], luteale und adrenale Kortexzellen und Tumorzellen [Neufeld et al. 1994].

VEGF begünstigt mit der Angiogenese auch das Überleben von Endothelzellen in Tumoren und ermöglicht dadurch die Tumorexpansion und Metastasen [Breier 2000].

Die Produktion in endokrinen Organen läuft unter Einfluß von trophischen Hormonen ab [Wang et al. 1996]. Die Expression in humanen Osteoblasten wird über eine außergewöhnlich starke Stimulation durch 1,25-dihydroxyvitamin D3 vermittelt [Schlaeppli et al. 1997, Wang et al.1997]. Die 1,25-dihydroxyvitamin D3 vermittelte Expression von VEGF und die Produktion von Wachstumsfaktoren durch die Endothelzellen steigern den anabolen Effekt auf die Osteoblasten. Dies lässt darauf schließen, dass neben anderen anabolen Effekten gerade die durch den VEGF aktivierte Angiogenese im Knochenaufbau eine entscheidende Rolle spielt [Wang et al. 1997]. Die VEGF-Freisetzung der Osteoblasten in vitro wird durch die Hypoxie begünstigt [Steinbrech et al. 1999].

Einige Beobachtungen an japanischen Wachtelembryonen zeigen, dass exogenes VEGF eine Wirkung auf das Verhalten der der Vaskulogenese verpflichteten primordialen Endothelzellen hat und legen nahe, dass endogener VEGF für die Gefäßformation und Regulation des Gefäßkalibers wichtig ist [Drake und Little 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].

Eine hohe Expression der Mitglieder der VEGF-Familie konnte für VEGF-B in Herz und ZNS [Lagercrantz et al. 1998], für VEGF-D in der Lunge von fetalen und erwachsenen Mäusen [Farnebo et al. 1999] und für VEGF-C bei der Lymphangiogenese [Mandriota und Pepper 1999, Ristimaki et al. 1998] gezeigt werden. 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].

Die Endothelzellproliferation, Angiogenese und mikrovaskuläre Permeabilität wird durch die hohe Affinität zu den 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].

Die Isoformen VEGF<sub>121</sub> und VEGF<sub>165</sub> des VEGF-A mit 121 oder 165 Aminosäuresequenzen sind die vorherrschendsten unter den bekannten VEGF Isoformen [Soker et al. 1997]. Beide, VEGF<sub>121</sub> und VEGF<sub>165</sub>, binden an KDR/Flk-1 und Flt-1. Zusätzlich bindet VEGF<sub>165</sub> an einen VEGF<sub>165</sub>-spezifischen Rezeptor (VEGF<sub>165</sub>R) [Soker et al. 1996].

Zwischen den unterschiedlichen VEGF-Species ist die Isoform VEGF<sub>165</sub> mit 165 Aminosäuresequenzen die am besten charakterisierte [Neufeld et al. 1994].

### **Angiopoietin 1:**

Angiopoietin 1 (Ang-1) und dessen Tyrosinkinase Rezeptor Tie-2 werden von Endothelzellen ausgeschüttet, haben aber keinen Einfluß auf die Proliferation von Endothelzellen. Allerdings ist die Ang-1/Tie-2 -Signalisierung für die Angiogenese und das Überleben der Endothelzellen unentbehrlich [Hayes et al. 1999]. Gemeinsam mit VEGF hat Ang-1 eine additive Wirkung auf die Angiogenese [Thurston et al. 1999]. Eine direkte Wirkung auf die Osteogenese ist nicht bekannt.



**Ephrin B:**

Ephrin B Liganden induzieren die Kapillareinsprossung mit einer ähnlichen Effizienz wie Ang-1 und VEGF. Ephrin B2 und EphB-Rezeptoren (Tyrosinkinase Ephrinrezeptoren) beeinflussen die Entwicklung zu Arterien oder Venen [Adams et al. 1999]. Ephrin B2 markiert zu Anfang der Angiogenese arterielle Endothelzellen und der Rezeptor EphB4 (Ephrinrezeptor B4) fördert dagegen Venen [Wang et al. 1998].

**Fibroblast growth factor:**

Der "acidic fibroblast growth factor" (FGF-1) und der "basic fibroblast growth factor" (bFGF/FGF-2) haben Wirkungen auf multiple vom Mesoderm und Neuroektoderm abgeleitete Zelltypen, einschließlich Endothelzellen, und sind allgegenwärtig. Der Nachweis für die Verwicklung von FGF-1 und FGF-2 in die Kontrolle der Blutgefäßformation ist erbracht und deren Verwicklung in die normale und pathologische Angiogenese ist im Detail beschrieben worden [Slavin 1995]. Bei dem basic fibroblast growth factor handelt es sich um den Wachstumsfaktor mit der stärksten mitogenen und chemotaktischen Aktivität auf Endothelzellen in vitro [Bastaki et al. 1997]. Als Grundbestandteil der Knochen- und Knorpelmatrix, wurde es bereits als potentes Mitogen für Osteoblasten und Chondrozyten, und ausserdem als Inhibitor der terminalen Differenzierung von Chondrozyten in Zellkulturen, gezeigt. Es moduliert die Knochenformation in vitro durch Inhibition der terminalen Differenzierung der Chondrozyten in der Wachstumsfuge. Am Mäusefemur konnte gezeigt werden, daß bFGF (basic FGF) die Angiogenese moduliert, indem es indirekt chemotaktisch die Zellmigration und -invasion beeinflusst [Leunig et al. 1997].

**Insulin-like growth factor-I:**

Zu den osteogenen Faktoren ist auch der Insulin-like growth factor-I (IGF-I) zu zählen. Er hat eine lokal regulatorische Rolle im Knochenumbau. 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]. Collins et al. 1998 folgern, daß IGF-I und verschiedene Marker des Knochenumsatzes in Relation stehen. Eine Beziehung zwischen dem IGF-I und der Mineraleichte des Knochens besteht nicht [Collins et al. 1998].

Die Liste der Wachstumsfaktoren mit angiogenem Potential ist zunehmend [Schott und Morrow 1993]. Außer den oben genannten Faktoren sind in der Literatur noch eine Reihe weiterer Faktoren beschrieben, über die bezüglich der angiogenen und osteogenen Wirkung und weiteren Eigenschaften zu wenig bekannt ist und eine sichere Aussage nicht möglich ist. Zu diesen gehören beispielsweise das Angiogenin, Angiotropin, Epidermal growth factor, TNF $\alpha$ , PGE<sub>1+2</sub> und Interleukine. Daher wird auf diese Faktoren nicht näher eingegangen. Mit den lokal wirkenden Wachstumsfaktoren TGF $\beta$ -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 D<sub>3</sub>, 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 Versuchen 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 der Knochenheilungsprozesses [Motoki und Mulliken 1990] dem VEGF<sub>165</sub> besonderer Vorzug gewährt.

## 1.4. 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 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 wieweit sich eine Beeinflussung der Gefäßneubildung auf die Knochenregeneration auswirkt und wieviele Unterschiede zwischen angiogener und osteogener Front bestehen.

## 2. MATERIAL UND METHODEN

### 2.1. Grundlagen

Trotz gründlicher Prüfungen des VEGF<sub>165</sub> in vitro ist die Durchführung eines Experimentes in einem standardisierten Tiermodell und nach strengen Vorschriften in vivo zwingend erforderlich. Hier können neben der Evaluation und Analyse der Knochenregeneration die Aktivität des Faktors im Organismus, dessen Freisetzung aus dem Trägermaterial und eventuelle Nebenwirkungen beurteilt werden. Darüberhinaus ist ein Vergleich der Studiengruppe mit Kontrollgruppen, also der Regeneration mit reinem Typ-1 Kollagen und der Regeneration ohne Implantat notwendig.

### 2.2. Tiermodell

Als Versuchstiere dienten 56 männliche weiße New Zealand Kaninchen. Die Tiere wogen durchschnittlich 3800 Gramm. Sie stammen vom selben Züchter und waren ausgewachsen und skelettal ausgereift um optimale Bedingungen in der Potenz der Knochenregeneration zu gewährleisten.

Die Auswahl von Kaninchen als Versuchstiere erfolgte für verschiedene experimentelle Studien und konnte als standfest betrachtet werden. Darüberhinaus ist die gute Eignung vom Kaninchenmodell für Experimente mit Zytokinen ist nachgewiesen [Eppley et al. 1991, Kübler et al. 1998, Rabie 1997, Schenk 1994, Takeshita et al. 1996]. Auch die Wirksamkeit von humanem VEGF<sub>165</sub> im Kaninchenmodell [Takeshita et al. 1996] sprach für dessen Auswahl. Trotzdem wurde in einer Vorversuchsreihe überprüft und festgestellt, daß dieses Tiermodell für die vorliegende Studie geeignet war. Dabei wurde die Toleranz der Tiere auf die Operation und die Operationstechnik beobachtet und Erfahrungen zur Infektionsrate und zur Optimierung des zeitlichen Ablaufs gesammelt. Desweiteren wurde darin eine Versuchsreihe zur Beurteilung des Trägermaterials Typ-1 Kollagen und des Proteins VEGF<sub>165</sub> integriert.

Für die vorliegende Studie wurden die Kaninchen im Tierstall in Einzelkäfigen und unter gleichen sozialen Bedingungen gehalten. Die Ernährung erfolgte mittels Wasser ad libidum und diätischem Pressfutter in gleichen Mengen entsprechend den Richtlinien zur Tierhaltung

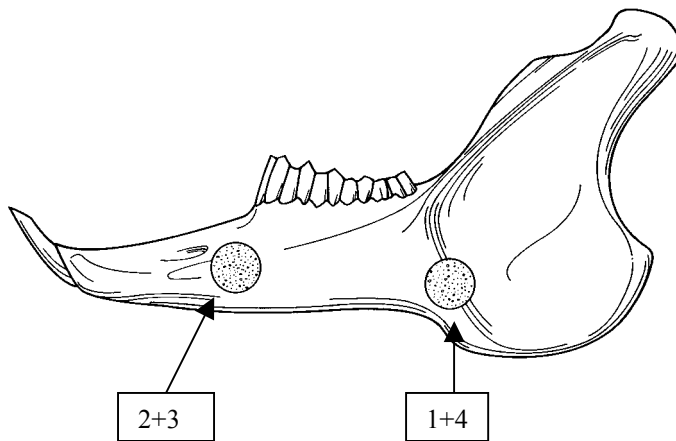
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster. Die Haltung und Betreuung der Tiere (Nahrungsaufnahme, Gesundheitspflege, Raum- und Käfigpflege, Klima, Lichtrhythmus, Beobachtung) erfolgte durch das Tierpflegepersonal der Zentralen Tierexperimentellen Einrichtungen der Medizinischen Fakultät der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster. Eine Mindest-Akkommodationszeit der Tiere an die Käfige und die Laborbedingungen von vier Wochen wurde eingehalten. Die Haltung sowie die Experimente wurden unter Einhaltung der Anforderungen des Tierschutzgesetzes und mit einer Genehmigung des Regierungspräsidiums Münster mit dem Aktenzeichen 23.0835.1.0 (G 46 / 97) vom 12. Januar 1998 durchgeführt.

### **2.3. Probeneinteilung - Implantate**

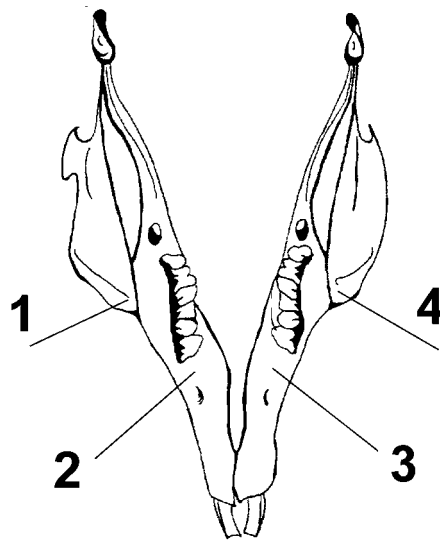
Die Einteilung der Tiere erfolgte einmal nach unterschiedliche Probengruppen und zusätzlich nach der Probenverweildauer. Die Versorgung der Bohrdefekte erfolgte :

- a) mit keinem Material, nur mit eigenem Blutkoagel (K1),
- b) mit Typ-1 Kollagen zur Blutstillung und Stabilisation und als Volumenersatz (K2),
- c) mit Typ-1 Kollagen und VEGF<sub>165</sub> als Träger-Cytokin-Komplex (S).

Es lagen genauso viele Proben aus der Studiengruppe S (Typ-1 Kollagen-VEGF<sub>165</sub>-Komplex) vor wie aus beiden Kontrollgruppen K1 (Leerproben) und K2 (Typ-1 Kollagen) zusammen. Um eine Beeinflussung von Kontrollproben durch das VEGF<sub>165</sub> über den Blutkreislauf zu vermeiden, wurden keine VEGF<sub>165</sub>-Implantate mit Kontrollimplantate am selben Tier eingelegt. Die Einlage der Implantate (Typ-1 Kollagen, Typ-1 Kollagen-VEGF<sub>165</sub>-Komplex) und die Anlage der Leerproben erfolgte in 4 regional definierte Bohrdefekte (Regionen 1-4) pro Tier, wobei Regio 1 im Kieferwinkelbereich rechts, Regio 2 im Corpusbereich rechts, Regio 3 im Corpusbereich links und Regio 4 im Kieferwinkelbereich links lagen (Abb.1+2). Dabei waren in den Regionen 3 und 4 Leer-Kontrollproben und in den Regionen 1 und 2 Kollagen-Kontrollproben. So konnte auch die Anzahl der Versuchstiere gering gehalten werden. In der Studiengruppe beinhalteten alle 4 Regionen eines Tieres Typ-1 Kollagen mit VEGF<sub>165</sub> (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 histologisch-lichtmikroskopische und histomorphometrische Untersuchung vorgesehen.



**Abb. 1:** Entnahmeregionen Korpusbereich- und Kieferwinkel links.



**Abb. 2:** Regionen 1-4.

Gruppe	Einlage	Region	Verweildauer	Anzahl Proben/Tiere
Kontrollgr. K1	Leer	3 / 4	3/7/14/28 Tage	56 / 28
Kontrollgr. K2	Kollagen	1 / 2	3/7/14/28 Tage	56 / 28
Studiengr. S	Koll. mit VEGF <sub>165</sub>	1/2/3/4	3/7/14/28 Tage	112 / 28

**Tab. 1:** Gruppen- und Probeneinteilung.

Zur Bestimmung einer ausreichenden VEGF<sub>165</sub>-Konzentration des Kollagenimplantates im Tiermodell wurden Ergebnisse von in vitro Untersuchungen von *Kleinheinz et al. 2000* als Referenz herangezogen.

Dabei wurde das Volumen des Bohrdefekts (Durchmesser: 5mm, Höhe: 5mm), die Freisetzungseigenschaften und die auf Endothelzellen biologisch wirksame Konzentration berücksichtigt. Aus diesem in vitro Modell ging hervor, dass die nach 48 h freigesetzte VEGF<sub>165</sub> -menge aus einem Kollagenimplantat, beladen mit 800ng VEGF<sub>165</sub>, 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 98mm<sup>3</sup> (98µl). Im Tierversuch würde dort bei gleichbleibender Freisetzungskinetik eine lokale Konzentration von mindestens 10 ng/ml vorherrschen.

Nach Conn et al. 1990 ist für eine ausreichende Promotion der Endothelzellen durch VEGF<sub>165</sub> eine Konzentration von bis 6 ng/ml notwendig und ausreichend.

Daraus geht hervor, dass zur Stimulierung der endothelialen Zellproliferation im und um den Bohrdefekt eine Konzentration von 0,8µg VEGF<sub>165</sub> ausreicht.

Daher wurden industriell gefertigte (Resorba, Nürnberg) und mit 800ng VEGF<sub>165</sub> beladene Typ-1 Kollagen-Implantate als Träger-Cytokin-Komplex eingesetzt.

## 2.4. Narkoseverfahren

Die präoperative Betäubung der Kaninchen erfolgte unter balancierter Allgemeinanästhesie unter Beibehaltung der Spontanatmung. Nach der Feststellung des Körpergewichts der Tiere durch Wiegen wurde entsprechend dem Gewicht die 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 zusammengestellt.

Die Anästhesielösungen wurden intragluteal injiziert. Dabei wirkte das Xylazin sedativ und muskelrelaxierend und das Ketanest sedativ und analgetisch. Nach etwa 5 Minuten nach der Injektion der Narkose setzte die Wirkung ein.

Zusätzlich wurde im Operationsgebiet 1,2ml 2%iges Ultracain zur perioperativen Anästhesie und zur Blutstillung/Vasokonstriktion injiziert.

## 2.5. Operatives Verfahren - Implantation

Nach der Narkotisierung der Kaninchen erfolgte die Rasur der submandibulären Region und des Halses links und rechts und eines Ohres. Die Tiere wurden danach auf dem Operationstisch steril gelagert und die rasierten Areale mit Betaisodonna-Lösung desinfiziert.

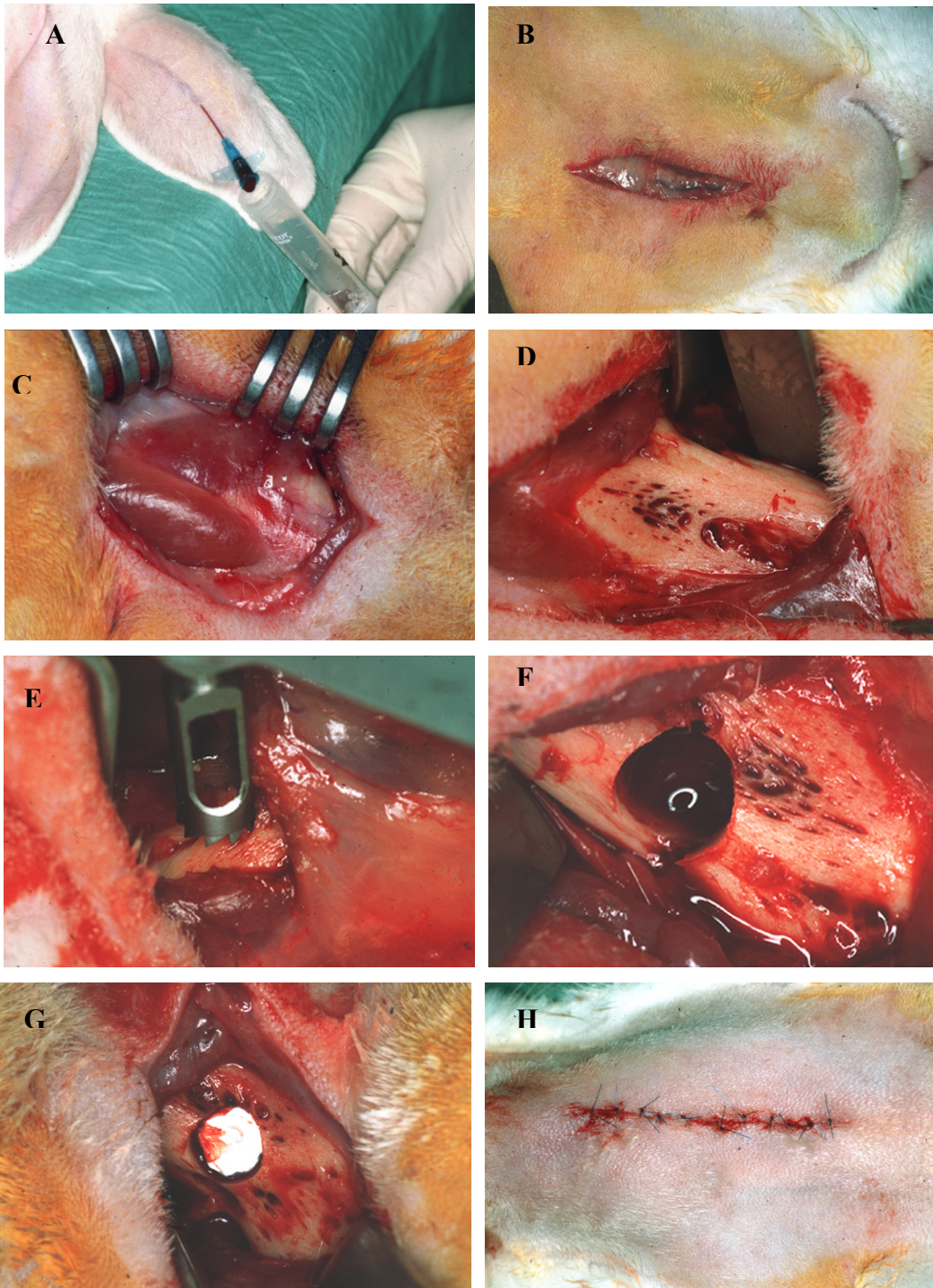
Am rasierten Ohr wurden aus einer Ohrvene Blutproben entnommen. Die Monovetten wurden sofort kühl gelagert und anschließend als Vollblut und abzentrifugiertes Serum der Auswertung zugeführt um eventuelle systemische Auswirkungen des VEGF<sub>165</sub> auf den Gesamtorganismus festzustellen. Zum Erreichen einer lokalen Blutarmut und einer lokalen Analgesie wurde in die Submandibularloge links und rechts 1,2 ml 2%iges Ultracain injiziert.

