

**Aus dem Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie
der Medizinischen Fakultät**

der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

(Direktor: Professor Dr. med. M.D. Menger)

**VASKULARISIERUNG UND BIOKOMPATIBILITÄT DER
INJIZIERBAREN HYDROXYLAPATIT-PASTE OSTIM IM VERGLEICH
ZU BIOLOGISCHEN UND SYNTHETISCHEN
KNOCHENERSATZSTOFFEN**

- Eine experimentelle *in vivo* Studie am Syrischen Goldhamster -

als Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes

2008

vorgelegt von Kristina Witt

geboren am 06.11.1981 in Zweibrücken

Datum:

Dekan:

Berichterstatter:

meiner Familie

INHALT

1.	ZUSAMMENFASSUNG	1
1.1.	Analyse der Vaskularisierung und Biokompatibilität der injizierbaren Hydroxylapatit-Paste Ostim im Vergleich zu biologischen und synthetischen Knochenersatzstoffen	1
2.	SUMMARY	3
2.1.	Analysis of vascularization and biocompatibility of the injectable hydroxylapatite-paste Ostim in comparison to biological and synthetic bone substitutes	3
3.	EINLEITUNG	5
4.	ZIEL DER STUDIE	10
5.	MATERIAL UND METHODIK	11
5.1.	Versuchstiere	11
5.2.	Modell	11
5.2.1.	Mikrozirkulationsmodell Rückenhautkammer	11
5.2.2.	Implantation der Rückenhautkammer	13
5.2.3.	Isolierung der Spongiosa	15
5.2.4.	Ostim	17
5.2.5.	Ostim S	18
5.2.6.	Cerabone	19
5.2.7.	Silikon	20
5.3.	Implantation der Knochenersatzstoffe	20
5.4.	Intravitale Fluoreszenzmikroskopie	22
5.4.1.	Mikrozirkulatorische Parameter	24
5.4.1.1.	<i>Fließverhalten der Leukozyten</i>	24
5.4.1.2.	<i>Gefäßpermeabilität</i>	25

5.4.1.3. Gefäßdurchmesser	25
5.4.1.4. Blutzellgeschwindigkeit	26
5.4.1.5. Mikrovaskulärer Blutfluss	26
5.4.1.6. Scherrate	27
5.4.1.7. Angiogenese-positive Felder	27
5.4.1.8. Funktionelle Kapillardichte	27
5.5. Konventionelle Histologie und Immunhistochemie	28
5.6. Experimentelles Protokoll	28
5.6.1. Versuchsablauf	28
5.6.2. Experimentelle Gruppen	29
5.7. Statistik	30
6. ERGEBNISSE	31
6.1. Mikrozirkulation der Rückenhautkammer	31
6.2. Implantation und Revaskularisierung der Knochenersatzstoffe	32
6.3. Reaktion des Empfängergewebes	33
6.3.1. Entzündung	33
6.3.1.1. Leukozyten-Endothelzell-Interaktion	34
6.3.1.2. Makromolekulare Gefäßpermeabilität	37
6.3.2. Mikrohämodynamik	37
6.3.2.1. Gefäßdurchmesser	37
6.3.2.2. Blutzellgeschwindigkeit	40
6.3.2.3. Scherrate	41
6.3.2.4. Mikrovaskulärer Blutfluss	42
6.3.3. Vaskularisierung der implantierten Knochenersatzstoffe	43
6.3.3.1. Angiogenese-positive Felder	44
6.3.3.2. Funktionelle Kapillardichte	44
6.4. Einfluss der Größe und der Anordnung implantierter	49
Ostim-Fragmente auf die Reaktion des Empfängergewebes	
6.5. Histologie und Immunhistochemie	56
6.5.1. Hämatoxylin-Eosin-Färbung	56
6.5.2. PCNA	56
6.5.3. Caspase-3-Färbung	58
6.5.4. CAE-Färbung	59

6.6.	Zusammenfassung der Ergebnisse	61
7.	DISKUSSION	62
7.1.	Diskussion von Material und Methodik	62
7.1.1.	Diskussion des Modells	62
7.1.2.	Diskussion der Untersuchungstechniken	64
7.2.	Diskussion der Untersuchungsergebnisse	66
7.3.	Schlussfolgerungen	72
7.4.	Klinische Perspektiven	72
8.	LITERATURVERZEICHNIS	74
9.	DANKSAGUNGEN	90
10.	LEBENS LAUF	91

1. ZUSAMMENFASSUNG

1.1. Analyse der Vaskularisierung und Biokompatibilität der injizierbaren Hydroxylapatit-Paste Ostim im Vergleich zu biologischen und synthetischen Knochenersatzstoffen

In der Traumatologie und Orthopädie spielt der Knochenersatz eine immer wichtigere Rolle. So müssen häufig große Knochendefekte, die bei Frakturen oder nach der Resektion von benignen Knochtumoren und Knochenzysten entstehen, durch Knochenersatzstoffe aufgefüllt werden. Entsprechend wurden in den letzten Jahrzehnten eine Vielzahl unterschiedlicher Materialien und Methoden für den Knochenersatz entwickelt.