Nach Abdeckung der Tiere und Darstellung der submandibulären Region wurde eine mediane Inzision von ca. 4 cm durchgeführt. Unter Schonung der Gefäße und Nerven wurde möglichst atraumatisch auf den Unterkieferunterrand präpariert. Dabei wurde die Sehne der Muskelschlinge, gebildet aus dem Musculus masseter und dem Musculus pterygoideus medialis, durchtrennt. Auftretende Blutungen wurden mit der bipolaren Pinzette koaguliert. Anschließend wurde im Bereich des Unterkieferrandes das Periost durchtrennt und mit einem Raspatorium der Korpusbereich subperiostal präpariert. Dies erfolgte sowohl auf der bukkalen



wie auch auf der lingualen Korpusoberfläche. Die Konstruktion des bikortikalen Implantatbettes erfolgte mit einem Trepanbohrer mit 5mm Aussendurchmesser. Der Bohrer wurde dabei vorsichtig auf der bukkalen Fläche angesetzt und der Bohrvorgang erfolgte drucklos in die linguale Richtung. An der lingualen Fläche wurde ein Raspatorium zum Schutz der Weichgewebe gelagert. Um eine Überhitzung zu vermeiden wurde ständig mit steriler Kochsalzlösung gekühlt. Auf jeder Kieferhälfte wurde 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 VEGF<sub>165</sub> in die Implantatlager. Bis zum Zeitpunkt der Implantation wurden die Implantate bei -25°C gelagert. Zur Gewinnung von Leerproben blieben einige Implantatlager leer und füllten sich mit einem Blutkoagel. 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). Zum weiteren Schutz der Wunde wurde anschließend noch ein Sprühpflaster aufgesprüht.

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 wurde kontrolliert. Unmittelbar postoperativ waren die Tiere, bedingt durch die Nachwirkungen der Narkose und des Eingriffs, bei der Nahrungsaufnahme eingeschränkt. Alle operierten Kaninchen tolerierten die Narkose sowie die Operation gut. Bis auf einige Blutungen, die gestillt werden konnten, blieb der operative Eingriff an den Tieren komplikationslos.



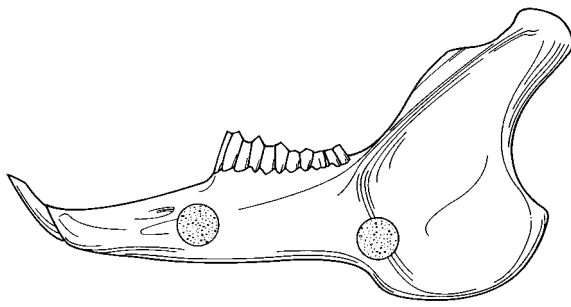
**Abb. 3:** Operativer Verlauf.

## 2.6. Operatives Verfahren - Explantation - Paraffineinbettung

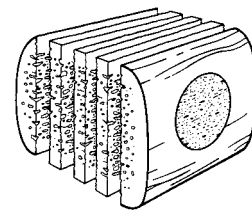
Zur Entnahme der Proben in der zweiten Operation nach 3, 7, 14 oder 28 Tagen erfolgte nach der bereits beschriebenen Narkotisierung und der Blutentnahme aus der Ohrvene die exzitationslose Opferung der Kaninchen mittels intrakardialer Injektion von 2ml des Tötungsmittels T61. Nach Diagnose des Todes wurden Organproben von Herz, Leber, Niere, Milz, Speicheldrüse und Lymphknoten und eine Urinprobe direkt aus der Harnblase zur weiteren Diagnostik entnommen.

Nach Opferung der Tiere, Exartikulation des Unterkiefers und Entfernung des Weichgewebsmantels wurden die Implantatlager makroskopisch betrachtet und untersucht. Bei sehr wenigen Tieren waren Zeichen einer Infektion des Präparationsbereichs zu erkennen. Diese Präparate wurden nicht bewertet. Die makroskopischen Befunde unterschieden sich einerseits in der Einlageform (Leer, Kollagen oder VEGF<sub>165</sub>) und in der Einlagezeit bis zur Explantation (3, 7, 14 oder 28 Tage).

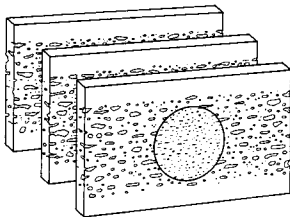
Zur radiologischen Untersuchung wurden von den implantierten Regionen Röntgenbilder mit einem Langtubusröntgengerät bei definierter Einstellung (70 kV, 7 mA) auf Zahnfilmen (2,5 x 4,0 cm) aufgenommen. Anschließend wurde der Defektbereich als Gesamtprobe, mit dem Implantations- bzw. Regenerationsbereich, 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.



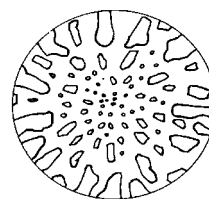
**a**



**b**



**c**



**d**

**a)** Proben noch im Korpusbereich und im Kieferwinkel

**b** und **c)** Histologische Schnitte aus der Probe nach Explantation, Fixierung und Einbettung

**d)** regenerierter und auszuwertender Bereich der Probe

### **Entkalkung:**

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

- 1.) 24h Fixierung der Probe in 4% Paraformaldehyd bei 4°C (pH 7,3) ; das Gefäß muss mindestens ein sechsmal größeres Volumen haben als die Probe
- 2.) 24h Spülung der Probe in 0,1 m PBS (pH 7,4) bei 4°C mit dreimaligem Wechsel der Lösung
- 3.) Lagerung der Probe in einem 10 ml fassenden Gefäß in 20% EDTA versetzt mit 0,2% Paraformaldehyd (pH 7,3) bei RT für 8 –10 Wochen zur Entkalkung; wöchentliches Wechseln der Lösung und ständige Rührung auf einem Magnetrührer; der Endpunkt des Entkalkungsvorgangs wird durch stichprobenartige Röntgenkontrollen und Erfahrungswerte des Labors festgestellt
- 4.) 24h Spülung der Probe in 0,1 m PBS (pH 7,4) bei 4°C mit dreimaligem Wechsel der Lösung
- 5.) Entwässerung in Alkohol:
  - 24h 50% Alkohol
  - 24h 70% Alkohol
  - 24h 90% Alkohol
  - 24h 96% Alkohol
  - 24h 100% Isopropanol
- 6.) 24h –72h Lagerung in Zedernholzöl
- 7.) 24h Lagerung in einem Zedernholzöl-Paraffingemisch im 1:1 Verhältnis
- 8.) 24h Lagerung in reinem Paraffin bei 60°C
- 9.) 4 x 24h Lagerung in vier verschiedenen Paraffin-Polymer-Bädern bei 60°C
- 10.) Einbetten in Paraffin in einer ausreichend großen Gussform und Abkühlung bei Raumtemperatur
- 11.) Anschneiden und Aufblocken der Paraffinblöcke auf Holzwürfel zum Einspannen in das Rotationsmikrotom und zum Erstellen der Schnitte
- 12.) Schneiden von 10 µm Schnitten aus der Probenmitte
- 12.) Aufziehen der Schnitte auf Objektträger und trocknen auf einer Wärmplatte

Gestützt auf das theoretische Modell der Knochenregeneration, welches besagt, dass knöcherne Defekte von außen, sprich 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. Dort kann das maximale Ergebnis innerhalb des Untersuchungszeitraumes beurteilt werden. Zudem sind so eventuelle Einflüsse der Weichgewebe an der Oberfläche der Knochenproben von den Schnitten ausgeschlossen und beeinflussen so die Auswertung nicht.

## 2.7. Färbemethoden

Für die verschiedenen Untersuchungen (histologisch und histomorphometrisch) wurden die Proben nach Färbemethoden getrennt und nach folgenden Protokollen mit Azanfärbung, Hämatoxylin-Eosinfärbung nach Mayer und Hornowsky-Goldner-Färbung verarbeitet.

Für die histomorphometrische Auswertung wurden die Präparate nach folgender Beschreibung mit Azan gefärbt.

### **Azanfärbung** [Romeis 1989]

2 x 10 min Xylol ( I/II )

2 x 10 min 100% Isopropanol

2 x 10 min 96% Alkohol

5 min Celloidin-Äther

10 min 70% Alkohol

10 min Aqua dest.

10 min Azocarmin bei 60°C

kurz in Aqua dest.

kurz in Anilinöl-Alkohol ( bis Farbe bischofsrot wird )

1-2 min Eisessig-Alkohol

4 x 10 min 5% Phosphorwolframsäure

10 min Aqua dest.

10 min Anilinblau-Orange G

kurz Aqua dest.

kurz 50% Alkohol

kurz 70% Alkohol

5 min 96% Alkohol ( I )

10 min 96 % Alkohol ( II )

2 x 10 min 100% Isopropanol ( I/II )

10 min Carboxyxytol

2 x 10 min Xylol ( I/II )

mit Metacrylat und einem Schutzglas eindecken und trocknen lassen

Differenzierung der Färbung:

Zellkerne: rot

Zytoplasma: rötlich

Elastische Bindegewebsfasern: orange-rot

Retikuläre und kollagene Bindegewebsfasern: hellblau-blau

Hyaliner Knorpel: blassblau (rötlich)

Erythrozyten: rot-orange

### **Hämatoxylin-Eosinfärbung nach Mayer [Romeis 1989]**

2 x 10 min Xylol ( I/II )

2 x 10 min 100% Isopropanol ( I/II )

2 x 10 min 96% Alkohol ( I/II )

5 min Celloidin-Alkohol-Äther

10 min 70% Alkohol

10 min Aqua dest.

10 min Hämatoxylin n. Mayer

30 min fließend wässern

2-5 min Eosin

kurz Aqua dest.

kurz 50% Alkohol

kurz 70% Alkohol

5 min 96% Alkohol

2 x 10 min 100% Isopropanol ( I/II )

10 min Carboxyxylyl

2 x 10 min Xylol ( I/II )

eindecken in DePeX und eine Stunde waagrecht trocknen lassen

Differenzierung der Färbung:

Zellkerne: blau

Zytoplasma: blassrot

Elastische Bindegewebsfasern: blassrosa

Kollagene Bindegewebsfasern: rot



Hyaliner Knorpel: blassblau-blau

Erythrozyten: orange-rot

Knochen: rötlich

### **Hornowsky-Goldner-Färbung** [Romeis 1989]

2 x 10 min Xylol ( I/II )

2 x 10 min 100% Isopropanol ( I/II )

2 x 10 min 96% Alkohol ( I/II )

10 min 80% Alkohol

15 min Resorcin-Fuchsin nach Weigert

1-2 min Eisenhämatoxylin nach Weigert

10 min fließend wässern

5 min Azophloxin, Ponceau de Xylidine

spülen mit 1% Essigsäure

2 min Phosphomolybdänsäure-Orange ( Diff. bis koll. Bgw. farblos )

spülen mit 1% Essigsäure

2 min mit 1% Lichtgrün abtupfen

5 min 1% Essigsäure

3 x 10 min absteigende Alkoholreihe

2 x 10 min Xylol ( I/II )

mit Metacrylat und einem Schutzglas eindecken und waagrecht trocknen lassen.

Sämtliche Objektträger werden während des Trocknens mit einem Bleigewicht beschwert,

anschließend wird das überschüssige Metacrylat/DePeX entfernt.

Differenzierung der Färbung:

Zellkerne: dunkelbraun-schwarz

Zytoplasma: rot

Elastische Bindegewebsfasern: schwarz

Kollagene Bindegewebsfasern: grün

Knochen: türkis-hellblau

## **2.8. Auswertungskriterien und Auswertungsmethoden**

### **2.8.1. Histologische Untersuchung**

Vor der Auswertung erfolgte eine sorgfältige Auswahl der Präparate. Herangezogen wurden unbeschädigte und fehlerfreie Proben der 3-, 7-, 14- und 28-Tages Tiere. Defekte oder fehlerhaft geschnittene Präparate wurden verworfen, wobei auch berücksichtigt wurde, dass keine großen Varianzen in der Auswahl der Schnittebene lagen und Präparate nicht durch Quetschungen und Ausrisse disloziert waren. Anhand der Färbungen (Azan, HE, Hornowsky-Goldner) wurde zuerst eine qualitative Bewertung und Beschreibung von endothelialen und osteoblastären Zelltypen, der angiogenen und osteogenen Front, der Regenerationsrichtung, des morphologischen Gradienten im Regenerationsbereichs und des Regenerationsfortschritts in lichtmikroskopischer Betrachtung durchgeführt. Dabei wurden Gewebsunterschiede, Knochen- und Blutzellen, die Knochenreife, das Ausmaß der knöchernen Überbrückung und der morphologische Gradient berücksichtigt. Der Vergleich erfolgte unter den einzelnen Gruppen und im zeitlichen Verlauf. Regenerationsunterschiede innerhalb eines Präparates, besonders zwischen den Randbereichen und dem Zentrum, wurden durch vergleichende Bewertung in definierten Bereichen erhoben.

### **2.8.2. Histomorphometrie – Knochenfläche und Knochenflächendichte**

Unter der Fragestellung, ob der angiogene Faktor VEGF<sub>165</sub> die ossäre Regeneration beschleunigt und dichteren Knochen entstehen lässt, wurde nach einer rein deskriptiven Betrachtung eine quantitative Analyse durchgeführt. Die quantitative Analyse für die Knochenneubildung bestand aus den Parametern regenerierte Knochenfläche und Knochenflächendichte. Hierbei war die Histomorphometrie das Standardverfahren. Sie ist definiert als die quantitative Messung von morphologischen Eigenschaften an einem histologischen Probestück durch Lichtmikroskopie. Mit ihr kann man an volumetrische Informationen gelangen, indem man eine flache, geschnittene Oberfläche einer Struktur betrachtet [Hollinger und Kleinschmidt 1990].

Für die Histomorphometrie wurden Azan-gefärbte Präparate der Tiere nach 28 Tagen herangezogen. Die Proben der anderen Zeitpunkte wiesen eine noch nicht ausreichende Verknöcherung auf, um damit eine histomorphometrische Auswertung machen zu können. Im Institut für Anatomie der WWU Münster wurden die Objektträger mit dem Fotomikroskop Diaphot-TDM 114 fotografiert. Die Belichtung erfolgte einheitlich für alle Bilder auf Kodak-Ektachrome-Diafilmen. Ausgewählt wurde dabei eine insgesamt 40fache Vergrößerung (1,25fache Vergrößerung des Objektivs), eine Helligkeitseinstellung von 3,5V und ein Gelbfilter. Die Entwicklung der Filme erfolgte im zentralen Fotolabor der Zahnklinik der WWU Münster unter regelmäßig und konstant ablaufenden Entwicklungsbedingungen ab. Die Dias wurden unter Verwendung des Programms Adobe Photoshop 5.0 eingescannt, digitalisiert und manuell ausgemessen. Die Einstellungsoptionen des Scanners wurden auf die histologisch interessanten Strukturen optimiert und umfassten folgende Größen:

- TWAIN 23
- Select Source: DS Dual 2.0.0 D
- Auflösung: Eingabe: 2438 dpi; Ausgabe: 2400 dpi
- Einlegen der 35 mm Farb-Diapositive in den Scan-Halter und Einbringen in das Gerät zum Scanvorgang
- Nach einem Probescan zur Optimierung des Bildfeldes wurden störende Randbereiche zur Vermeidung von Ungenauigkeiten ausgeblendet
- Hauptscanvorgang
- Speicherung im JPEG und TIFF – Format.

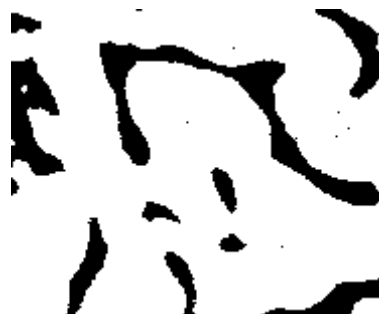
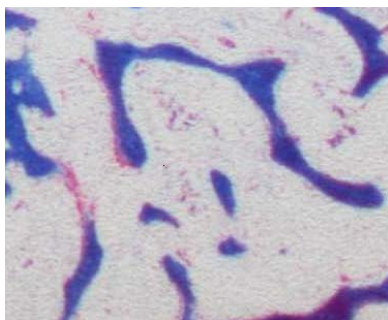
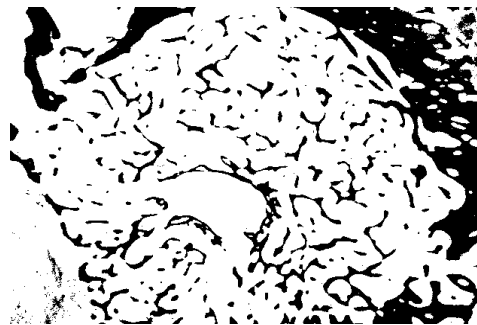
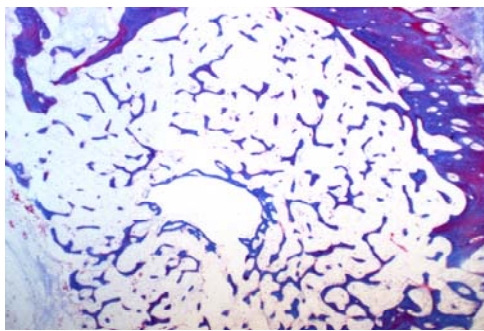
Die Messung der Knochenflächen und Knochenflächendichten im Regenerat wurde mit dem Bildbearbeitungsprogramm Scion Image<sup>®</sup> 4.02 der Firma Scioncorporation USA durchgeführt. Die 40fache Vergrößerung deckte den randständigen Knochen und alle Bereiche des regenerierten Knochens ab.