Derzeit gilt die autologe Transplantation von frisch isolierter Spongiosa als Goldstandard für den Knochenersatz. Dieses Verfahren kann jedoch mit einer Reihe von Komplikationen einhergehen, wie z.B. chronischen Schmerzen und Wundheilungsstörungen an der Entnahmestelle. Aus diesem Grund wurden in den letzten Jahren eine Reihe von Biomaterialien entwickelt, die als synthetische Knochenersatzstoffe dienen können. Zu ihnen zählen die klassischen Kalziumphosphatkeramiken aus Hydroxylapatit, die wegen ihrer guten Biokompatibilität häufig klinisch eingesetzt werden. Neuere Formen von Knochenersatzstoffen sind injizierbar, damit leicht zu handhaben und werden mit der Zeit vom Organismus abgebaut. Zu diesen Materialien gehört Ostim, eine Hydroxylapatit-Paste die aus phasenreinen Hydroxylapatit-Kristallen als eine Suspension in Wasser besteht.

In der vorliegenden Arbeit wurde in der Rückenhautkammer des Syrischen Goldhamsters die Vaskularisierung und Biokompatibilität von Ostim im Vergleich zu häufig verwendeten synthetischen Knochenersatzstoffen sowie zur Spongiosa untersucht. Hierzu wurde die Technik der intravitalem Fluoreszenzmikroskopie verwendet, die eine repetitive Analyse der angiogenen und inflammatorischen Reaktion auf die Implantate in der Rückenhautkammer ermöglichte.

Für die Untersuchungen wurde den Versuchstieren Ostim (konventionell oder stöchiometrisch hergestelltes Ostim) implantiert, das eine hohe Viskosität besitzt und mit seiner kristallinen Struktur der mineralischen Phase des natürlichen Knochens gleicht. Als weitere Gruppe untersuchten wir die Hydroxylapatit-Keramik Cerabone, die zu den häufig eingesetzten synthetischen Knochenersatzstoffen zählt. Zusätzlich wurde isogen transplantierte Spongiosa analysiert. Des Weiteren wurde in einer Gruppe Silikon in die Rückenhautkammer implantiert, welches in vielen Bereichen der Medizin verwendet wird, da es als biologisch inertes Material gilt. Leere Rückenhautkammern ohne Implantate dienten als Kontrolle.

Ostim wies eine gute Biokompatibilität auf, was sich in einer physiologischen Leukozyten-Endothelzell-Interaktion zeigte, die mit derjenigen der anderen untersuchten Materialien vergleichbar war. Auch die mikrohämodynamischen Parameter zeigten keine relevanten Unterschiede in den Untersuchungsgruppen. Alle implantierten Stoffe riefen eine angiogene Reaktion im Empfängergewebe hervor. Im Vergleich zu Ostim vaskularisierte die transplantierte Spongiosa besser, was sich an einer vermehrten Anzahl von Angiogenese-positiven Feldern und einer erhöhten funktionellen Kapillardichte der neu gebildeten Gefäße zeigte. Mittels Histologie konnte gezeigt werden, dass sowohl konventionell, als auch stöchiometrisch hergestelltes Ostim von neu gebildeten Kapillaren durchzogen waren und die Materialien an einigen Stellen bereits resorbiert wurden. Die Spongiosa war vollständig von Granulationsgewebe umgeben, welches die höchste Dichte an neu gebildeten Blutgefäßen aufwies. Implantiertes Cerabone und Silikon waren nur an ihrer Oberfläche von neuen Kapillaren überzogen, die jedoch nicht in das jeweilige Material einwachsen konnten. In der Gruppe ohne Implantate in der Rückenhautkammer fand wie erwartet keine Angiogenese statt.

Aus den gewonnenen Erkenntnissen dieser Studie geht hervor, dass synthetische Knochenersatzstoffe wie Ostim durchaus eine gute Alternative zur Spongiosa bei der Auffüllung von Knochendefekten darstellen. Ostim ist ebenso biokompatibel wie Spongiosa und bietet den wichtigen Vorteil, dass es im klinischen Einsatz durch seine Injizierbarkeit gut handzuhaben ist. Das Einwachsen neuer Blutgefäße in Ostim erfolgte zwar langsamer als bei der Spongiosa, dennoch wurde Ostim im Zeitverlauf gut in das Empfängergewebe inkorporiert und mit der Zeit resorbiert. Die langsamere Angiogenese der synthetischen Knochenersatzstoffe im Vergleich zur Spongiosa könnte zukünftig noch durch Kombination der synthetischen Knochenersatzstoffe mit pro-angiogenen Wachstumsfaktoren verbessert werden.

2. SUMMARY

2.1. Analysis of vascularization and biocompatibility of the injectable hydroxylapatite-paste Ostim in comparison to biological and synthetic bone substitutes

In orthopaedics and traumatology, bone replacement plays an increasingly important role. Therefore, large bone defects, which develop after fracture or resection of benign bone tumours and bone cysts, frequently have to be filled up by bone substitutes. Thus, many different materials and methods for bone replacement have been developed over the last few decades.