Für die histomorphometrische Messung war es erforderlich, die Farbpositive mit den überarbeiteten blauen Flächen in binäre Bilder mit schwarzen Pixeln, welche diesen blauen Flächen entsprachen, zu überführen.

Nach Vergleich mit dem Farbpositiv und eventuellen zusätzlichen Korrekturen mit Instrumenten des Programmes Scion Image<sup>®</sup> 4.02, zum Beispiel das Radieren von Artefakten, erkannte und umriss die Bildbearbeitungssoftware Scion Image<sup>®</sup>4.02 die neugebildeten Knochenflächen und errechnete anhand der Pixelgröße der markierten Bereiche und über Kalibrierung der Pixel in das entsprechende Flächenmaß die Flächengröße.

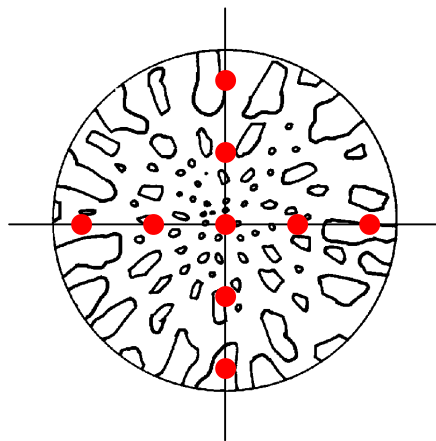
Die Messung an einem fotografierten Okularmikrometer in Originalbildgröße ergab einen Wert von 0,101 Pixel pro  $\mu\text{m}$ .

In einer zweiten Messung wurde dieser Wert zum invertierten Bohrloch in Relation gesetzt und daraus der prozentuale Wert der neugebildeten Knochenfläche errechnet.



**Abb. 4:** Farbdiapositive und den Knochenflächen entsprechende binäre Bilder in Übersicht und vergrößert.

Zusätzlich zur Bestimmung der Knochenflächenneubildung durch digitale Berechnung wurde die Knochenflächendichte an 9 definierten und repräsentativen Bereichen (Abb. 5), verteilt über 2 Histogrammlinien, die im 90° Winkel zueinander lagen und ein Fadenkreuz bildeten. Es lagen 2 Messbereiche an jeder Achse im äußeren und inneren Randbereich und ein Messbereich im Schnittpunkt beider Histogrammlinien. Die Größe der 9 Messbereiche war definiert und gleich. Die Pixelgröße der neugebildeten Knochenfläche innerhalb des Messbereich ergab einen relativen qualitativen Dichtewert im Vergleich mit der Fläche des Messbereichs. Dieser Wert wurde für 9 Werte aus 9 Messbereichen bestimmt und daraus der Mittelwert errechnet. Zu beachten war zusätzlich, dass die gemessenen Dichtewerte im Regenerat mit der ortsspezifischen Knochendichte des ursprünglichen Knochens ausserhalb des Regenerats (100%-Wert) verglichen wurden. Diese 100%-Werte wurden an 4 entsprechenden Messbereichen im ortständigen Knochen gemessen. Zu diesem Wert wurden die Werte der Messbereiche im Regenerat ins Verhältnis gesetzt und stellten die Prozentwerte der Knochendichte dar. Beide Untersuchungen wurden statistisch mit dem T-Test für unabhängige Stichproben ausgewertet.



**Abb. 5:** Neun definierte Messpunkte innerhalb der regenerierten Fläche zur Bestimmung der Knochenflächendichte.

### **2.8.3. Auswertung der Gefäßzahl**

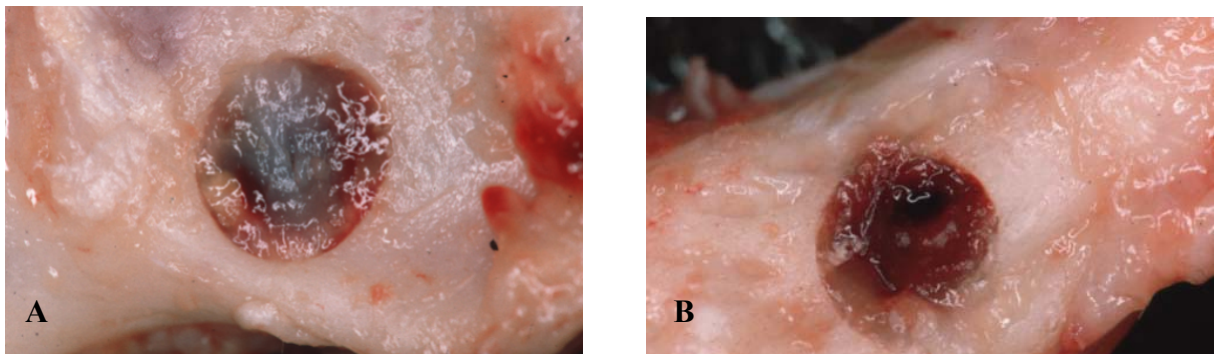
Zunächst wurden für jede Probe bei 40 bis 400 facher lichtmikroskopischer Vergrößerung auf deskriptive Weise die morphologischen Kriterien untersucht und miteinander verglichen. Zudem wurde das Verteilungsmuster der Gefäße in den Übergangsbereichen vom ortsständigen Knochen zum neugebildeten Knochen, bis hin zur Implantat- bzw. Defektmitte beurteilt.

Die Bestimmung der Gefäßzahl erfolgte durch Zählung der Gefäße in 9 Meßbereichen für jede Probe. Die Messbereiche bei 100 facher Vergrößerung waren in Form eines Fadenkreuzes ( siehe Abb. 5) ausgerichtet und deckten alle relevanten Bereiche vom Rand bis zum Zentrum ab. Gleichzeitig wurde das Verteilungsmuster der Gefäße in den Übergangsbereichen vom ortsständigen Knochen zum neugebildeten Knochen, bis hin zur Implantat- bzw. Defektmitte, beurteilt.

### 3. ERGEBNISSE

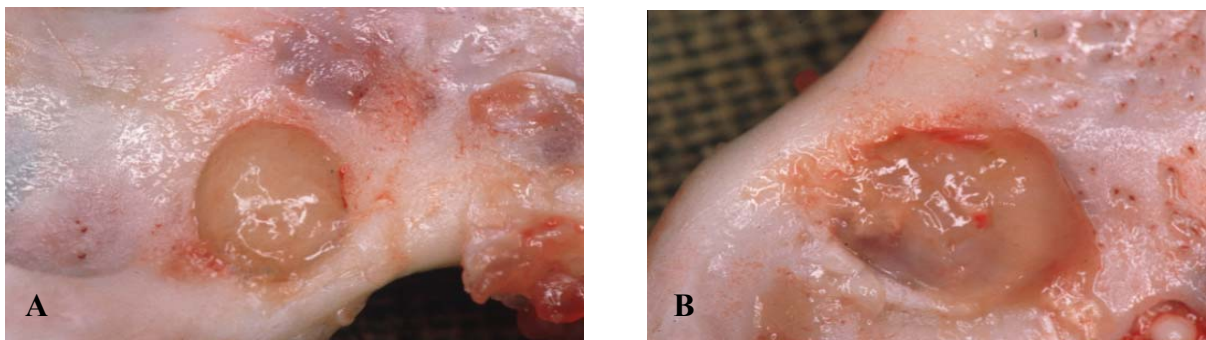
#### 3.1. Makroskopisch-klinische Beurteilung

Die Proben ohne Einlage (Leer) weisen nach 3 Tagen klinisch einen, den Defekt voll ausfüllenden, spaltfreien und festen Blutkoagel auf. Jegliche Anzeichen der Hartgewebsbildung fehlen.



**Abb. 6:** Stabiles randbildendes Koagel nach drei Tagen in Regio 4 (A) und 3 (B) in einem ungefüllten Defekt.

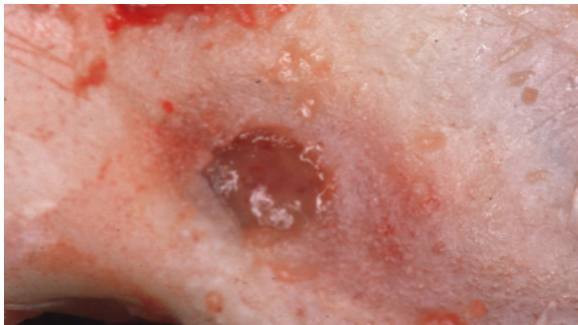
Bei den Kollagenproben ohne Faktorzusatz und mit VEGF<sub>165</sub> ist nach 3 Tagen die für Kollagenimplantate typisch retikuläre Kollagenstruktur noch deutlich zu erkennen, wobei das Kollagen durch die Durchsetzung mit Blut an Volumen zugenommen hat und eine Quellungstendenz vorweist.



**Abb. 7:** Deutliche Quellungstendenz des Kollagenimplantates nach drei Tagen in Regio 2 (A) und 3 (B).

Am 7. Tag kann klinisch nicht nach Einlageform differiert werden. Die Kollagenproben mit Wachstumsfaktor weisen deutlichere Veränderungen auf als das unbehandelte Kollagen. Eine fortgeschrittene Verknöcherung ist in allen 3 Gruppen klinisch-makroskopisch nicht auszumachen.

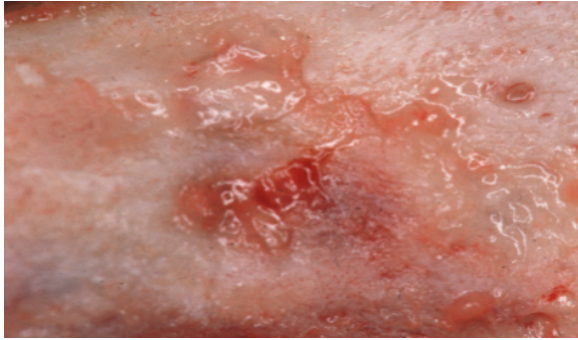
Erst am 14. Tag ist in allen Gruppen (Leer, Kollagen und VEGF<sub>165</sub>) eine knöcherne Rgeneration in den Randzonen auch makroskopisch feststellbar. Insgesamt betrachtet ist am 14. Tag in allen drei Gruppen die Regeneration des Knochens erkennbar, wobei in der Gruppe mit VEGF<sub>165</sub> deutlichere Fortschritte zu erkennen sind. Hier sind im zentralen Bereich noch Kollagenstrukturen ersichtlich. Bei der reinen Kollageneinlage und der Leerproben ist es lediglich in äußeren Randbereichen zu einer Knochenneubildung gekommen.



**Abb. 8:** Defekt aus der Studiengruppe mit VEGF<sub>165</sub> – Freisetzung nach 14 Tagen.

Am 28. Tag ist bei den Proben mit Faktor-Kollagen-Komplex das Lumen fast restlos knöchern regeneriert. Die Verknöcherung ist homogen und auch im Zentrum fortgeschritten. Bei einigen Ausnahmen ist im Zentrum noch Kollagen und weiches fibrochondroides Gewebe sondierbar und erkennbar. Bei den Leerproben ist die Ausrichtung der Verknöcherung ebenfalls vom Rand zum Zentrum hin. Die Ausprägung und die Veränderung zu den Proben nach 14 Tagen ist jedoch schwach. Fast unverändert ist die Ausprägung bei den Kollagenproben ohne Faktorzusatz. Die Verknöcherung ist hier auf den inneren und äußeren Randbereich begrenzt und nimmt auch lediglich hier zu. Es liegen deutliche Unterschiede vom Rand zum Zentrum vor.

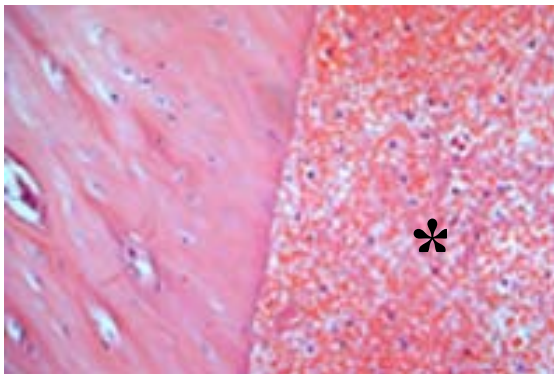




**Abb. 9:** Defekt aus der Studiengruppe nach VEGF<sub>165</sub> – Freisetzung nach 28 Tagen.

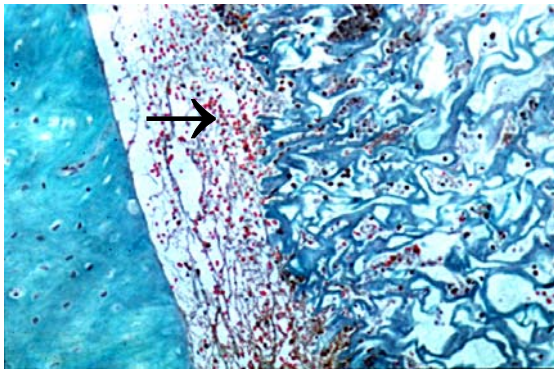
### 3.2. Mikroskopisch-histologische Auswertung

Bei den Leerproben sind nach 3 Tagen weder Blutgefäße noch Bindegewebszellen zu identifizieren. Unmittelbar am ortsständigen Knochen grenzt ohne Randspaltbildung das Blutkoagel an. In diesem sind dunkle Leukozyten von den roten Erythrozyten mit einer Verhältnis von 1:10 gut zu unterscheiden.

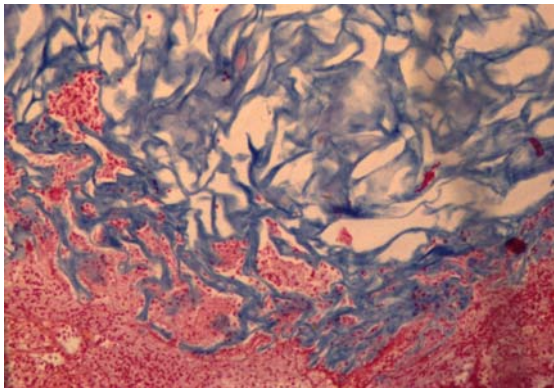


**Abb. 10:** Leerprobe nach 3 Tagen (HE, Vergrößerung 200x)- angrenzend an ortsständigem Knochen ist ein Blutkoagel (\*) aus überwiegend Erythrozyten dargestellt.

Die Proben mit dem Kollagenimplantat mit und ohne Faktorzusatz zeigten nach 3 Tagen die retikuläre Struktur des Kollagens, wobei diese mit Blutzellen durchsetzt und wegen diesen vom Randbereich losgelöst ist. Dies deutet auf einen fehlenden Kontakt zwischen dem Kollagen (mit und ohne Faktor) und dem ortsständigen Knochen. Der Zwischenraum wird von einem Blutkoagel mit fibrinoiden Fasern und Granulationsgewebe, unter anderem Mikrophagen und neutrophilen Granulozyten, eingenommen. Bindegewebs- und knochenbildende Zellen liegen nicht vor.

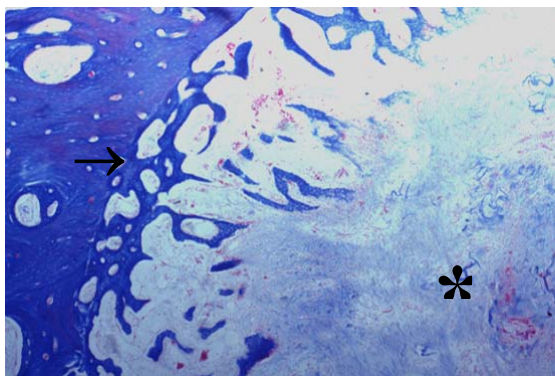


**Abb. 11:** Kollagen mit VEGF<sub>165</sub> am 3. Tag (Hornowsky-Goldner, Vergrößerung 200x)- am Rand trennt die beginnende Histiolyse (→) das implantäre Kollagen vom ortsständigen Knochen.

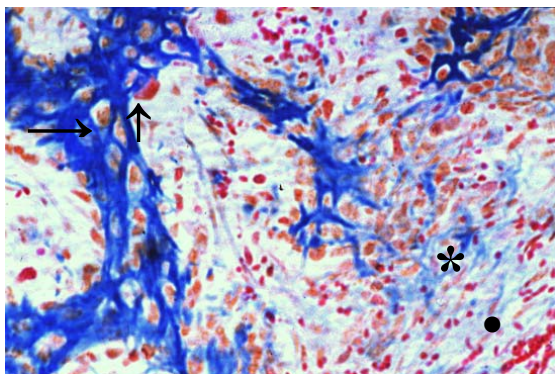


**Abb. 12:** Kollagen (ohne VEGF) nach 3 Tagen (Azan, Vergrößerung 200x)- Kollagen mit Blutzellen durchsetzt, im Randbereich trennt das Koagel das Implantat vom Knochen.

In den 7-Tages-Leerproben lassen sich bereits Anzeichen für ein organisiertes Wachstum erkennen. In den äußeren Bereichen sind Zonen mit Knochenneubildung zu finden. Vom randständigen Knochen spriest ungeordnet und vereinzelt fibroossäres Gewebe ein. Einem Gradienten folgend schließen sich diesen Bereiche mit Bindegewebe und Kollagenfasern als Zwischenstufe der Regeneration an. Schließlich liegen in der Mitte der Proben nach 7 Tagen noch nicht resorbierte Blutzellen und Granulationsgewebe vor. Die Gefäßneubildung ist mit einigen Arteriolen auf den Randbereich begrenzt.

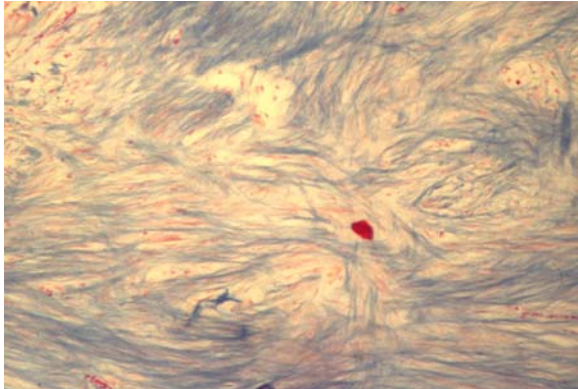


**Abb. 13:** Leerprobe nach 7 Tagen (Azan, Vergrößerung 40x)- am ortständigen Knochen beginnende Ossifikation (→), im Zentrum organisiertes Koagel (\*).



**Abb. 14:** Leerprobe nach 7 Tagen (Azan, Vergrößerung 400x)- Übergangsbereich von der randständigen Ossifikation zum Zentrum, Osteozyten (→), Osteoblast (↑), Osteoid (\*) und Kollagenfasern (●).