Currently, autologous transplantation of freshly isolated spongiosa is considered the golden standard for bone replacement. This procedure may be associated with a number of complications, for example chronic pain and wound healing complications at the donor site. To prevent this, different biomaterials have been developed to serve as synthetic bone substitutes. These include the classical calciumphosphate ceramics made of hydroxylapatite, which are often used clinically because of their good biocompatibility. Newer forms of bone substitutes are injectable, easy to handle and also degradable over time by the organism. One of these materials is Ostim, a hydroxylapatite-paste, which contains phase pure hydroxylapatite crystals as a suspension in water.

In the present work, vascularization and biocompatibility of Ostim was investigated in comparison to frequently used synthetic bone substitutes and spongiosa in the dorsal skinfold chamber of Syrian golden hamsters. For the repetitive analysis of the angiogenic and inflammatory reaction to the implants in the dorsal skinfold chamber, the technique of intravital fluorescence microscopy was used.

For the investigation, Ostim (conventional or stoichiometrically manufactured Ostim) was implanted, which has a high viscosity and is similar to the natural bone due to its crystalline structure of the mineral phase. Besides, we examined the hydroxylapatite-ceramic Cerabone, one of the frequently used synthetic bone substitutes. Additionally, isogenic transplanted spongiosa was analyzed. Finally, silicone was implanted in one group, which is used in many fields of medicine because of its inert properties. Empty dorsal skinfold chambers without implants served as controls.

Ostim exhibited a good biocompatibility, as indicated by a physiological leucocyte-endothelial cellinteraction comparable to that of the other investigated materials. There were no relevant differences in microhemodynamics between the groups. All implanted materials

induced an angiogenic response in the host tissue. Compared to Ostim, the vascularization of transplanted spongiosa was more pronounced, as indicated by a higher number of angiogenesis-positive fields and an increased functional capillary density of the newly formed vessels. Histological examination of the implants showed that both conventional and stoichiometrically manufactured Ostim were pierced by newly formed capillaries and showed also areas of resorption. The spongiosa was surrounded by granulation tissue, which was characterized by the highest density of newly formed blood vessels. Implanted Cerabone and silicone were covered with new capillaries only on the surface. In the group without implants in the dorsal skinfold chamber there was no angiogenesis.

The present study suggests, that the synthetic bone substitute Ostim is a good alternative to spongiosa for the replenishment of bone defects. Ostim is as biocompatible as spongy bone and offers the important advantage of its good handling properties in clinical use. Although the ingrowth of new blood vessels into Ostim was delayed when compared to spongy bone, Ostim was incorporated well in the host tissue after 14 days. The delayed vascularization of synthetic bone substitutes in comparison to the spongiosa may be improved in the future through a combination of the synthetic bone substitutes with pro-angiogenic growth factors.

3. EINLEITUNG

Der menschliche Knochen dient als Stützskelett für den Körper, schützt die inneren Organe, ist Ort der Blutbildung und wesentlich am Kalziumhaushalt beteiligt. Alle Knochen sind von Periost, einer Bindegewebshaut, umgeben. Der eigentliche Knochen wird in die äußere Substantia corticalis (Kortikalis) und die innere Substantia spongiosa (Spongiosa) untergliedert [Deetjen und Speckman, 1999]. Die Spongiosa ist ein schwammartiges Gerüstwerk aus kleinsten Trabekeln zwischen denen sich das Knochenmark befindet. Der Knochen selbst besteht aus den Knochenzellen und der Knochenmatrix, die von versorgenden Blutgefäßen durchzogen ist.

Die Knochenzellen werden unterschieden in Osteoblasten, die neuen Knochen aufbauen [Rodan und Martin, 1981], Osteoklasten, die Knochen resorbieren sowie Osteozyten, welche die Knochenmatrix kalzifizieren (Abbildung 1). Die Knochenmatrix setzt sich zu 10% aus Wasser, zu 20% aus organischen und zu 70% aus anorganischen Anteilen zusammen. Zu den organischen Materialien zählen vor allem Kollagen Typ I, Osteonectin, Osteocalcin und