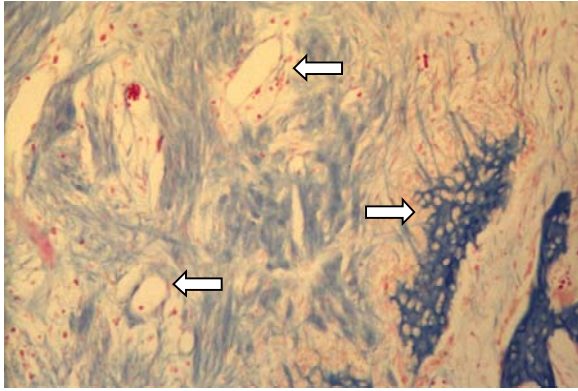
Die Proben mit reinem Kollagen weisen nach 7 Tagen zentral nur ein Kollagengerüst aus neugebildetem, faserigem Kollagen, welches von Fibrinfäden durchzogen ist, auf (Abb. 15). Ein Hinweis auf Resorption oder Einsprossung vom randständigen Knochen und Neubildung von trabekulärem Knochen liegt nicht vor. Bei wenigen Proben sind an der Grenze zum ortständigen Knochen einzelne Gefäße kleineren Kalibers zu sehen.



**Abb. 15:** Kollagenprobe nach 7 Tagen (Azan, Vergrößerung 200x)- zentraler Bereich, neugebildetes, faseriges Kollagen, frei von Blutzellen.

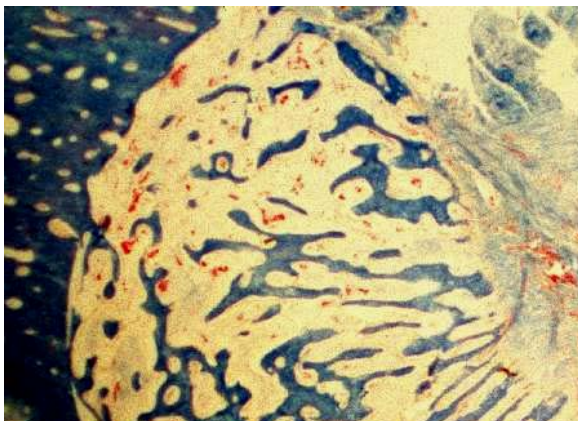
Die VEGF<sub>165</sub> Proben mit 7 Tagen Verweildauer zeigen einen Gradienten vom Rand zum Zentrum. Das Kollagengerüst, bestehend aus implantiertem und neugebildetem Kollagen, ist im Zentrum aufgrund von Resorptionen von Blutzellen befreit. Die Struktur des implantierten Kollagens ist verändert und von neugebildetem-faserigen Kollagen durchsetzt. In den äußeren Bereichen ist die Resorption des Kollagen zu sehen. Den durch die Resorption des Kollagens entstehenden Raum füllt neugebildetes osteochondroides Gewebe.



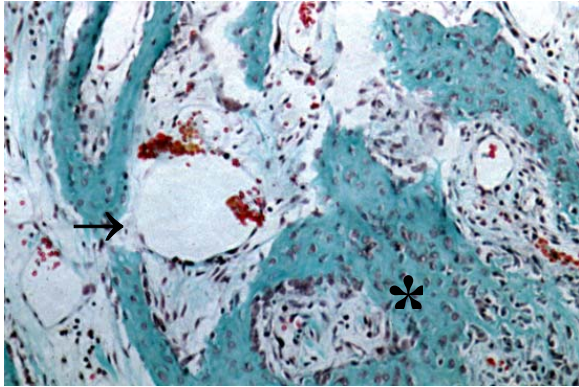


**Abb. 16:** Kollagen mit VEGF<sub>165</sub> nach 7 Tagen (Azan, Vergrößerung 200x)- es liegen kleine und mittelgroße Gefäße (←) vor der Knochenneubildungsfront (→) zwischen zellfreiem Kollagen vor; es handelt sich um retikuläres Implantatkollagen und neugebildete Kollagenfasern.

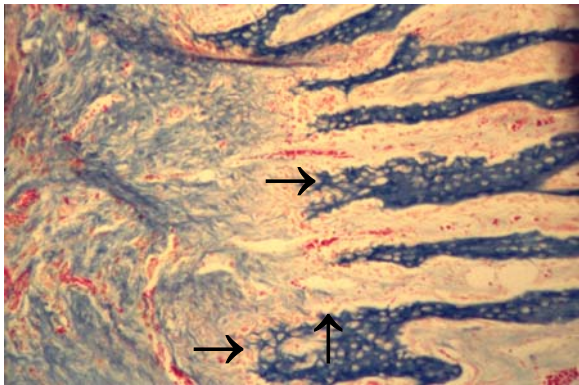
Bei den Leerproben 14 Tage post operationem hat bereits eine Knochenneubildung angefangen. Der ursprüngliche Bohrdefekt lässt sich aufgrund lakunären Resorptionszonen nicht mehr abgrenzen. Aus den Lakunen sprießen Knochen trabekel in den Defekt. Der neugebildete trabekuläre Knochen ist freiliegend und unstrukturiert. Zwischen dem neugebildeten Knochen liegen Blutgefäße und teilweise Knochenmarksräume. Zum Zentrum hin sind an der Knochenneubildungsfront chondroide Strukturen nachzuweisen.



**Abb. 17:** Leerprobe nach 14 Tagen (Azan, Vergrößerung 40x)- randständig fortgeschrittene trabekuläre Knochenneubildung, zum Zentrum hin Kollagen.

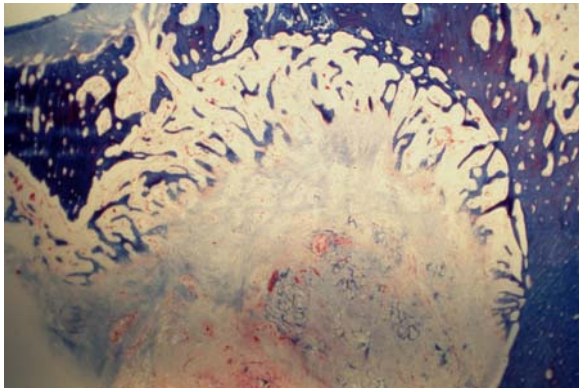


**Abb. 18:** Leerprobe nach 14 Tagen (Hornowsky-Goldner, Vergrößerung 200x)- große randständige Blutlakunen (→) und trabekulärer Knochen (\*).

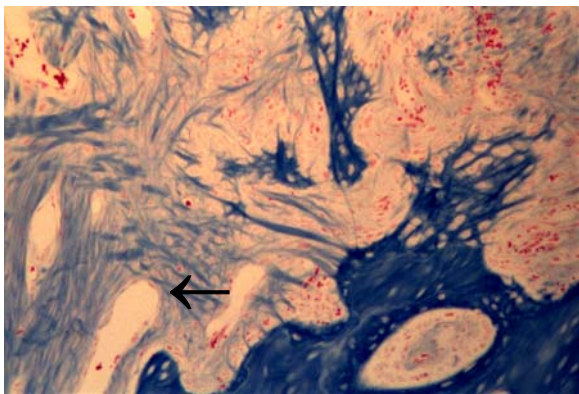


**Abb. 19:** Leerprobe nach 14 Tagen (Azan, Vergrößerung 100x)- zum Zentrum hin deutlich weniger und kleinere Gefäße (↑) und chondroide Strukturen (→)

Nach 14 Tagen ist bei der reinen Kollagenprobe die Osteogenese nur gering fortgeschritten. Im Grenzbereich zum ortständigen Knochen liegt wenig trabekulärer Knochen. Dazwischen sind vereinzelt Blutgefäße mit großem Querschnitt zu erkennen. In der Peripherie sind säulenartiger Faserknorpel und neugebildete Kollagenfasern und im Zentrum noch Reste von dem Kollagenimplantat sichtbar. Der morphologische Gradient ist primitiv ausgebildet. Am Rand ist eine klassische Osteozytenneubildung zwischen ortständigem und neuem Knochen zu erkennen.



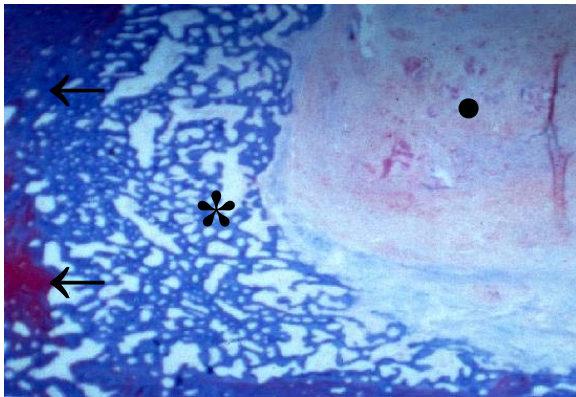
**Abb. 20:** Kollagenprobe nach 14 Tagen (Azan, Vergrößerung 40x)- lockerer trabekulärer Knochen im Randbereich, primitiver morphologischer Gradient, in zentraleren Bereichen neugebildete Kollagenfasern und Reste vom Implantat.



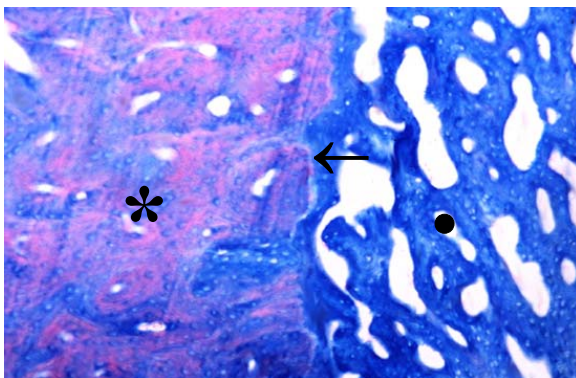
**Abb. 21:** Kollagenprobe nach 14 Tagen (Azan, Vergrößerung 200x)- neugebildete Kollagenfasern und fibro-chondroider Faserknorpel an ortsständigem Knochen, vereinzelt Venolen (←) zu erkennen.

Die VEGF<sub>165</sub> Proben weisen nach 14 Tagen fast alle Differenzierungsstufen der Osteogenese auf. Die Struktur des Kollagens ist deutlich durch zunehmende Ausbildung endothelialer Kapillaren verändert. Diese befinden sich sowohl innerhalb des neugebildeten trabekulären Knochens wie auch in der Knochenneubildungsfront und haben einen wesentlich großen Querschnitt.

Die letzte Stufe der Osteogenese endet unmittelbar am ortsständigen Knochen mit geflechtartigen Strukturen, wobei eine deutliche Unterscheidung aufgrund der Randkonturierung, als Folge der lakunenartigen Osteointegration des jungen Knochen in den ortsständigen Knochen, möglich ist. Zum Zentrum des Implantates hin ist mit seinem säulenartigen Aufbau und den Zwischenstufen Faserknorpel und fibrochondroides Gewebe zu sehen.

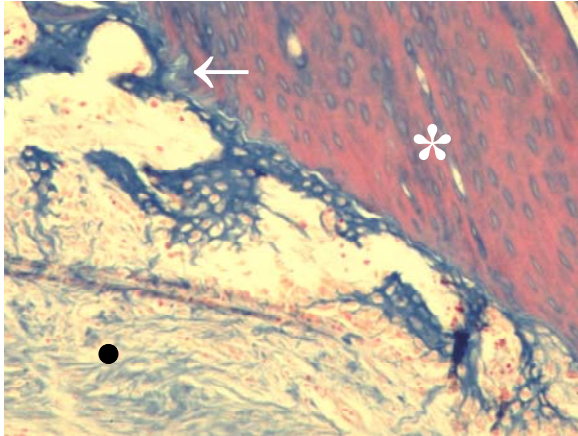


**Abb. 22:** Kollagenprobe mit VEGF<sub>165</sub> nach 14 Tagen (Azan, Vergrößerung 40x )-morphologischer Gradient vom ortsständigen Knochen (←) zum Zentrum (•); im Randbereich sehr dichter neugebildeter Knochen (\*).



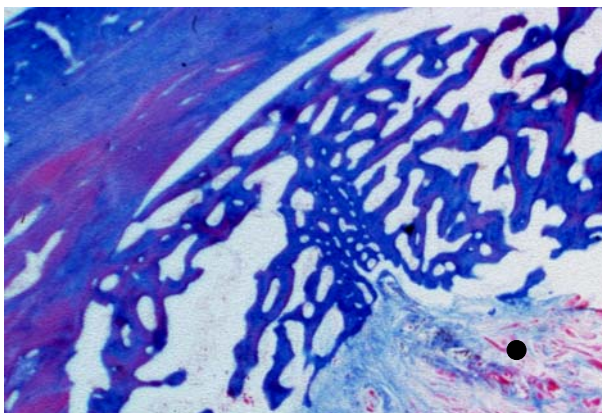
**Abb. 23:** Kollagenprobe mit VEGF<sub>165</sub> nach 14 Tagen (Azan, Vergrößerung 200x)- der strukturelle Unterschied zwischen ortsständigem (\*) und neugebildetem trabekulärem Knochen (•) und die Randkonturierung (←) sind deutlich.



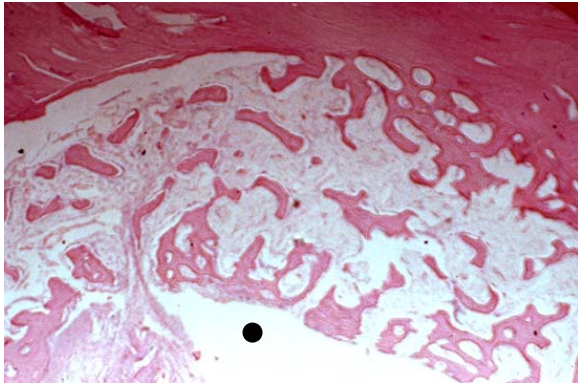


**Abb. 24:** Kollagenprobe mit VEGF<sub>165</sub> nach 14 Tagen (Azan, Vergrößerung 200x)-morphologischer Gradient, lakunenartig eingewachsener trabekulärer Knochen (←) am ortsständigen Knochen (\*), Faserknorpel (fibrochondroides Gewebe) und neugebildete Kollagenfasern zum Zentrum hin (•).

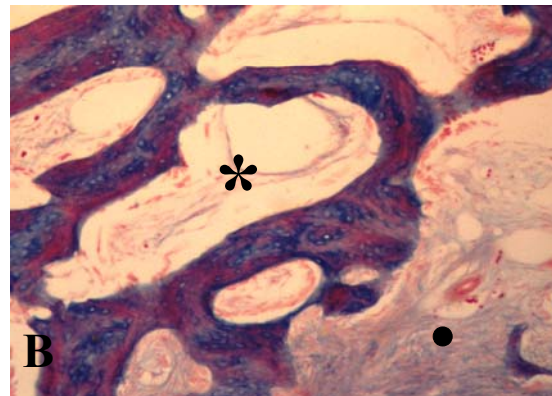
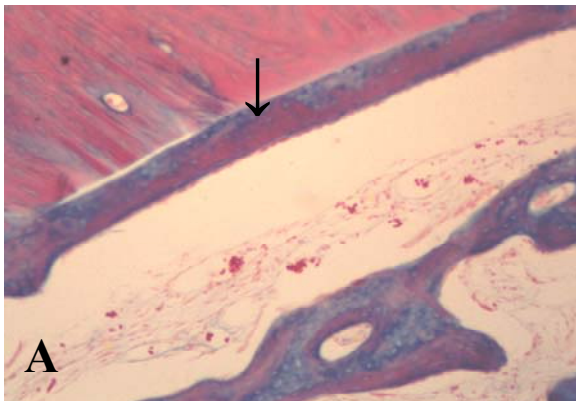
Am 28.Tag ist die Osteogenese in der Leerprobe deutlich fortgeschritten. Der ortsständige Knochen ist vom neugebildeten trabekulären Knochen klar zu differenzieren. Zwischen den locker verteilten Knochen trabekeln in der Neubildungszone im Randbereich sind einsproßende Kapillaren zu erkennen. Der intertrabekuläre Raum ist groß und zum Teil mit Bindegewebe aufgefüllt. Das Blutkoagel im Zentrum ist vollständig resorbiert und der Raum ist mit Bindegewebe aufgefüllt.



**Abb. 25:** Leerprobe nach 28 Tagen (Azan, Vergrößerung 40x)- randständige Knochenneubildung, im Zentrum knochenfreie Zone (•); die Konturen des Implantatlagers sind eindeutig zu erkennen und der neugebildete Knochen ist abgrenzbar.

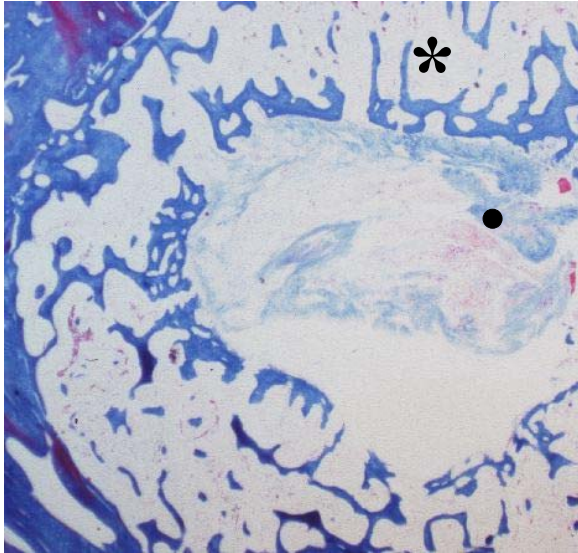


**Abb. 26:** Leerprobe nach 28 Tagen (HE, Vergrößerung 40x)- randständig aufgelockerte trabekuläre Knochenneubildung, im Zentrum gewebefreier Lumen (●).

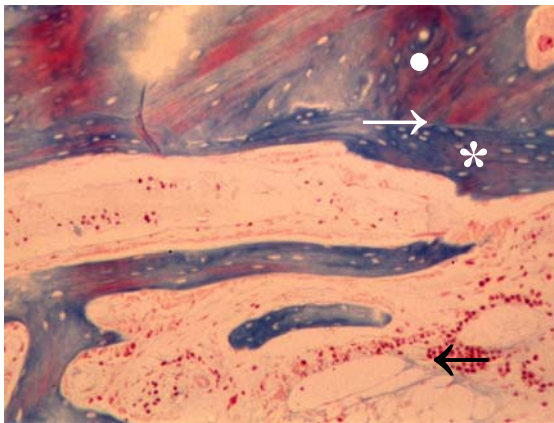


**Abb. 27:** Leerprobe nach 28 Tagen (Azan, Vergrößerung 100x)- (A) aufgelockerte und ausgereifte Knochenneubildung an der Randzone mit strukturellem Unterschied zum ortständigen Knochen (↓), keine Resorptionen am ortständigen Knochen; (B) zwischen dem neugebildeten Knochen liegen mesenchymales Gewebe und Kapillaren (\*), in zentralen Bereichen liegen vermehrt kollagene Fasern (●) vor.

Die Kollagenproben ohne Wachstumsfaktor zeigen nach 28 Tagen eine gering fortgeschrittene Knochen- und Gefäßneubildung. Im Grenzbereich zum ortständigen Knochen ist aufgelockerter trabekulärer Knochen regeneriert. Intertrabekulär sind retikuläres Gewebe und kleinere Gefäße zu finden. Zum Zentrum hin ist keine oder nur eine geringe Knochenneubildung nachweisbar. Der knochenfreie Raum im Zentrum wird von Kollagenfasern, mesenchymalem Gewebe und wenigen Gefäßen eingenommen.



**Abb. 28:** Kollagenprobe nach 28 Tagen (Azan, Vergrößerung 40x)- im Randbereich lockerer trabekulärer Knochen (\*), keine Verbindung zwischen ortsständigem und neugebildetem Knochen; zum Zentrum hin liegt Kollagen (•) vor; in der Mitte ist ein zell- und gewebefreies Lumen.

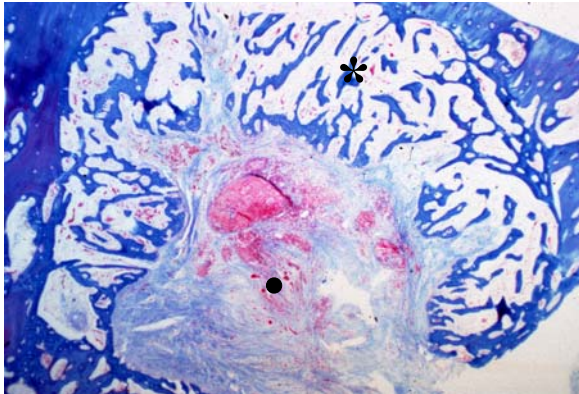


**Abb. 29:** Kollagenprobe nach 28 Tagen (Azan, Vergrößerung 100x)- in der Knochenneubildungszone (\*) im Randbereich liegen im knochenfreien Raum retikuläres Gewebe mit mesenchymalen Zellen und einzelne Gefäße (←) vor; erkennbar ist auch die Grenze (→) zwischen ortsständigem (•) und neugebildetem Knochen (\*).

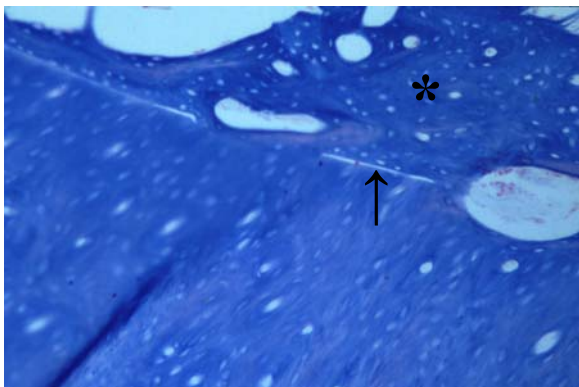
Die Proben der VEGF<sub>165</sub> Gruppe weisen nach 28 Tagen deutlich fortgeschrittene Differenzierungsgrade, dichtere Knochenstrukturen und eine zunehmende und ausgeprägte Vaskularisierung. Zwischen den sehr dichten trabekulären Strukturen sind neben retikulärem Bindegewebe mit mesenchymalen Zellen und vielen Blutgefäßen in großer Anzahl junge, neugebildete Blutzellen, eingebettet in retikulärem Bindegewebe, als Hinweis auf Knochenmarksbildung zu treffen. Am Übergang vom Implantat zum neugebildeten Knochen,



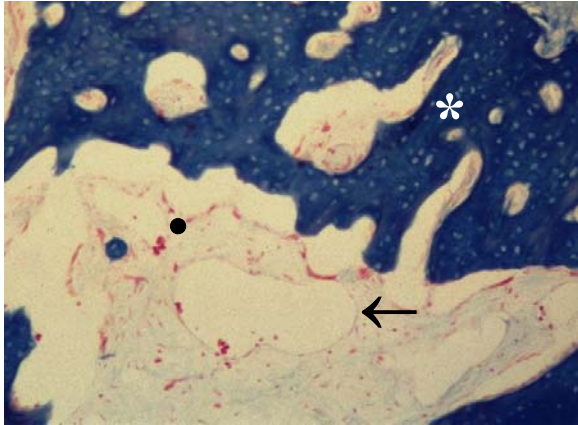
vor der osteogenen Front, sind in der fibro-ossären Übergangszone deutlich große KapillargefäÙe in hoher Anzahl als angiogene Front zu sehen. Dem Wachstumsgradienten entsprechend ist in Richtung Zentrum Faserknorpel, fibrochondroides Gewebe, neugebildetes Kollagen und Implantatreste zu erkennen. Der morphologische Gradient ist fortgeschritten und vom ortsständigen Knochenlager zum Zentrum des Implantates abnehmend.



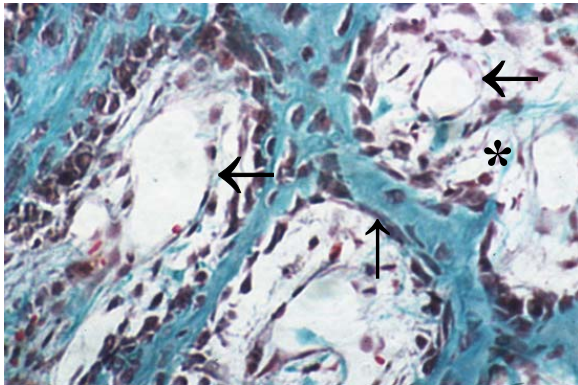
**Abb. 30:** Kollagenprobe mit VEGF<sub>165</sub> nach 28 Tagen (Azan, Vergrößerung 40x)- dichter trabekulärer Knochen in den äußeren Bereichen (\*); durch Resorptionen am ortsständigen Knochen ist die Neubildungsgrenze nicht eindeutig definierbar; zum Zentrum hin liegen fibrochondroides Gewebe und neugebildetes Kollagen (•) vor.



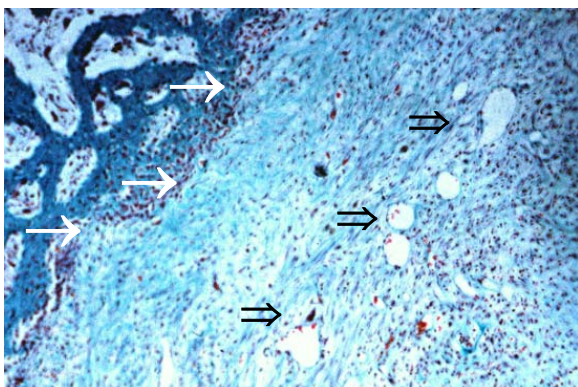
**Abb. 31:** Kollagenprobe mit VEGF<sub>165</sub> nach 28 Tagen (Azan, Vergrößerung 200x)- die Abgrenzung (↑) von ortsständigem und neugebildetem Knochen ist regionär noch möglich; der neugebildete Knochen (\*) ist sehr kompakt und ausgereift, hat eine sehr dichte und ausgeprägte Struktur, die mit der des ortsständigen Knochens vergleichbar ist.



**Abb. 32:** Kollagen mit VEGF<sub>165</sub> nach 28 Tagen (Azan, Vergrößerung 200x)- im Randbereich sehr ausgeprägte und kompakte Knochenneubildung(\*), angrenzend daran noch knochenfreier und mit retikulärem Bindegewebe (•) und großlumigen Gefäßen (←) gefüllter Raum.



**Abb. 33:** Kollagen mit VEGF<sub>165</sub> nach 28 Tagen (Hornowsky-Goldner, Vergrößerung 400x)- deutlich erkennbar sind Gefäße (←) im retikulären Gewebe (\*) zwischen dem Knochengeflecht; bone lining cell (↑).



**Abb. 34:** Kollagen mit Faktor nach 28 Tagen (Hornowsky-Goldner, Vergrößerung 100x)- unmittelbar vor der Knochenneubildungsfront (osteogenen Front) (→), liegt die angiogene Front (⇒) mit großen Anzahl weitleumiger Gefäße in der fibro-ossären Übergangszone.

### **3.3. Ergebnisse der histologischen Auswertung**

Die histologische Betrachtung zeigt im zeitlichen Verlauf größere Veränderungen als unter den einzelnen Gruppen eines Zeitpunktes. Die Knochenneubildung und Knochenorganisation ist 28 Tage post operationem in allen drei Gruppen, mit einheitlicher Tendenz, wenn auch mit Abstufungen im Umfang, deutlich fortgeschrittener als nach 14 Tagen. Die Knochenneubildung ist bis zum 14. Tag in der Studiengruppe und bei den Leerproben ausgeprägter und fortgeschrittener als in der Kontrollgruppe mit reinem Kollagen. Vom 14. zum 28. Tag sind in der Studiengruppe größere Fortschritte in der Regeneration zu sehen als in den beiden Kontrollgruppen. Die Knochen trabekel sind in der Studiengruppe weiter in das Lumen eingedrungen.

### **3.4. Quantitative Auswertung der Histomorphometrie**

Um die quantitativen Unterschiede der Knochenneubildung in den einzelnen Gruppen darzustellen, wurde die digitale histomorphometrische Auswertung der regenerierten Knochenkonturen der Tiere nach 28 Tagen herangezogen. Quantitative Unterschiede zwischen den drei Gruppen waren sowohl für die neugebildete Knochenfläche als auch für die Knochenflächendichte sichtbar. Differenzen im Vergleich der Knochenflächen (Abb. 36) fielen geringer aus als die der Knochenflächendichten (Abb. 38).

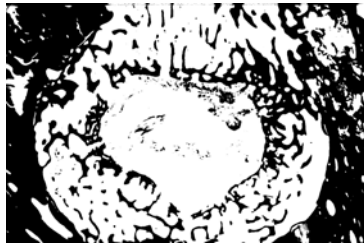
#### **3.4.1. Quantitative Ergebnisse – Knochenflächen**

Bei der Knochenfläche wies die Gruppe mit reinem Kollagen die kleinsten Werte auf. Die Leerproben zeigten etwas höhere Werte als die Proben mit reinem Kollagen. Die höchsten Werte konnten in der VEGF<sub>165</sub> –Gruppe festgestellt werden, wobei dort auch eine große Schwankung zwischen den Werten der einzelnen Tieren vorlag. Signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) konnten nach der Auswertung der Knochenflächen für die Studiengruppe S und die Kontrollgruppe K1 ( $p = 0,437$ ) sowie die Studiengruppe S und die Kontrollgruppe K2 ( $p = 0,284$ ) und zwischen den Kontrollgruppen K1 und K2 ( $p = 0,614$ ) nicht ermittelt werden.

28 Tage- K1- Leer



28 Tage- K2- Kollagen



28 Tage- S- VEGF<sub>165</sub>

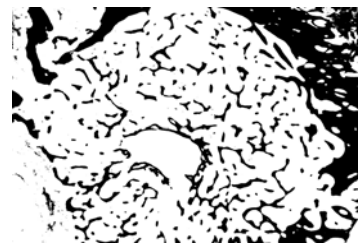


Abb. 35: Binäre Bilder Knochenflächen.

### Graphische Darstellung - Knochenfläche:

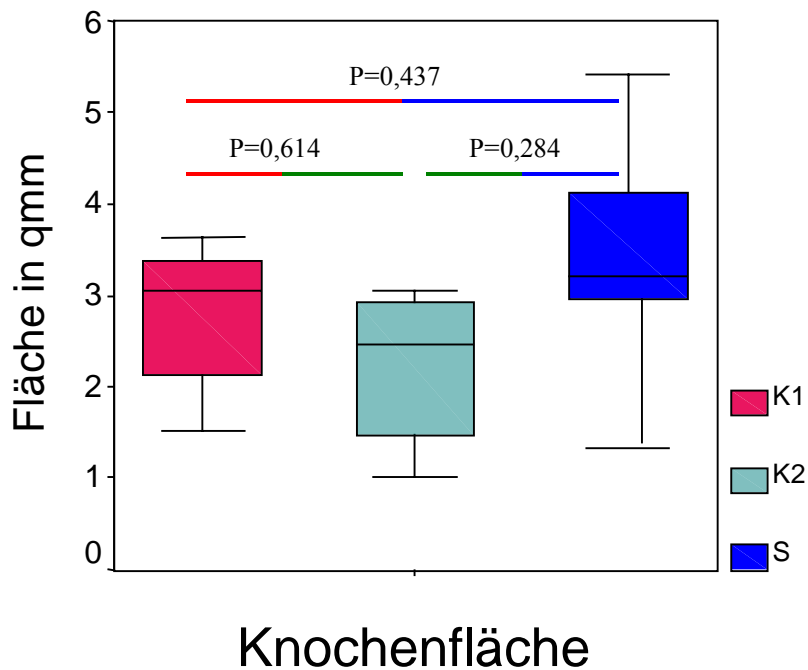


Abb. 36: Graphische Darstellung des Vergleichs und der statistischen Auswertung (T-Test bei unabhängigen Stichproben für N=6 pro Gruppe) der neugebildeten Knochenflächen an den Tieren nach 28 Tagen.

### 3.4.2. Quantitative Ergebnisse - Knochenflächendichten

Das Ossifikationsgefälle vom Rand zum Zentrum war in der Gruppe mit VEGF<sub>165</sub> flacher als in den Leer- bzw. Kollagenproben. In der Studiengruppe sind die Werte vom Randbereich zum Zentrum naheliegender, was auf eine homogenere Verknöcherung schließen lässt. Der VEGF<sub>165</sub> führt zu einer ausgeprägteren Knochenregeneration.

Die quantitativen Unterschiede bei den Knochenflächendichten waren deutlicher, wobei die größten Dichten in der Gruppe mit VEGF<sub>165</sub> vorlagen. Die Gruppe mit reiner Kollageneinlage hatte die niedrigsten Werte. Die Differenz zwischen der Kollagenprobe und der Leerprobe war hier nur gering. Signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) lagen zwischen der Studiengruppe S mit komplexiertem VEGF<sub>165</sub> und der Kontrollgruppe K2 mit reiner Kollagenfüllung ( $p = 0,002$ ) und zwischen der Studiengruppe S und der Kontrollgruppe K1 ohne Einlage ( $p = 0,022$ ), jedoch nicht unter den Kontrollgruppen K1 und K2 zueinander ( $p = 0,366$ ) vor.

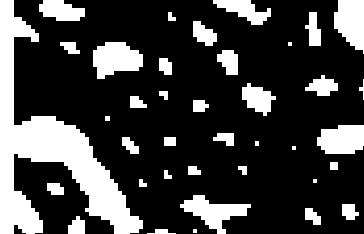
28 Tage- K1- Leer



28 Tage- K2- Kollagen



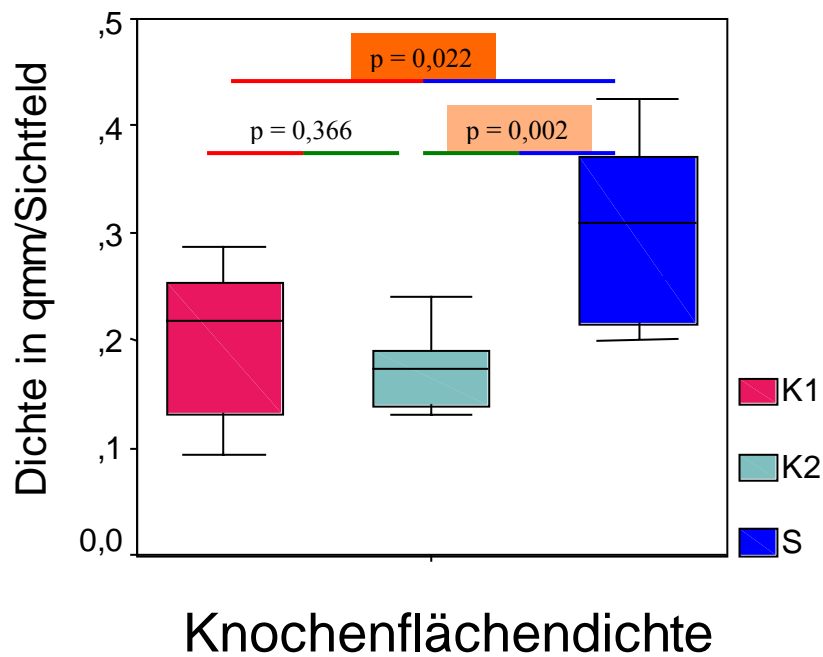
28 Tage- S- VEGF<sub>165</sub>



**Abb.37:** Binäre Bilder der Knochenflächendichten.



## Graphische Darstellung – Knochenflächendichte:



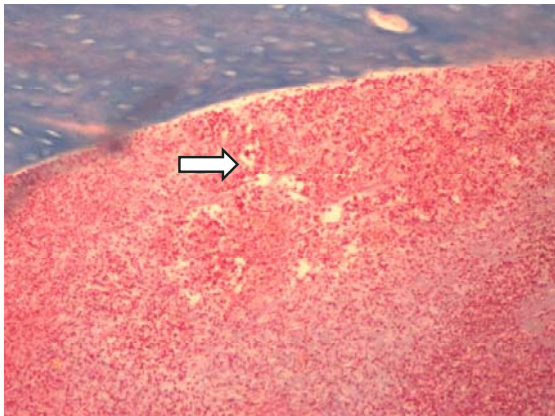
■ Signifikante Unterschiede

**Abb. 38:** Graphische Darstellung des Vergleichs und der statistischen Auswertung (T-Test bei unabhängigen Stichproben für N=6 pro Gruppe) der Knochenflächendichten an den Tieren nach 28 Tagen.

## 3.5. Gefäße

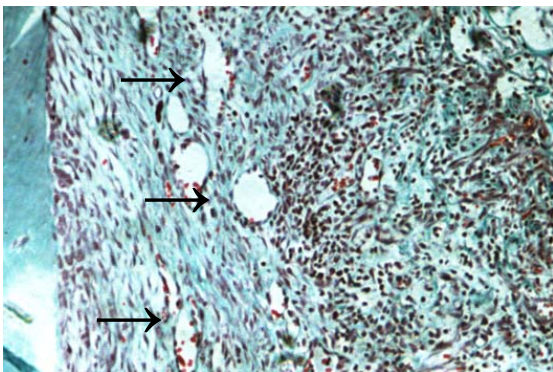
### 3.5.1. Gefäßentwicklung

Bei den 3-Tages-Proben sind wenige endotheliale Strukturen zu erkennen. In einer überwiegenden Anzahl der Proben lagen lediglich Blutzellen (Thrombozyten, Monozyten, Granulozyten) und gegebenenfalls implantäre Kollagenstrukturen vor (Abb. 39).



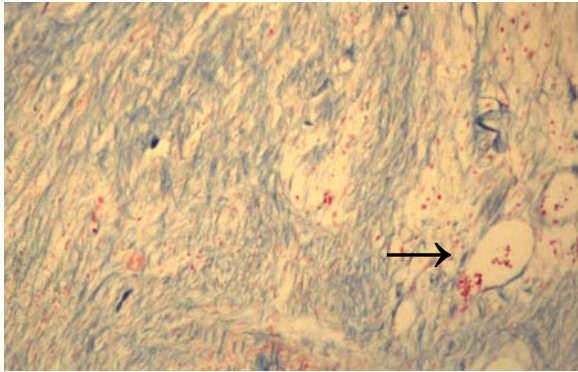
**Abb. 39:** Kollagen mit VEGF<sub>165</sub> am 3. Tag (Azan, Vergrößerung 200x)- implantäres Kollagen und Blutzellen im Bereich des Implantats; im Randbereich Organisation von tubulären Strukturen (⇒).