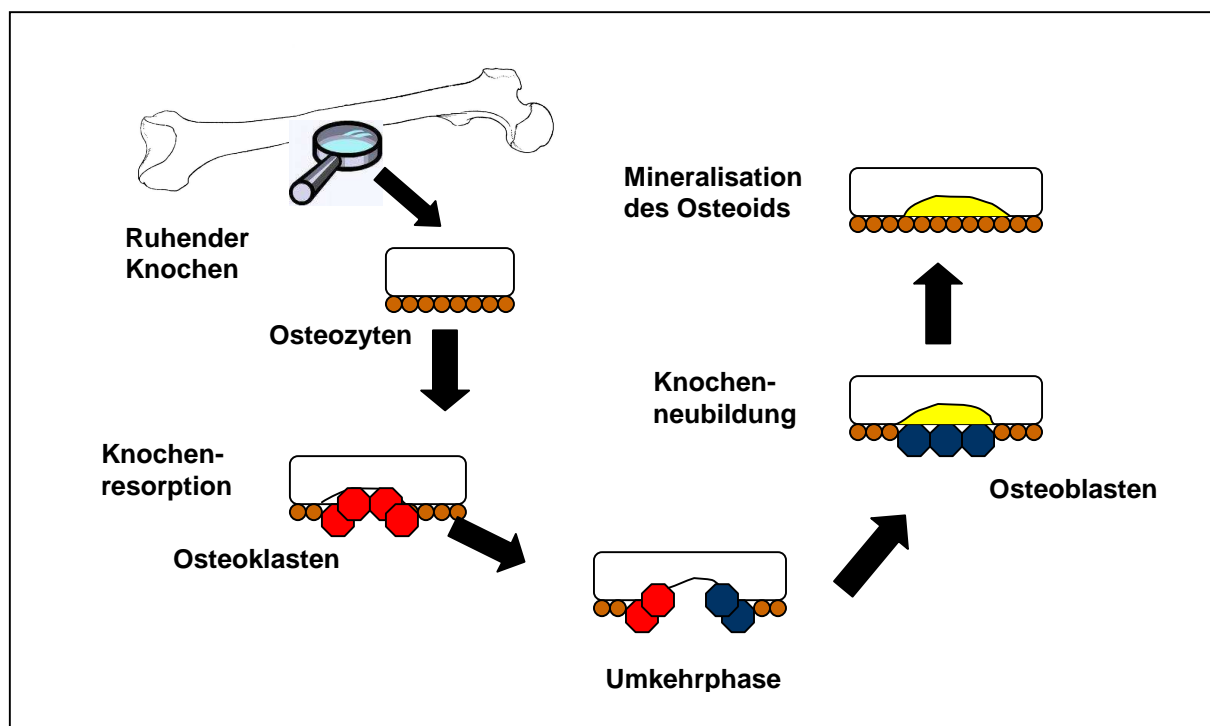


Abbildung 1: Physiologischer Knochenstoffwechsel: Der ruhende Knochen ist durchsetzt mit Osteozyten, welche die Mineralisierung des Osteoids sicherstellen. Durch verschiedene Stimuli werden Osteoklasten aktiviert, die mit der Knochenresorption beginnen. In der Umkehrphase wird durch mononukleäre Zellen die Resorption beendet und es lagern sich Osteoblasten-Vorläuferzellen an, die als Osteoblasten mit der Knochenneubildung beginnen. Das neu gebildete Osteoid wird dann von den Osteozyten wieder mineralisiert. Der gesamte Prozess dauert ca. drei Monate.

schiedene Proteoglycane [Buckwalter et al., 1996a]. Der anorganische Anteil besteht in erster Linie aus Hydroxylapatit mit der chemischen Formel $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)(\text{OH})$.

Knochenauf- und abbau befinden sich beim Gesunden in einem Gleichgewicht, dass durch eine Vielzahl von Hormonen aus unterschiedlichen Geweben reguliert wird [Wang et al., 1997]. Die Mineralisierung des Knochens erfolgt durch Einlagerung von Pyrophosphat, Kalzium und Phosphat, deren Plasmakonzentrationen wiederum von Calcitriol (Vitamin D3), [Schlaeppli et al., 1997] und Parathormon [McSheehy und Chambers, 1986] abhängig sind. Die Bildung der Knochenmatrix wird u.a. durch Insulin und Calcitonin gefördert und durch Glucocorticoide gehemmt. Dieses Regulationsystem ist verantwortlich für das Knochenwachstum, die Knochenbruchheilung [Buckwalter et al., 1996b] und den physiologischen Knochenumbau, der unter anderem durch mechanische Belastung statt findet [Nomura und Takano-Yamamoto, 2000]. So kann ein lokalisierter Abbau von Knochen durch den Osteoklasten-aktivierenden Faktor (OAV) hervorgerufen werden, der z.B. im Rahmen von Tumorerkrankungen zur Entmineralisierung des Knochens führt [Silbernagel und Lang, 2005].

Bei Verletzungen des Knochens ist der Körper normalerweise in der Lage, den entstandenen Defekt über primäre oder sekundäre Frakturheilung zu verschließen [Reddi, 1998]. Dabei besitzt der Knochen die erstaunliche Fähigkeit, ohne Defektheilung und Narbenbildung zu regenerieren [Salgado et al., 2004]. Die Knochenheilung ist ein komplexer Vorgang, der von verschiedenen Wachstumsfaktoren abhängig ist [Probst und Spiegel, 1997; Wozney und Rosen, 1998; Bolander 1992; Lieberman et al., 2002]. Hierzu zählen beispielsweise Epidermal Growth Factor (EGF), Fibroblast Growth Factor (FGF), Insulin-like Growth Factor (IGF), Keratinocyte Growth Factor (KGF), Platelet-derived Growth Factor (PDGF), Transforming Growth Factor (TGF) und Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF).