Nach 7 Tagen zeichnen sich in den VEGF<sub>165</sub>-Proben bereits Strukturveränderungen des Kollagengerüsts und mehr vaskuläre Strukturen und tubuläre Formationen im Randbereich und in einzelnen Proben auch in zentralen Bereichen aus. Teilweise hat das Kollagen noch die retikuläre Implantatstruktur.



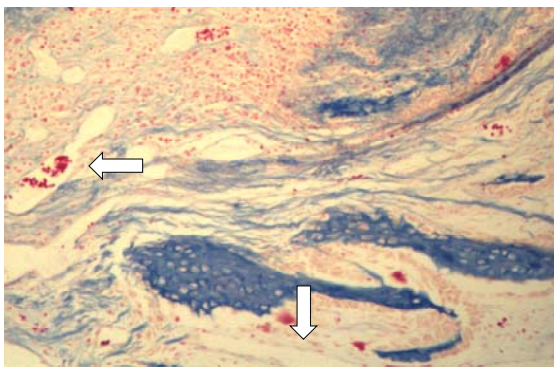
**Abb. 40:** Kollagen mit VEGF<sub>165</sub> am 7. Tag (Hornowsky-Goldner, Vergrößerung 200x)-verstärkte und deutlich sichtbare Gefäßneubildung im Randbereich (→).

Bei den Leerproben nach 7 Tagen liegt eine ähnliche Formation wie bei den VEGF<sub>165</sub>-Proben vor. Die Kollagenprobe weist im Vergleich nur geringe Veränderungen auf. Zwischen den Kollagenfasern sind vereinzelt Gefäße zu erkennen.

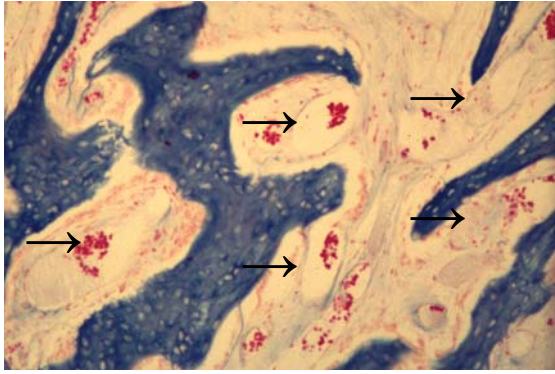


**Abb. 41:** Kollagenprobe nach 7 Tagen (Azan, Vergrößerung 200x) - einzelne Gefäße (→) im Randbereich zwischen kollagenen Fasern .

Zu weiteren Strukturveränderungen und zur Zunahme der Ausbildung endothelialer Strukturen und endothelial gebildeter Kapillaren kommt es nach 14 Tagen. Diese endothelialen Strukturen liegen sowohl innerhalb und zwischen dem neugebildeten trabekulären Knochen als auch an der osteogenen Front sowie vereinzelt im implantierten und neugebildeten Kollagen (Abb. 42-43).

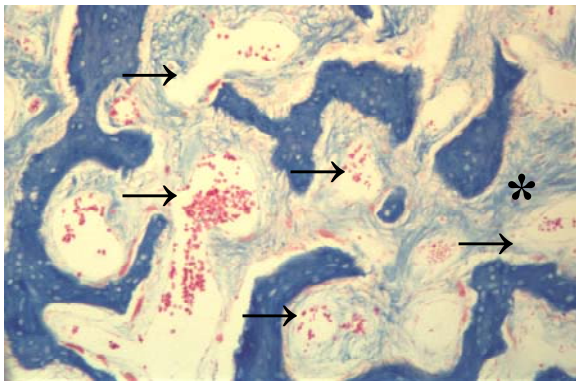


**Abb. 42:** Kollagen mit VEGF<sub>165</sub> am 14. Tag (Azan, Vergrößerung 200x) - größere Gefäße vor der osteogenen Front (←) und intertrabekulär (↓).

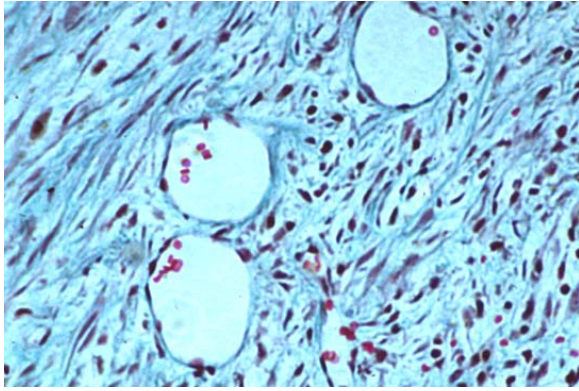


**Abb. 43:** Leerprobe am 14. Tag (Azan, Vergrößerung 200x): hohe Anzahl weitlumiger Gefäße (→) innerhalb des neugebildeten Knochens.

Bei den VEGF<sub>165</sub>-Proben nach 28 Tagen ist eine Einnahme der entstandenen Resorptionslakunen am ortständigen Knochen durch Gefäße und den neugebildeten trabekulären Knochen sichtbar (Abb. 44). Dabei handelt es sich neben Kapillaren auch um großlumige Gefäße. Zum Zentrum hin hat sich die angiogene Front vorgeschoben. Sie führt die osteogene Front an und ist dort vermehrt aktiv.

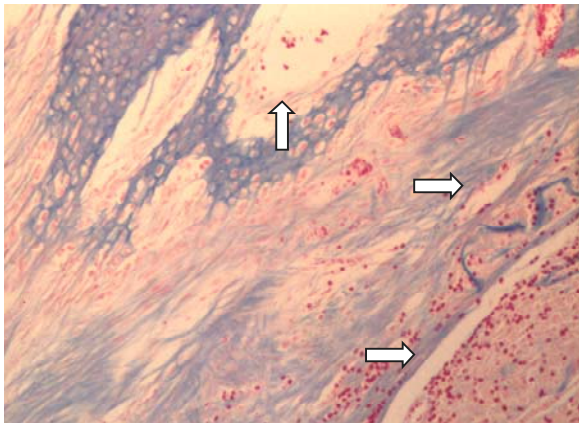


**Abb. 44:** Kollagen mit VEGF<sub>165</sub> nach 28 Tagen (Azan, Vergrößerung 200x): weitlumige Gefäße (→) zwischen dem trabekulären Knochen innerhalb kollagener Fasern (\*).



**Abb. 45:** Kollagen mit VEGF<sub>165</sub> nach 28 Tagen (Hornowsky-Goldner, Vergrößerung 400x)- kleinere Gefäße in der angiogenen Front, zwischen fibro-ossärem Gewebe.

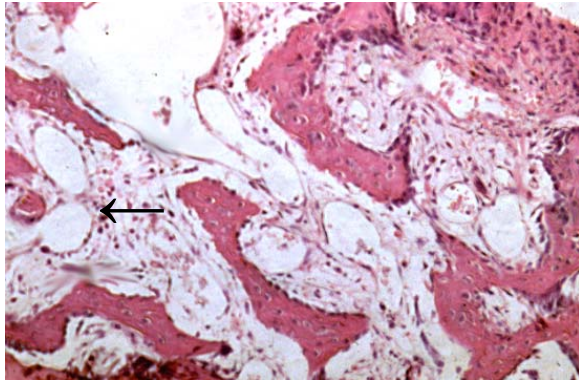
Bei den Kollagenproben ohne Wachstumsfaktor sind am 28. Tag nicht mehr Gefäße als am 14. Tag zu erkennen. Diese liegen überwiegend zwischen Geflechtknochen und chondroidem Gewebe (Abb. 46).



**Abb. 46:** Kollagen ohne VEGF<sub>165</sub> am 28. Tag (Azan, Vergrößerung 200x)- große Gefäße intertrabekulär (↑) und kleinere vor der osteogenen Front (⇒).



Ebenso wie bei den Kollagenproben hat sich die Vaskularisation auch bei den Leerproben am 28. Tag nicht wesentlich verbessert. Die kapillären Gefäße verteilen sich im Bereich des neugebildeten trabekulären Knochens. Die angiogene Front in der fibro-ossären Übergangszone ist nicht so stark ausgeprägt. Insgesamt sind weniger Gefäße zu verzeichnen.

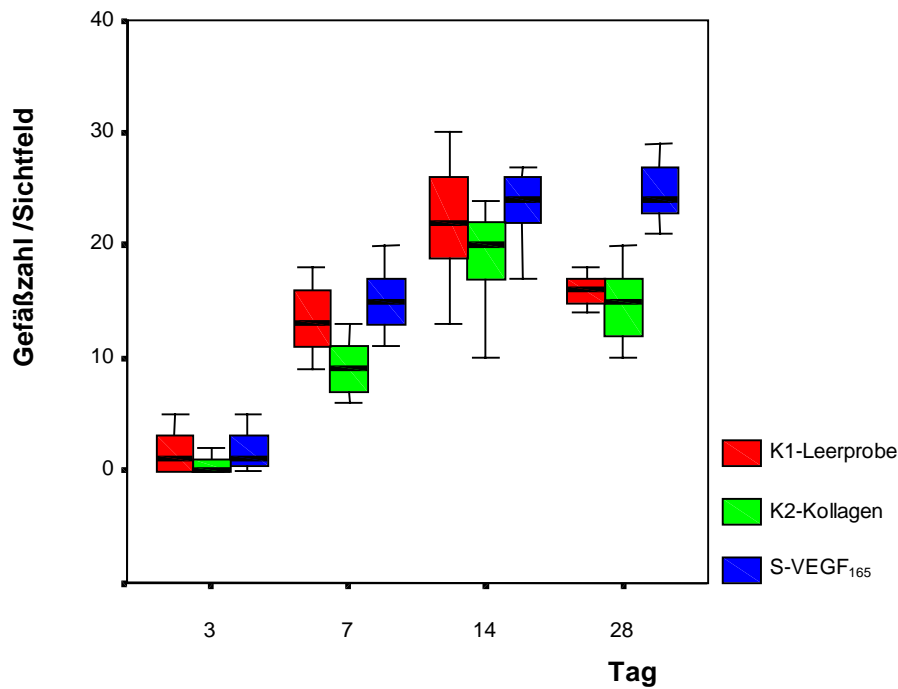


**Abb. 47:** Leerprobe nach 28 Tagen (HE, Vergrößerung 200x): Knochentrabekel mit Kapillareinsprossung (←).

### 3.5.2. Gefäßzahl

Die quantitativen Veränderungen der Gefäßzählung hatten nahezu in allen drei Gruppen eine ähnliche Tendenz. Die VEGF<sub>165</sub> Gruppe war mit den höheren Werten führend. In den Kontrollgruppen stieg die Gefäßzahl vom bis zum 14.Tag ständig an. Ab dem 14.Tag war in den Kontrollgruppen jedoch ein eindeutiger Rückgang zu erkennen, während in der Studiengruppe vom 14.Tag zum 28.Tag ein weiterer Anstieg bemerkbar war.

#### Graphische Darstellung - Gefäßzahl:



**Abb. 48:** Graphische Darstellung des Vergleichs der Gefäßzahlen der einzelnen Gruppen im zeitlichen Verlauf.

### **Statistische Auswertung - Gefäßzahl:**

Nach Anwendung der Rang-Varianzanalyse und Bewertung der Differenzen der Rangmittelwerte für die Gefäßzahlen wurden einzelne signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) ermittelt. Entsprechend bestanden signifikante Unterschiede für die unterschiedlichen Tage zwischen dem 3. und dem 14. Tag und dem 3. und dem 28. Tag in allen drei Gruppen. Unterschiede in der Verteilung der Signifikanzen zwischen den verschiedenen Gruppen bestanden für die Gefäßzahl nicht.



## 4. DISKUSSION

Die Formation von neuen Kapillaren, als entscheidende Komponente des Gewebswachstums und der Gewebsreparatur, ist ein anerkannter Prozeß in der Entwicklung, Formation und Remodelling von Knochen [Goad et al. 1996]. Dabei ist besonders der Grad der Vaskularisation für die Osteogenese von Bedeutung. Allerdings ist gerade diese bei vielen Patienten mit Knochenerkrankungen (Tumor, Osteomyelitis, Trauma) insuffizient oder kaum vorhanden. In den meisten klinischen Studien zeigt das Erwachsenengewebe eine geringe Proliferation. Die Knochenreparation ist unter diesen Umständen langsamer und kann durch Prozesse wie die Osteoinduktion angetrieben werden [Burchardt 1987]. Allerdings hat die Möglichkeit der Gewebsreparatur mit den Fortschritten in der Gentechnologie zugenommen. Die durch diese Fortschritte hergestellten Wirkstoffe (Zytokine, Wachstumsfaktoren, Hormone) werden für unterschiedliche Zielsetzungen angewandt [Crotts und Park 1998].

Die Schwierigkeit der Studie liegt auch darin, dass die Vaskularisation und die Knochenneubildung in einem gestörten und geschädigten Lager stattfinden muss. In der Abwesenheit jeglicher Zellebensfähigkeit im Transplantat wird die Angiogenese und das Wachstum komplett durch das Wirtsgewebe vermittelt und der Grad der Antwort wird durch die angio- und osteoinduktive Kapazität der Matrix bestimmt. Für die Wiederherstellung des Blutflusses werden zwei komplementäre Prozesse, die Rezirkulation und die Neovaskularisation, benötigt [Leunig et al. 1994]. Der Nachweis, daß bovine Knochenzellen Wachstumsfaktoren synthetisieren [Globus et al. 1989], welche u. a. die Angiogenese induzieren [Arnold und West 1991], ist ein deutlicher Beweis für die Interaktion zwischen der Gefäßversorgung und der Osteogenese. Demnach sollte nachvollziehbar sein, dass durch eine gezielte Beeinflussung der Vaskularisation die Osteogenese gefördert werden kann. Dies kann durch eine gerichtete Stimulierung mit Wachstumsfaktoren aus einem Ersatzmaterial erfolgen [Kübler et al. 1998, Ripamonti et al. 1992]. So konnte *Ripamonti 1992* zeigen, dass biologisch aktive Faktoren, freigesetzt aus porösen Hydroxylapatitproben, zu einer stärkeren Osteogenese führten als autogene Knochen transplantate alleine.

Entsprechend treten im biologischen System an verschiedenen Zeitpunkten und Stellen verschiedene Faktoren in den Vordergrund und beeinflussen wiederum regelrecht unter- oder übergeordnete Faktoren. Diese Faktorhierarchie wird durch Zugabe bestimmter externer Faktoren dann auch an einer bestimmten Stelle beeinflusst. Daher muss bei der Zugabe

externer Faktoren dieser komplexe Zusammenhang und die aufeinanderfolgende Vermittlung von Botschaften berücksichtigt werden [Marden et al. 1990]. VEGF<sub>165</sub> 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 Knochenneubildung darstellt [Paralkar et al. 1991].

Durch die Auswahl des VEGF<sub>165</sub> als angiogenes Zytokin wird der Empfehlung in der Literatur nachgekommen, nicht physiologische Wachstumsprozesse zu umgehen und über physiologische Wege, sprich über die Angiogenese, die Knochenregeneration zu stimulieren und zu imitieren, ohne direkten Einfluss auf das Knochenwachstum zu haben [Hollinger und Kleinschmidt 1990]. Dabei ist die natürliche, dynamische und optimale Balance zwischen Stimulatoren und Inhibitoren für die Angiogenese entscheidend [Iruela-Arispe und Dvorak 1997].

Beim Einsatz von extern zuzuführenden Faktoren ist die Wahl des richtigen Zeitpunktes, der optimalen Konzentration und die Berücksichtigung des Carrier-Freisetzungsmodus wichtig. Nur durch eine günstige Interaktion zwischen Zellen, Proteinen, Molekülen, Inhibitoren und Stimulatoren, welche eine Kaskade bilden, kann die Angiogenese begünstigt werden [Klagsburn und D'Amore 1991, Risau 1997]. Werden diese Parameter nicht richtig eingesetzt, kann eine optimierte Wirkung nicht erzielt werden.

Die Wirkungsweise und -dauer des Wirkstoffs hängt neben den Trägermaterialeigenschaften, besonders von der Freisetzungsrate (Pharmakokinetik) und der Pharmakodynamik des Wirkstoffes ab. Daher ist die Freisetzungsrate des Wirkstoffs/Proteins in vivo, d.h. im Organismus, exakt zu bestimmen [Hollinger und Kleinschmidt 1990]. Es bleibt auch zu berücksichtigen, dass veränderte Bedingungen (z.B. pH-Wert, Temperatur etc.) stimulierende als auch inhibierende Wirkungen hervorrufen können [Agrawal et al. 1995]. *Lazarous et al. 1997* und *Leunig et al. 1997* konnten bei systemischer Applikation von bFGF keine Beeinflussung und bei lokaler Applikation eine deutliche aber nicht signifikante Beeinflussung der Angiogenese nachweisen und weisen auf die lokale Wirkung, die kurze Halbwertszeit und die Notwendigkeit einer kontinuierlichen Freisetzung hin.

Ein zentraler Punkt ist die Bestimmung einer günstigen Ausgangskonzentration vor der Komplexherstellung, damit nach der Implantatherstellung und -lagerung bis zum Einbringen des Trägermaterials und während der Wirkstofffreisetzung eine optimale und definierte aktive Konzentration vorliegt [Dash AK und Cudworth GC 1998]. Nach *Kleinheinz et al. 2000* geht

ein Teil des Faktors schon bei Lagerung und Transport verloren. So ist es besonders wichtig, die Proteinstabilisierung und damit die Träger-Wirkstoff-Effizienz zu steigern.

Eine wesentliche Schwierigkeit bei der Planung und Vorhersage der am Wirkort erzielbaren Konzentration betrifft die Freisetzungskinetik eines Wirkstoffs, welche von der Löslichkeit und dem Diffusionskoeffizienten des Wirkstoffs im Carrier, der Beladung des Carriers mit dem Wirkstoff (drug load) wie auch von der in vivo Degradationsrate des Carriers (zeitlich, örtlich und mengenmäßig optimierte Freisetzungsrate) abhängt [Dash und Cudworth 1998]. Ein Problem und zugleich Ziel ist es, eine definierte Wirkstoffkonzentration über einen bestimmten Zeitraum in einem bestimmten Regenerationsbereich aufrecht zu erhalten (optimales Dosisprofil) [Kleinheinz 2000].

Die physiologisch systemische Konzentration des Wirkstoffes, die halbmaximale Wachstumsstimulation, die Halbwertszeit des Wirkstoffes und die Freisetzungsrate des Carriers ergeben diese definierte Wirkstoffkonzentration und spielen für die Wirksamkeit eine bedeutende Rolle. So kann die freigesetzte aktive Konzentration und die Wirkung, abhängig von den vorgenannten Faktoren, bei gleicher Ausgangsmenge sehr unterschiedlich ausfallen. Die Dosis sollte auch im Hinblick auf die Gefahr von Nebenwirkungen so gering wie möglich, allerdings aber auch so hoch wie nötig gehalten werden. Faktoren, die nicht körperfremd sind, können bei der externen Zufuhr einer höheren Dosis über ein Rückkopplungsverfahren (feed-back Mechanismus) eine Inhibition der körpereigenen Produktion und damit eine inhibierende Wirkung hervorrufen und sind andererseits in nano- bis pikomolaren Konzentrationen wirksam [Agrawal et al. 1995]. Eine Erhöhung der Dosis über physiologische Werte hinaus zeigt wegen der hohen Verlustrate keine Effektivität [Kleinheinz 2000].

### **Bestimmung der Wirkstoffkonzentration**

*Kleinheinz 2000* hält es für möglich, dass 90 % der Gesamtmenge des VEGF bereits nach 4-8 Stunden freigegeben werden und darüber hinaus ein weiterer Effekt auf das Gewebe nicht stattfindet. Entscheidend wäre allerdings der lokale Wirkspiegel des Zytokins im Regenerationsbereich und liegt für VEGF<sub>165</sub> nach 48 Stunden noch im hyperphysiologischen Bereich und rege eine Zellaktivierung an [Kleinheinz 2000].

Die Vorstellung dieser Studie liegt in der Anforderung einer kurzen Aktivierung der angiogenen Kaskade durch das externe VEGF mit einem initialen Reiz, der zum Start einer Sequenz führt, die anschließend einem strengen Protokoll und einer Hierarchie chronologisch folgend Wachstumsfaktoren und Zytokine aktiviert [Einhorn et al. 1995, Malaval et al. 1994]. Auch die Tatsache, dass das Setzen eines einmaligen Reizes in der Natur zum Auslösen verschiedener Kaskaden ausreicht, unterstreicht dies. Besonders in den ersten 2-5 Tagen wird die biologische Aktivität des VEGF benötigt. [Hollinger und Wong 1996 b, Leunig et al. 1994]. Entsprechend würde eine kurze Halbwertszeit und somit kurze physiologische Aktivität des VEGF<sub>165</sub> ausreichen. Ebenso können erste Gefäßneubildungen im Regenerationsbereich auch nach 3-5 Tagen beobachtet werden [Harada et al. 1994, Leunig et al. 1997].

### **Trägermaterial**

Der Erfolg im Einsatz des Wirkstoffs hängt nicht weniger vom Trägermaterial ab. Bei der Auswahl des Ersatzmaterials sind besonders die klinischen Belange und die physikalischen und chemischen Eigenschaften des Materials von großer Bedeutung. Als Ersatzmaterial sind unter anderem Granulate, Pulver, Schwämme und Gele erhältlich.

Kollagen weist durch seine immunologisch nebenwirkungsfreie Resorbierbarkeit bzw. 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]. Vorteilhaft ist auch die relativ einfache Modellierbarkeit, die komplikationslose Fixation und die ausreichende Volumenkonstanz von Kollagen. 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]. Es ist als Ersatzmaterial und als Wirkstoffträger frühzeitig getestet und in den klinischen Einsatz gebracht worden.

Auch *Hollinger und Leong 1996*, *Kübler et al. 1998* und *Würzler et al. 2002* haben in Vergleichsstudien mit Kollagen als Trägermaterial für das BMP sehr gute Ergebnisse erzielt und lassen in ihrer Literatur eine deutliche Entscheidung zugunsten des Kollagen als Trägermaterial feststellen. Darüberhinaus wurde Kollagen in klinischen Studien als Trägermaterial für Gentamycin in der Osteomyelitistherapie erfolgreich eingesetzt [Letsch et al. 1993].

Das Typ-1 Kollagen als Carrier VEGF<sub>165</sub> stabilisiert und eine längere Wirkdauer im Tierversuch ermöglicht, konnte *Kleinheinz 2000* durch den Nachweis von VEGF<sub>165</sub> nach 48-54 Stunden zeigen, obwohl die Halbwertszeit von VEGF<sub>165</sub> 1,5 Stunden beträgt und ein kompletter Zerfall nach 4-8 Stunden zu erwarten ist.

Die Freisetzung des VEGF läuft einerseits über Diffusionsvorgänge, wobei das Kollagen von Blut durchsetzt und das VEGF ausgeschwemmt wird. Wichtig ist dabei die Verteilung des Faktors im Carrier. Wenn der Faktor überwiegend in den äußeren Schichten des Trägermaterials geladen ist, dann ist die Dauer der Freisetzung nicht lange. 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].

Neben der Freisetzung der Wirkstoffe aus einem Träger [Hollinger und Leong 1996], werden in der Literatur die intravenöse Injektion [Lazarous et al. 1997a] und die Injektion von biodegradablen Mikrosphären [Crotts und Park 1998] beschrieben. *Safi et al. 1999* hat die Induktion der Angiogenese im Kaninchenherzen über eine Adenovirus vermittelte aFGF-Transfer gezeigt. Ähnlich kann auch die VEGF- Expression über Adenoviren induziert und die Angiogenese beeinflusst werden [Lazarous et al 1999].

Nach dem bisherigen Wissensstand 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.

## **Korrelation der 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 Hohlrumbildung zum ortständigen Knochen. Daher verzögerte sich bei den Kollagenproben die angio- und osteoinduktiven Wirkung der im Koagel befindlichen Zytokine.

Wesentliche Vorteile des Kollagens gegenüber der Leerprobe werden nur in Defekten zugeschrieben, in denen aufgrund der Größe und Ausdehnung eine Stabilisierende Wirkung des Kollagens auf das Koagel erwartet wird, ebenso aber auch, wenn der Osteokonduktion eine entscheidende Rolle bei der Osteogenese zukommt [Farmand 1988, Joos 1983].

## **Tiermodell**

Im Hinblick auf die Auswahl der Versuchstiere kann vorausgesetzt werden, dass je höher ein eine Spezies in der Evolution eingestuft wird, umso weniger spontane Knochenregeneration bei ihm zu erwarten ist. Ferner muss berücksichtigt werden, dass Individuen im Wachstum eine höhere Knochenumbau- und Knochenwachstumsrate haben und die Regeneration bei ihnen schneller abläuft als bei ausgewachsenen Individuen. So hat sich in vergangenen Studien das ausgewachsene Kaninchenmodell als ausreichend valide bewiesen [Eppley et al. 1991, Kübler et al. 1998, Rabie 1997]. Auch der Einsatz von VEGF<sub>165</sub> im Kaninchenmodell mit der Suggestion der Therapie vaskulärer Insuffizienzen zeugt für die Zulänglichkeit des Kaninchenmodells [Takeshita et al. 1996]. Trotz der Unterschiede der Spezies, sprich Mensch als Proteinquelle und Kaninchen als Empfänger, konnte die Effektivität 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 Übersichtigkeit, der geringst traumatischen bzw. 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]. Für die Auswahl des Unterkiefers als zu untersuchender Knochen spricht die schwierige Rekonstruktion des Unterkiefers nach Resektion in der Mund- und Kiefer-Gesichtschirurgie oder der

onkologischen Chirurgie. Er ist ein unter ständiger (mastikatorischer, mimischer) Belastung stehender Knochen, der zudem einer Kontamination mit der oralen Flora ausgesetzt ist. Auch die Wiederherstellung der Gesichtsform (Ästhetik), der Phonetik und der uneingeschränkten natürlichen Atemfunktion ist für die Resozialisierung von Patienten Grundvoraussetzung.

Eine weitere Forderung von *Hollinger und Kleinschmidt 1990* ist der Zuzug 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 Faktoren zu beweisen. Darüberhinaus 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 VEGF<sub>165</sub> 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.

## **Untersuchungszeitraum**

Aufgrund der kurzzeitigen Aktivierungsphase und der früh einsetzenden Angiogenese wurde der Untersuchungszeitraum auf 28 Tage angesetzt. Die Wachstumsfaktoren und der 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.

## **Histomorphometrie**

Um histologische Ereignisse und dynamische Veränderungen im zeitlichen Verlauf objektiv zu quantifizieren und zu vergleichen und der Einschätzung von Knochentransplantaten und rekombinanten Proteinen als einheitliches System gerecht zu werden, wird die Histomorphometrie gefordert und hat sich als nützlich erwiesen [Hollinger et al. 1994, Hollinger und Kleinschmidt 1990]. Die Histomorphometrie erfasst die feinsten Abstufungen in histologischen Ereignissen [Hollinger et al. 1994]. Selbstverständlich sind eine einheitliche Verarbeitung des Untersuchungsgutes und routinierte und standardisierte Verfahren Voraussetzungen für einen verlässlichen Aussagewert der Histomorphometrie [Hollinger und Kleinschmidt 1990]. Dabei fällt das Augenmerk auf die einheitliche Gewebekonservierung, die bei Knochenproben besonders aufwendig und schwierig ist und Aufmerksamkeit verlangt, und auf die Einhaltung einer bestimmten zentralen Schnittebene und einheitlichen Schnittdicke. Bei Nichteinhaltung einer einheitlichen Schnittdicke kommt es zum sogenannten Holmes-Effekt [Whitehouse 1976]. Dieser besagt, dass durch die zunehmende Schnittdicke mehrere Gewebekompartimente überlagern und ihre Sichtbarkeit steigt, jedoch wiederum die Akkuratheit der histomorphometrischen Beurteilung abnimmt. Ferner ist eine zuverlässige Färbung, die relevante Strukturen hervorhebt und Regenerationsstadien differenziert, unerlässlich. Für die Darstellung von Binde- und Knochengewebe eignet sich speziell die Azanfärbung sehr gut. Dabei wird Knochen dunkelblau, Bindegewebe hellblau, Kollagen rot und Zellkerne rot bis rot-orange dargestellt [Romeis 1989].



Für die Kriterien dieser Untersuchung eignet sich als Diafilm der Filmtyp Ektachrome von Kodak sehr gut, da er blaustichige Bilder liefert und dadurch besonders die blaue Darstellung von Knochen in der Azanfärbung hervorhebt. Gelbstichige Bilder, wie sie bei dem Filmtyp Turachrome entstehen, könnten durch gelbliche Farbabstufungen zu Verfälschungen führen.

## **Histologie**

In der histologischen Untersuchung wurde sichtbar, dass eine ungestörte und den von *Hollinger und Wong 1996* und *Schenk 1994* beschriebenen morphologischen und zellulären Abläufen entsprechende Knochenneubildung stattfand. Der Gradient der Neuformation des Knochens verlief vom Randbereich bzw. vom ortständigen Knochen zur Implantatmitte. Die angiogene Front stand mit der osteogenen Front unter gegenseitigem Einfluss.

Darüberhinaus war bei der qualitativen Beurteilung aufgefallen, dass in allen Gruppen, sowohl in der Studiengruppe als auch bei den Leer- und Kollagenproben, auch chondroide Strukturen vorkamen, obwohl jegliche Veränderungen (biologisch, mechanisch oder biochemisch) und Beeinflussungen ausgeschlossen waren. Somit kann eine rein desmale Osteogenese nicht unterstellt werden. Eine deutliche Erklärung über die Verbindung zwischen osteoblastärer und chondroblastärer Zellreihe konnte in der Literatur bisher nicht geliefert werden. Ursächlich kann lediglich die von *Aubin et al. 1995* beschriebene Möglichkeit der Transdifferenzierung und Reifungsprogression von Chondrozyten in Osteoblasten innerhalb eines Regenerationsbereichs vermutet werden.

Zum Regenerationsstand des Knochens kann gesagt werden, dass im Vergleich zu den Kontrollgruppen unter VEGF<sub>165</sub> Einfluss keine schnellere, jedoch am 28. Tag eine nicht signifikante, aber dennoch größere Knochenfläche regeneriert war. Bezüglich der Knochenflächendichten bestand unter VEGF<sub>165</sub> Einfluss sogar ein signifikant größerer Unterschied.

Destotrotz hat die Zeit den größeren Einfluss auf die Regeneration der Knochenwunde. Auch in der Literatur wird diese Aussage einhellig gestützt [*Ripamonti et al. 1992*].

## **Zukunft**

Ziel der Forschung sollte die Unterstützung der natürlichen Mechanismen der Osteogenese in großen Defekten sein, in denen diese alleine nicht zu einer soliden Reossifikation führen können. 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. 1998a, Kloss und Neukam 1999, Ripamonti et al. 1992].

Hinsichtlich der Erwartungen, die an die Knochenregeneration gestellt werden kann gesagt werden, dass VEGF<sub>165</sub> durch die lokale Freisetzung zu einer Steigerung der Gefäßzahl und zur Verstärkung der Osteogenese führt und somit zur Knochenregeneration deutlich beiträgt. In weiteren Untersuchungen müsste die Wirksamkeit des VEGF<sub>165</sub> in pathologisch veränderten Defekten, wie zum Beispiel nach einer Radiatio, Tumoroperationen, ossären Infekten (Osteomyelitis) oder nach Frakturen festgestellt und die mechanischen Eigenschaften der regenerierten Knochenareale ermittelt werden. Ziel sollte ebenfalls die gezielte Regeneration von Knochenarealen durch gezielten Einsatz von VEGF<sub>165</sub> und die Stimulierung der Angiogenese sein, was im günstigsten Fall sogar zu einer wünschenswerten Knochenmodellation führen könnte. Darüber hinaus könnten durch in vitro Angiogenese geschaffene Gewebeareale implantiert werden [Frerich 2000] und als Bausteine die Heilungschancen eines geschädigten Knochenareals steigern.

## 5. ZUSAMMENFASSUNG

Die kausale Behandlung von knöchernen Defekten stellt in der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie ein zunehmendes Problem dar. Die Beseitigung der funktionellen und ästhetischen Beeinträchtigungen kann nur durch eine gezielte Regeneration oder Rekonstruktion des ossären Gewebes erzielt werden. Dabei ist das autologe Knochentransplantat unübertroffen, jedoch mengenmäßig limitiert. Daher besteht die intensive Forderung nach Ersatzsystemen und biokompatiblen Ersatzmaterialien, die primär ein Grundgerüst zum Einwandern von Zellen darstellen, ferner aber auch, besonders als Träger aktiver Wirkstoffe, physiologisch ablaufende Kaskaden, die der Regeneration dienen, aktivieren. Für die Defektheilung ist neben der Osteogenese besonders die Angiogenese, die für die Gefäß- und Knochenregeneration wesentlich ist, die Voraussetzung.

In der vorliegenden Studie diente Typ-1 Kollagen als Ersatzmaterial und Träger für den Wachstumsfaktor VEGF<sub>165</sub> (Vascular endothelial growth factor<sub>165</sub>) zur Versorgung bikortikaler Bohrdefekte. Ferner lagen zwei Kontrollgruppen, K1 mit reinem Typ-1 Kollagen als Einlage und K2 als Leerprobe ohne Einlage zum Vergleich.

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.

Untersucht wurden Proben von 56 weißen New Zealand Kaninchen. Je Kaninchen wurden 4 bikortikale Bohrlöcher mit einem Durchmesser von 5mm im Unterkiefer angelegt und für die zwei Kontrollgruppen zwei Bohrungen ohne Einlage belassen (K1) und zwei mit reinem Typ-1 Kollagen gefüllt (K2) oder für die Studiengruppe alle vier Bohrungen mit Typ-1 Kollagen, komplexiert mit einer (in vitro) in der Konzentration und Freisetzungskinetik optimierten Ausgangsmenge von 0,8µg VEGF<sub>165</sub>, versehen. Nach einer Verweildauer von 3, 7, 14 und 28 Tagen wurden die Tiere geopfert, der Defektbereich als Gesamtprobe entnommen, verarbeitet und 1.) histologisch nach qualitativen Merkmalen wie endothelialen und osteoblastären Zelltypen und der Regenerationsrichtung untersucht, 2.) die Gefäßzahl bestimmt und 3.) die Proben nach 28 Tagen quantitativ mittels der Histomorphometrie bezüglich der regenerierten Knochenfläche und Knochendichte untersucht und statistisch analysiert.

Diese Studie beantwortet nach histologischer und histomorphometrischer Beurteilung die Frage, wie die Osteogenese über die Beeinflussung der Angiogenese nach dem Einsatz von VEGF<sub>165</sub> im Unterkieferdefektmodell am Kaninchen beeinflusst wird.

Das histologische Bild zeigte auf zellulärer und extrazellulärer Ebene ein den morphologischen Veränderungen zutreffendes Bild. Auch ein Verhältnis zwischen der osteogenen und angiogenen Front bestand, wobei die osteogene Front der angiogenen Front folgte.

Die Ergebnisse zeigten bis zum 14. Tag für alle Gruppen einen gleichbleibenden Anstieg der Gefäßzahl. Am 28. Tag konnte ein Abfall der Werte für die Gefäßzahl in den Kontrollgruppen bei gleichbleibend hoher Gefäßzahl unter dem Einfluß von VEGF<sub>165</sub> festgestellt werden.

Die histomorphometrische Beurteilung des Knochens nach 28 Tagen ergab für die Knochenflächendichte einen signifikant höheren Wert der Studiengruppe im Vergleich mit den Leerproben ( $p=0,022$ ) und den reinen Kollagenfüllungen ( $p=0,002$ ). Im Vergleich der regenerierten Knochenflächen bestanden statistisch keine signifikanten höheren Werte.

Daraus folgt, dass der VEGF<sub>165</sub> eine steigernde Wirkung auf die Gefäßzahl hat und zu einer höheren Knochenflächendichte führt.