Es werden zwei Arten der Knochenheilung, die primäre und die sekundäre Frakturheilung, unterschieden. Die primäre Frakturheilung kann nur stattfinden, wenn die Bruchenden optimal adaptiert und mechanisch stabil sind. Der Frakturspalt wird hierbei direkt, durch die stattfindenden Knochenumbauvorgänge überbrückt. Die sekundäre Frakturheilung erfolgt hingegen bei nicht vollständig adaptierten Knochenenden, Instabilität oder großen begleitenden Weichteilschäden. Sie verläuft in mehreren Phasen. Während der Initialphase wird das Frakturhämatom abgeräumt. Danach folgt die Phase der Kallusbildung, in der ein fibröses knorpeliges Knochengewebe (Primärkallus oder Brückenkallus) aus den Zellen des umliegenden Gewebes gebildet wird. Bis zur sechsten Woche kommt es während der Phase der Kallusmineralisation zur Einlagerung von Kalziumkristallen, so dass eine feste mechanische Ver-

bindung entsteht. Mit zunehmender mechanischer Belastung wird der Kallus schließlich zu lamellärem Knochen mit spongiösen und kompakten Knochenstrukturen umgebildet [Motoki und Mulliken, 1990].

Beiden Arten der Knochenheilung ist gemeinsam, dass sie nur stattfinden, wenn die Knochenfragmente ausreichend durchblutet und mit Nährstoffen versorgt sind, d.h. keine Nekrosen bestehen. Zudem dürfen sich die Frakturrenden nicht zu stark bewegen, da andernfalls die Gefahr der Pseudarthrosenbildung besteht. Eine weitere Voraussetzung für die Knochenheilung ist die Infektionsfreiheit an der Frakturstelle [Niedhard und Pfeil, 2003].

Ziel der Frakturbehandlung ist es, die Kontinuität des Knochens ohne Funktionsstörungen wiederherzustellen. In der modernen Medizin wird die Knochenheilung konservativ, durch Ruhigstellung z.B. im Gipsverband oder operativ, durch Osteosynthesen unterstützt [Perry, 1999]. Hierbei kommen schon seit vielen Jahren Nägel, Platten und Schrauben aus den verschiedensten Materialien, wie z.B. Titan und Silikon oder Keramiken [Cameron et al., 1977], zum Einsatz. Bleibt allerdings die physiologische Knochenheilung bei Frakturen aus oder ist der Knochen durch Zysten [Adamsbaum et al., 1993] oder Tumoren [Lobo Gajiwala et al., 2003; Matsumine et al., 2004] zerstört, müssen die Defekte durch Knochenersatzstoffe aufgefüllt werden. Im Bereich der Traumatologie [Ladd und Pliam, 2001], Neurochirurgie [Sannan und Haines, 1997], Orthopädie [Kaemmerlen et al., 1989] und Zahnmedizin [Nicholson, 1998] spielt deshalb der Knochenersatz eine zunehmend wichtige Rolle. So ist Knochen derzeit das am zweithäufigsten transplantierte Gewebe. In den USA werden jährlich 500.000 und weltweit mehr als 2,2 Millionen Transplantationen zur Rekonstruktion von Knochendefekten durchgeführt [Giannoudis et al., 2005]. Die Transplantation von Knochen und Knochenersatzstoffen kostete das Gesundheitssystem in den USA 1999 nahezu 300 Millionen US-Dollar [Greenwald et al., 2001]. Entsprechend gibt es eine Vielzahl unterschiedlicher Methoden zur Knochensubstitution, die in den letzten Jahrzehnten entwickelt wurden.

Zurzeit stellt die Transplantation frisch isolierter, autologer Spongiosa aus dem Beckenknochen den Goldstandard in der Knochenrekonstruktion dar. Autologe Spongiosa enthält Wachstumsfaktoren sowie Stammzellen und besitzt daher optimale osteogene, osteoinduktive und osteokonduktive Eigenschaften [Giannoudis et al., 2005]. Osteokonduktiv bedeutet hierbei, dass das Material Oberflächeneigenschaften besitzt, die es dem Empfängergewebe ermöglichen, darauf anzuwachsen und neuen Knochen zu bilden. Osteoinduktiv bedeutet dagegen, dass die Differenzierung von pluripotenten Stammzellen des umliegenden Gewe-

bes angeregt wird, so dass diese sich z.B. zu Osteoblasten differenzieren, die dann neuen Knochen bilden.