## 6. LITERATUR

- 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
- Agrawal CM, Best J, Heckmann JD, Boyan BD (1995):  
Protein release kinetics of a biodegradable implant for fracture non-unions. *Biomaterials* 16: 1255-1260
- Ahrengart L, Sahlin K, Lindgren U (1987):  
Myositis ossificans after total hip replacement and perioperative muscle ischemia. *J Arthroplasty* 2: 65-69
- 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
- Amler MH (1999):  
Disturbed healing of extraction wounds. *J Oral Implantol* 25: 179-184
- Arnold F, West DC (1991):  
Angiogenesis in wound healing. *Pharmacol Ther* 52: 407-422
- 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
- 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
- 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
- Aubin JE, Liu F, Malaval L, Gupta AK (1995):  
Osteoblast and chondroblast differentiation. *Bone* 17: 77S-83S
- 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

- 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
- 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
- Bikfalvi A, Han ZC (1994):  
Angiogenic factors are hematopoietic growth factors and vice versa. *Leukemia* 8: 523-529
- 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
- Breier G, Damert A, Plate KH, Risau W (1997):  
Angiogenesis in embryos and ischemic diseases. *Thromb Haemost* 78: 678-683
- Breier G (2000):  
Functions of the VEGF/VEGF receptor system in the vascular system. *Semin Thromb Hemost* 26: 553-559
- Brighton CT, Lorich DG, Kupcha R, Reilly TM, Jones AR, Woodbury RA (1992):  
The pericyte as a possible osteoblast progenitor cell. *Clin Orthop* 275: 287-299
- 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*
- 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
- Buck BE, Malinin TI, Brown MD (1989):  
Bone transplantation and human immunodeficiency virus: An estimate of risk acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). *Clin Orthop* 240: 129-136
- Buckwalter J, Glimcher M, Cooper R, Recker R (1995 b):  
Bone biology. PartII: formation, modeling, remodeling, and regulation of cell function. *J Bone Joint Surg* 77: 1276-1289
- Burchardt H (1987):  
Biology of bone transplantation. *Orthop Clin North Am* 18: 187-196
- Carmeliet P, Jain RK (2000):  
Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 407: 249-257

- Cid MC, Cebrian M, Font C, Coll-Vinent B, Hernandez-Rodriguez J, Esparza J, Urbano-Marquez A, Grau JM (2000):  
Cell adhesion molecules in the development of inflammatory infiltrates in giant cell arteritis: inflammation-induced angiogenesis as the preferential site of leukocyte-endothelial cell interactions. *Arthritis Rheum* 43: 184-194
- Cockerill GW, Gamble JR, Vadas MA (1995):  
Angiogenesis: models and modulators. *Int Rev Cytol* 159: 113-160
- Cohen RE, Mullarky RH, Noble B, Comeau RL, Neiders ME (1995):  
Phenotypic Characterization of Mononuclear Cells Following Anorganic Bovine Bone Implantation in Rats. *J Periodontol* 65: 1005-1015
- Collin-Osdoby P (1994):  
Role of vascular endothelial cells in bone biology. *J Cell Biochem* 55: 304-309
- 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
- Conn G, Sonderman DD, Schaefer MT, Wile M, Hatcher VB, Thomas KA (1990):  
Purification of a glycoprotein vascular endothelial cell mitogen from a rat glioma- derived cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87: 1323-1327
- 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
- Coventry MB, Scanlon PW (1981):  
The use of radiation to discourage ectopic bone. A nine-year study in surgery about the hip. *J Bone and Joint Surg* 63-A: 201-208
- Crotts G, Park TG (1998):  
Protein delivery from poly(lactic-co-glycolic acid) biodegradable microspheres: release kinetics and stability issues. *J Microencapsul* 15: 699-713
- Dash AK, Cudworth GC (1998):  
Therapeutic applications of implantable drug delivery systems. *J Pharmacol Toxicol Methods* 40: 1-12
- 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
- Desai SB, Libutti SK (1999):  
Tumor angiogenesis and endothelial cell modulatory factors. *J Immunother* 22: 186-211
- De Simone DP, Reddi AH (1992):  
Vascularization and endochondral bone development: changes in plasminogen activator activity. *J Orthop Res* 10: 320-324

- 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
- 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
- Ehmke B, Flemmig TF (1998):  
Knochen und Knochenersatzmaterialien zur parodontalen Regeneration. *Gemeinsame Stellungnahme der Deutschen Gesellschaft für Parodontologie und der Deutschen Gesellschaft für Zahn-, Mund- und Kieferkrankheiten*; Juni 1998
- Einhorn TA, Majeska RJ, Rush EB, Levine PM, Horowitz MC (1995):  
The expression of cytokine activity by fracture callus. *J Bone Miner Res* 10: 1272-1281
- 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
- Farmand M (1988):  
Experimentelle Ergebnisse zur spontanen Unterkieferregeneration beim wachsenden Organismus. *Kiefer Gesichtschirurgie* 1: 53-56
- 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
- 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
- Ferrara N, Houck KA, Jakeman LB, Winer J, Leung DW (1991):  
The vascular endothelial growth factor family of polypeptides. *J Cell Biochem* 47: 211-8
- Ferrara N, Winer J, Burton T (1991):  
Aortic smooth muscle cells express and secrete vascular endothelial growth factor. *Growth Factors* 5: 141-148
- 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
- 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



- 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
- Flemmig TF (1993):  
Rekonstruktive Parodontalchirurgie: Alloplastische Implantate  
In: Körber E, Klaiber B (eds) Parodontologie-Ein Kompendium; *Thieme; Stuttgart, New York; (1993) 91*
- Flemmig TF, Ehmke B, Bolz K, Kübler NR, Karch H, Reuther JF, Klaiber B (1998):  
Long-term maintenance of alveolar bone gain after implantation of autolyzed, antigen-extracted, allogenic bone in periodontal intraosseous defects. *J Periodontol* 69: 47-53
- Flemmig TF (1999):  
Chirurgische Therapie marginaler Parodontopathien. *Dtsch Zahnärztl Z* 54: 360-364
- Folkman J (1995):  
Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med* 1: 27-31
- Frerich B (2000):  
Untersuchung zum Tissue-engineering vaskularisierter Transplantatgewebe in der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie.  
*Habilitationsschrift; Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie, Leipzig, 1-223*
- 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
- 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
- Gross PM, Heistad DD, Marcus ML (1979):  
Neurohumoral regulation of blood flow to bones and marrow. *Am J Physiol* 237: H440-H448
- 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
- Haroon ZA, Raleigh JA, Greenberg CS, Dewhirst MW (2000):  
Early wound healing exhibits cytokine surge without evidence of hypoxia. *Ann Surg* 231: 137-147
- Hausamen JE, Neukam FW (1992):  
Transplantation von Knochen. *Europ archives oto-rhino-laryngo (Suppl)* 1: 163-177

- 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
- Herr G, Wahl D, Küsswetter W (1993):  
Osteogenic activity of bone morphogenetic protein and hydroxyapatite composite implants. *Ann Chir Gynaecol Suppl* 207: 99-107
- 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
- Hollinger JO, Kleinschmidt JC (1990):  
The critical size defect as an experimental model to test bone repair materials. *J Craniofac Surg* 1: 60-68
- Hollinger JO, Buck D, Schmitz JP (1994):  
Quantitative light microscopy. A powerful tool to assess bone. *Clin Plast Surg* 21: 463-475
- Hollinger JO, Leong K (1996):  
Poly(alpha-hydroxy acids): carriers for bone morphogenetic proteins. *Biomaterials* 17: 187-194
- 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
- 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
- Hulth A, Johnell O, Lindberg L, Heinegard D (1993):  
Sequential appearance of macromolecules in bone induction in the rat. *J Orthop Res* 11: 367-378
- Hutmacher D, Hurzeler MB, 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
- Iruela-Arispe ML, Dvorak HF (1997) :  
Angiogenesis: a dynamic balance of stimulators and inhibitors. *Thromb Haemost* 78: 672-677
- Joos U, Ochs G, Ries P (1980):  
Influence of Collagenfleece on bone regeneration. *Biomaterials* 1: 23-26
- Joos U (1983):  
Die Beschleunigung der Knochenregeneration in chirurgisch bedingten Defekten am Kiefer durch Kollagen.  
*Habilitationsschrift; Albert-Ludwigs-Universität Freiburg*

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. *Biomed Mater Eng* 4: 291-307

Katz RW, Hollinger JO, Reddi AH (1993):  
The functional equivalence of demineralized bone and tooth matrices in ectopic bone induction. *J Biomed Mater Res* 27: 239-245

Klagsbrun M, D'Amore PA (1996):  
Vascular endothelial growth factor and its receptors. *Cytokine Growth Factor Rev* 7: 259-270

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*

Kleinheinz J, Wiesmann H, Fischer C, Brockmann J, Joos U:  
In vitro model for analysis of degradation and release kinetics of a cytokin-carrier complex. *J Cranio Maxillofac Surg* 28 : 96

Kloss FR, Neukam FW (1999):  
Rekonstruktive Knochenchirurgie. Methoden der letzten 15 Jahre. *Z Zahnärztl Implantol* 15: 33-43

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

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

Kübler NR (1997):  
Osteoinduktion und -reparation. *Mund Kiefer Gesichtschir* 1: 2-25

Kübler NR (1998):  
Knochenregeneration durch Osteoinduktion. *Dtsch Zahnärztl Z; (1998) Heft 12*

Kübler NR, Würzler KK, 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

Lagercrantz J, Farnebo F, Larsson C, Tvrdik T, Weber G, Piehl F (1998):  
A comparative study of the expression patterns for VEGF, VEGF-B/VRP and VEGF-C in the developing and adult mouse. *Biochem Biophys Acta* 1398: 157-163

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

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

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

Letsch R, Rosenthal E, Joka T (1993): Lokale Antibiotika-Applikation in der Osteomyelitisbehandlung--Eine Vergleichsstudie mit zwei verschiedenen Trägersubstanzen. *Aktuelle Traumatol* 23: 324-329

Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, Goeddel DV, Ferrara N (1989): Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* 246: 1306-1309

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

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

Malaval L, Modrowski D, Gupta AK, Aubin JE (1994): Cellular expression of bone-related proteins during in vitro osteogenesis in rat bone marrow stromal cell cultures. *J Cell Physiol* 158 : 555-572

Mandriota SJ, Pepper MS (1999): Lymphangiogenesis and biological activity of vascular endothelial growth factor-C. *J Soc Biol* 193: 159-163

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

Marx RE, Johnson RP (1987) : Studies in the radiobiology of osteoradionecrosis and their clinical significance. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 64: 379-390

McCourt M, Wang JH, Sookhai S, Redmond HP (1999): Proinflammatory mediators stimulate neutrophil-directed angiogenesis. *Arch Surg* 134: 1325-1331

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

Motoki D, Mulliken J (1990):

The healing of bone and cartilage. *Clin Plast Surg* 17: 527-544

Muthukumar N, Reddi AH (1985):

Bone matrix-induced local bone induction. *Clin Orthop* 200: 159-164

Neufeld G, Tessler S, Gitay-Goren H, Cohen T, Levi BZ (1994):

Vascular endothelial growth factor and its receptors. *Prog Growth Factor Res* 5: 89-97

Ogata S, Uthoff HK (1990):

The early development and ossification of the human clavicle – an embryologic study. *Acta Orthop Scandinavica*. 61: 330-334

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

Puzas JE, Miller MD, Rosier RN (1989) :

Pathologic bone formation. *Clin Orthop* 245: 269-281

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

Rabie ABM (1997):

Vascular endothelial growth pattern during demineralized bone matrix induced osteogenesis. *Connect Tiss Res* 36: 337-345

Reddi AH, Anderson WA (1976):

Collagenous bone matrix-induced endochondral ossification hemopoiesis. *J Cell Biol* 69 : 557-572

Reddi AH (1983):

Extracellular bone matrix dependent local induction of cartilage and bone. *J Rheumat* 11: 67-69

Reddi A (1984):

Extracellular matrix and development.

In : Piez K, Reddi A (eds) Extracellular matrix biochemistry. *Elsevier; New York; (1984)* 375-412

Reddi AH, Wientroub S, Muthukumar N (1987):

Biologic principles of bone induction. *Orthop Clin North America* 18: 207-212

- Ripamonti U (1992):  
Calvarial reconstruction in baboons with porous hydroxyapatite. *J Craniofac Surg* 3: 149-159
- 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
- Ripamonti U, Ma S, Cunningham NS, Yeates L, Reddi AH (1993):  
Reconstruction of the bone-bone marrow organ by osteogenin, a bone morphogenetic protein, and demineralized bone matrix in calvarial defects of adult primates. *Plast and Reconstr Surg* 91: 27-36
- Risau W (1990):  
Angiogenic growth factors. *Prog Growth Factors Res* 2: 71-79
- Risau W, Flamme I (1995):  
Vasculogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 11: 73-91
- Risau W (1997):  
Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 386: 671-674
- Ristimaki A, Narko K, Enholm B, Joukov V, Alitalo K (1998):  
Proinflammatory cytokines regulate expression of the lymphatic endothelial mitogen vascular endothelial growth factor-C. *J Biol Chem* 273: 8413-8418
- Rodan GA (1992):  
Introduction to bone biology. *Bone* 13: 3-6
- Romeis B (1989):  
Mikroskopische Technik. 17. Auflage, Urban und Schwarzenberg, München; S.501-502
- Roux W (1885):  
Beiträge zur Morphologie der funktionellen Anpassung. *Arch Physiol Anat* 9, 120
- Saadeh PB, Mehrara BJ, Steinbrech DS, Spector JA, Greenwald JA, Chin GS, Ueno H, Gittes GK, Longaker MT (2000):  
Mechanisms of fibroblast growth factor-2 modulation of vascular endothelial growth factor expression by osteoblastic cells. *Endocrinology* 141: 2075-2083
- 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
- Sauter ER, Nesbit M, Watson JC, 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
- Schaub RG, Wozney J (1991):  
Novel agents that promote bone regeneration. *Curr Opin Biotechnol* 2: 868-871

- Schenk R (1994):  
Bone regeneration: biologic basis.  
In: Buser D, Dahlin C, Schenk R (eds) Guided bone regeneration in implant dentistry. *Quintessence Books; Chicago, Berlin, London, Tokyo, Moskau, Prag, Sofia, Warschau; (1994) 49-101*
- Schlaeppi 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*
- Schott RJ, Morrow LA (1993):  
Growth factors and angiogenesis. *Cardiovasc Res 27: 1155-1161*
- 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*
- Sevitt S (1981):  
Bone repair and fracture healing in Man.  
*Churchill Livingstone; New York;*
- 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*
- Shibuya M (1996):  
Involment of the VEGF-Flt-receptor family in angiogenesis. *Nippon Yakurigaku Zasshi 107: 119-131*
- Slavin J (1995):  
Fibroblast growth factors: at the heart of angiogenesis. *Cell Biol Int 19: 431-444*
- Soker S, Fidler IJ, Neufeld G, Klagsbrun M (1996):  
Characterization of novel vascular endothelial growth factor (VEGF) receptors on tumor cells that bind VEGF 165 via its exon 7-encoded domain. *J Biol Chem 271: 5761-5767*
- Soker S, Gollamudi-Payne S, Fidler IJ, Charnahelli H, Klagsbrun M (1997):  
Inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF)-induced endothelial cell proliferation by a peptide corresponding to the exon 7-encoded domain of VEGF165. *J Biol Chem 272: 31582-31588*
- 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*
- 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*

- Swift ME, Kleinman HK, Di Pietro LA (1999):  
Impaired wound repair and delayed angiogenesis in aged mice. *Lab Invest* 79: 1479-1487
- 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
- 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
- Urist MR, Siverman BF, Buring K, Dubuc FL, Rosenberg JM (1967):  
The bone induction principle. *Clin Orthop* 53: 243-283
- 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
- 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
- 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
- Whitehouse WJ (1976):  
Errors in area measurement in thick sections, with special reference to trabecular bone. *J Microsc* 107: 183-187
- Wolff J (1892):  
Das Gesetz der Transformation der Knochen. *Hirschwald, Berlin*
- Würzler KK, Mäusle S, Kübler NR, Bill JS, Reinhart E, Reuther JF (2002):  
Einfluss von Implantatlager und Trägermaterial bei der BMP-2-induzierten Knochenregeneration – Eine histologische Studie bei Ratten. *Dtsch Zahnärztl Z* 57: 701-709
- 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
- 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

Ganz herzlich danke ich Herrn PD Dr. med. Dr. med. dent. Johannes Kleinheinz für die Überlassung des Themas und das Ermöglichen des experimentellen Teils dieser Arbeit und die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, für die Fürsorge, für sein großes Engagement und die ständige Bereitschaft zu Diskussionen und zur Lösung von auftretenden Problemen während der Vorbereitung der Experimente und für die wissenschaftliche Betreuung dieser Arbeit. Er stand nicht nur bei Fragen unterstützend zur Verfügung, sondern verstand zu motivieren und Assoziationen zu wecken.

Weiter wäre ohne die Unterstützung von kompetenten Spezialisten der Teilfachgebiete eine korrekte Durchführung und Auswertung der Arbeit nicht möglich gewesen. Deshalb danke ich Herrn PD Dr. H.-P. Wiesmann (Klinik und Poliklinik für Mund- und Kiefer-Gesichtschirurgie, Institut für Biomimikulation) für die Einführung in die Biomimikulation und deren Arbeitstechniken.

Ein Dank geht an Herrn Prof. Dr. U. Stratmann (Institut für Anatomie), der stets Zugang zu seinen Laboratorien ermöglichte und seine Unterstützung bei der mikroskopischen Untersuchung bereithielt.

Besonderer Dank geht auch an Frau K. Cebulla (Institut für Anatomie), die uns durch ihre Erfahrung und Kompetenz in medizinisch-technischen Angelegenheiten des öfteren vor Fehlern bewahren konnte und für klare Fakten sorgte, und an Fr. A. Struck (Klinik und Poliklinik für Mund- und Kiefer-Gesichtschirurgie) für ihr Vertrauen, ihre ständige Hilfsbereitschaft und das allgegenwärtige Lächeln.

Meinen Arbeitsgruppenkollegen J. Brockmann, C. Lunatschek und C. Fischer möchte ich danken, da mit ihnen die bis in die Nacht dauernden Labortage mit viel Freude zu bewältigen waren.

Dr. K. Mokryś danke ich für seine Hilfe während der Schwierigkeiten mit der EDV. Herzlichen Dank auch an alle Mitarbeiter der zentralen tierexperimentellen Einrichtung für die tierliche und sorgfältige Betreuung der Tiere.

Natürlich danke ich auch meiner Familie für die unbegrenzte Motivation und die Sorge in den langen Abenden und Nächten, die ich mit der Niederschrift der Dissertation verbrachte.



# ANHANG

## Geräte – Verbrauchsmaterialien - Chemikalien

Alkohol 100% Isopropanol	Zentralapotheke der Uniklinik Münster
Alkohol 96%	Zentralapotheke der Uniklinik Münster
Alkohol 90%	Zentralapotheke der Uniklinik Münster
Alkohol 70%	Zentralapotheke der Uniklinik Münster
Alkohol 50%	Zentralapotheke der Uniklinik Münster
Anilin blau – Orange G	Chroma Diagonal, Münster
Aqua dest.	Zentralapotheke der Uniklinik Münster
Azocarmin	Merck, Darmstadt
Azophloxin	
Carboxyxylool	
Celloidin-Äther	
Dako Emission	Dakopatts, Glostrup, Dänemark
DePeX Methacrylat	
Diafilme Ektachrome 65 T Kunstlichtfilm	Kodak, Stuttgart
Diastapelscanner LS-2000	Nikon, Düsseldorf
Eindeckmaterial DePeX	Boehriner, Ingelheim
Eisenhämatoxylin nach Weigert	
Eisessig-Alkohol	Merck, Darmstadt
Eosin	
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethylendiamin-tetraessigsäure (EDTA)	Serva, Heidelberg
Fotoapparat F-801	Nikon, Japan
Hämatoxylin n. Mayer	
Hornowsky-Goldner	
Kochsalzlösung	
Kollagen Typ-I	Resorba, Nürnberg
Kollagen Typ-I mit 800ng VEGF <sub>165</sub>	Resorba, Nürnberg
Lichtgrün	
<u>Mikroskope</u>	
Durchlichtmikroskop Universal R	Zeiss, Oberkochen
Fotomikroskop, Diaphot-TDM 114	Nikon, Japan

## Narkotika und Anästhetika

Atropinsulfat	
Ketanest	
Ultracain 2%	Aventis Pharma, Frankfurt (Main)
Xylazin 2%	Sanofi-Ceva, Düsseldorf
Objektträger Superfrost	Langenbrinck, Emmeningen
Okularmikrometer	
Paraformaldehyd 4%	Merck, Ismaning
Paraffin Paraplast	Pelco Int., Redding, USA
PBS (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )- nach Sörensen	Merck, Ismaning
Phosphomolybdänsäure-Orange	
Phosphorwolframsäure	
Probengefäße	Coulter, Krefeld
Resorcin-Fuchsin nach Weigert	
Rotationsmikrotom	Jung-Reichert, Bensheim
<u>Software</u>	
Image Tool 2.0	University of Texas, San Antonio
Photoshop 5.0	Adobe, Mountain View, USA
Scion Image 4.02	Scioncorporation, USA
SPSS 9.0	SPSS Inc., Chicago, USA
Tötungsmittel T61	
VEGF <sub>165</sub>	R&D Systems, Wiesbaden
Xylol	Merck, Darmstadt
Zedernholzöl	



## Bezirksregierung Münster

Bezirksregierung Münster - 48128 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

48149 Münster

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

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 (BGBl. 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

48129 Münster

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

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.

Pi-UL

( Dr. Piontkowski )