Allerdings birgt die Transplantation autologer Spongiosa auch Risiken für den Patienten. In einigen Fällen ist die Menge der isolierten Spongiosa nicht ausreichend, um größere Knochendefekte komplett aufzufüllen. Außerdem wird durch die Entnahme der Spongiosa die Zeit des operativen Eingriffs deutlich verlängert, was das Narkoserisiko und die Morbidität des Eingriffs erhöht [Younger und Chapman, 1989]. Zusätzlich kann die Isolierung der Spongiosa mit zahlreichen Komplikationen an der Entnahmestelle verbunden sein [Ebraheim et al., 2001]. So wird die Rate an schwerwiegenden Komplikationen mit 0,75% bis 25% und die der leichteren mit 9,4% bis 24% angegeben [Banwart et al., 1995]. Zu den schwerwiegenden Komplikationen rechnet man Gefäßverletzungen, Nervenverletzungen, Herniationen von Darminhalt durch Entnahmelücken, tiefe Infektionen und Beckenfrakturen. Zu den leichteren Komplikationen zählen oberflächliche Infektionen, Serome und kleine Hämatome [Arrington et al., 1996]. Des Weiteren leiden einige Patienten postoperativ unter chronischen Schmerzen an der Entnahmestelle [Ross et al., 2000].

Als Alternative zur Spongiosa könnten Allografts von toten Spendern [Boyce et al., 1999] oder Xenografts anderer Spezies als Knochenersatzstoffe [Gazdag et al., 1995] dienen. Hier besteht allerdings die Gefahr einer gesteigerten Immunantwort [Strong et al., 1996] und der Verbreitung von Infektionskrankheiten wie HIV [Simonds et al., 1992] oder Hepatitis [Seiler und Johnson, 2000]. In Anbetracht all dieser Probleme entwickelte Charnley bereits 1960 einen künstlichen Knochenzement, der zur Knochenrekonstruktion eingesetzt werden konnte. In den letzten Jahrzehnten wurden immer bessere Biomaterialien entwickelt, die als Knochenersatzstoffe dienen können. Zu diesen Knochenersatzstoffen zählen Kalziumphosphat-Keramiken, Hydroxylapatit [Bloemers et al., 2003], bioaktives Glas [Chan et al., 2002], β -Tricalcium-Phosphat [Buchholz et al., 1987] und Poly-Composites [Aho et al., 2004]. Diese Materialien zeichnen sich durch eine gute Biokompatibilität aus und werden vom Empfänger-gewebe resorbiert, so dass sie mit der Zeit komplett durch neuen Knochen ersetzt werden können [Thorwarth et al., 2005]. Die synthetischen Knochenersatzstoffe sind erhältlich in Form von Pudern, Granula und in Blöcken [Ruhé et al., 2005]. Diese pharmazeutischen Darreichungsformen sind allerdings ungeeignet, wenn es darum geht, eine Knochenhöhle homogen aufzufüllen oder einen schwer zugänglichen Knochendefekt zu decken. Aus diesem Grund wurden in den letzten Jahren neue injizierbare Knochenersatzstoffe entwickelt [Gri-

mandi et al., 1998]. Hierzu zählt auch Ostim, eine vollsynthetische, nanopartikuläre, phasenreine Hydroxylapatit-Paste.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Vaskularisierung und Biokompatibilität von Ostim im Vergleich zu anderen synthetischen und biologischen Knochenersatzstoffen zu analysieren. Hierzu verwendeten wir das Modell der Rückenhautkammer des Syrischen Goldhamsters. Dieses Tiermodell bietet die Möglichkeit, die angiogene und inflammatorische Reaktion des Empfängergewebes auf implantierte Knochenersatzstoffe im zeitlichen Verlauf qualitativ und quantitativ mit Hilfe der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie zu untersuchen. Mit einem Videosystem können die mikroskopischen Bilder aufgezeichnet und anschließend mit einem Computer-assistierten Analysesystem ausgewertet werden [Menger et al., 2002]. Auf diese Weise können Zeichen einer möglichen inflammatorischen Reaktion wie eine veränderte Leukozyten-Endothelzell-Interaktion und Veränderungen der mikrovaskulären Permeabilität erfasst werden. Nach dem vierzehntägigen Versuchszeitraum werden zusätzlich histologische Präparate von den Implantaten in der Rückenhautkammer angefertigt. Diese geben zusätzliche Aufschlüsse über die Morphologie der Implantate und des neu gebildeten Granulationsgewebes, welches sich um die Implantate ausbildet.

4. ZIEL DER STUDIE

Das Ziel der vorliegenden experimentellen Studie war es, die injizierbare Hydroxylapatit-Paste Ostim bezüglich Vaskularisierung und Biokompatibilität *in vivo* zu untersuchen. Hierzu wurde Ostim mit verschiedenen anderen biologischen und synthetischen Knochenersatzstoffen verglichen, um eventuelle Vor- und Nachteile von Ostim aufzuzeigen. Dabei wurde auf folgende Fragen näher eingegangen:

1. Welche Unterschiede bestehen bezüglich der Vaskularisierung und der Biokompatibilität zwischen der Hydroxylapatit-Paste Ostim und frisch transplantierte Spongiosa, die zur Zeit den Goldstandard in der Knochenrekonstruktion darstellt?
2. Wie beeinflusst das Herstellungsverfahren von Ostim die Vaskularisierung und Biokompatibilität nach der Implantation in die Rückenhautkammer?
3. Welche Unterschiede bestehen zwischen Ostim und Cerabone, einer künstlichen Hydroxylapatit-Keramik zum Knochenersatz, bezüglich Vaskularisierung und Biokompatibilität?
4. Welche Unterschiede bestehen zwischen Ostim und Silikon, einem als bioinert geltenden Material, bezüglich Vaskularisierung und Biokompatibilität?
5. Welchen Einfluss hat die Größe und Anordnung implantierter Ostim-Fragmente auf das Einwachsen im Empfängergewebe?

5. MATERIAL UND METHODIK

5.1. Versuchstiere

Alle Untersuchungen der vorliegenden Studie erfolgten an Syrischen Goldhamstern. Die Versuchstiere stammten aus eigener Zucht des Instituts für Klinisch-Experimentelle Chirurgie (Universität des Saarlandes, Homburg/Saar). Die Tiere waren acht bis zehn Wochen alt und hatten ein Gewicht zwischen 60 und 80 g.

Während des Beobachtungszeitraums wurden die Tiere in einem klimatisierten Raum bei 12-stündigem Tag-/Nachtrhythmus gehalten. Nur für die Zeit der Untersuchungen wurden die Tiere kurzzeitig in das Labor gebracht. Die Haltung der Tiere erfolgte in Einzelkäfigen, unter Bereitstellung von Standardlaborfutter (Altromin, Lage, Deutschland) und Wasser *ad libitum*. Die Tierversuche waren entsprechend dem Tierschutzgesetz durch das Landratsamt der Stadt Homburg/Saar genehmigt. Nur Versuchstiere, die keine Anzeichen von Erkrankungen sowie normales Fress- und Putzverhalten aufwiesen, wurden in den Versuch aufgenommen.

5.2. Modell

5.2.1. Mikrozirkulationsmodell Rückenhautkammer

Als tierexperimentelles Modell zur Untersuchung der implantierten Knochenersatzstoffe diente die Rückenhautkammer des Syrischen Goldhamsters (*Abbildung 2*), die erstmals von Endrich et al. [1980] beschrieben wurde. Die Rückenhautkammer enthält quergestreifte Skelettmuskulatur, subkutanes Gewebe und Haut und ermöglicht die intravitalmikroskopische Untersuchung zahlreicher mikrozirkulatorischer Parameter. Durch die retrobulbäre Applikation verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe kann die gesamte Mikrozirkulation bis in die kleinsten Abschnitte des Gefäßsystems der freipräparierten Rückenhautmuskulatur beurteilt werden. So können die terminalen Arteriolen, die nutritiven Kapillaren sowie die postkapillaren Venolen und Sammelvenolen dargestellt werden. Das hier verwendete Modell bietet die Möglichkeit der repetitiven Untersuchung über einen Zeitraum von 2-3 Wochen, so dass dynamische Vorgänge wie die Ausbildung neuer Gefäßnetzwerke schrittweise verfolgt und dokumentiert werden können. Die anschließende Quantifizierung der erhobenen Parameter erfolgt mit einem speziellen Computer-assistierten Analysesystem.

Das Modell der Rückenhautkammer wurde in der Vergangenheit bereits in zahlreichen anderen Studien erfolgreich eingesetzt, um transplantierte Organgewebe wie Myokard [Funk et al., 1986], Knochenmark [Funk et al., 1986], Milz [Foitzick et al., 1988] und Langerhans'sche Inseln [Menger et al., 1989a; 1991] sowie Tumorgewebe und biologische bzw. synthetische Implantationsmaterialien [Menger et al., 1990, 1992a; Kraft et al., 2000] bezüglich Angiogenese und Vaskularisierung zu untersuchen. Weitere Einsatzmöglichkeiten dieses Modells sind die Analyse der Gewebepfusion unter pathologischen Bedingungen wie Entzündung [Westermann et al., 1999], Ischämie [Menger et al., 1989b] und Gewebetrauma [Yamauchi et al., 1999].

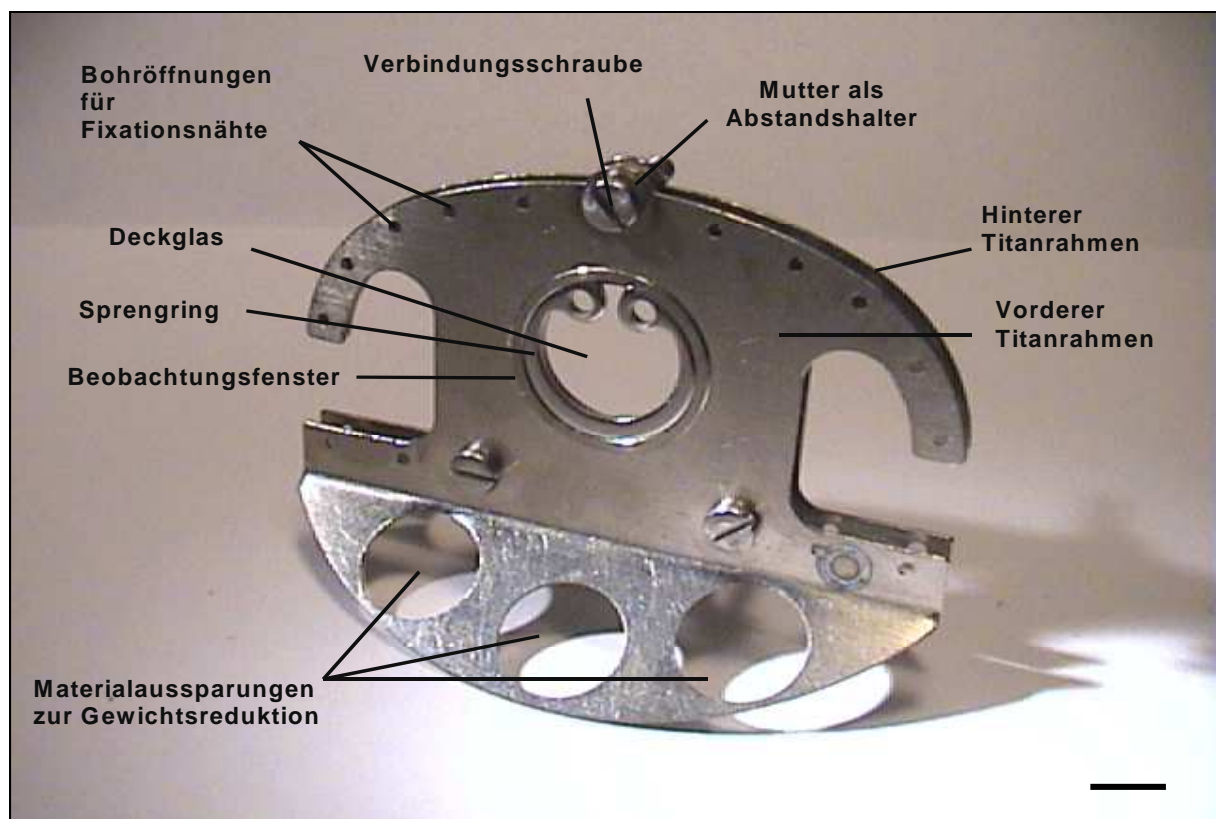


Abbildung 2: Rückenhautkammer für Hamster. Zwei spiegelbildlich konstruierte Titanrahmen werden durch drei Verbindungsschrauben mit Muttern zusammengehalten (Gewicht ~4,5g, Maße 48,5 x 13 x 30mm). Der Sprengring dient zur Fixation des Deckglases, welches das Beobachtungsfenster schützt. (Skalierung = 0,5cm)

5.2.2. Implantation der Rückenhautkammer

Zur Präparation der Rückenhautkammer wurde das Versuchstier zunächst durch intraperitoneale Injektion von Pentobarbital (50mg/kg Körpergewicht; Narcoren; Merial GmbH, Hallbermoos, Deutschland) narkotisiert. Anschließend konnte das Rückenfell durch Elektrorasur (Elektra II GH 204; Aeskulap, Tuttlingen, Deutschland) und nachfolgender chemischer Depilation (Pilca med Creme; Asid Bonz, Böblingen, Deutschland) entfernt werden. Nach Reinigung und Desinfektion der enthaarten Körperpartie mit 70%igem Alkohol wurde mit der eigentlichen Präparation der Rückenhautkammer begonnen. Hierzu wurde die Rückenhautfalte des Versuchstieres entlang ihrer Mittellinie mit zwei Haltefäden vertikal aufgespannt. Im Gegenlicht konnten auf diese Weise die entlang der Schulterbasis verlaufenden großen Versorgungsgefäße des Hamsters dargestellt werden (*Abbildung 3A*), um sie so bei der weite-



Abbildung 3: Wichtige Präparationsschritte bei der Implantation der Rückenhautkammer. **A)** Darstellung der Rückenhautgefäße durch Gegenlicht. **B)** Implantation des rückseitigen Titanrahmens. **C)** Entfernung der Kutis, Subkutis, des quergestreiften Unterhautmuskels und der zwei Schichten des Musculus retractor. **D)** Nach Fixierung des vorderseitigen Titanrahmens sind im Beobachtungsfenster die Blutgefäße des freipräparierten quergestreiften Hautmuskels zu erkennen.

ren Präparation vor Verletzungen zu schützen. Der rückseitige Rahmen der Kammer konnte mit zwei 5.0 Seide-Nähten am oberen Rand der aufgespannten Hautfalte befestigt werden. Die Verbindungsschrauben zum vorderen Teil der Kammer wurden dann durch zwei kleine Inzisionen geführt, die an der Basis der Rückenhautfalte vorsichtig präpariert wurden. Zur vorübergehenden Fixierung des Rahmens während der weiteren Präparation wurden zwei Gefäßklemmen auf die Verbindungsschrauben gesetzt (*Abbildung 3B*). Schließlich wurden die Haltefäden entfernt und das Versuchstier in Seitenlage unter ein Stereo-Operationsmikroskop (Wild, 38400, Heerbrugg, Schweiz) positioniert. Im Bereich des späteren Beobachtungsfensters der Kammer wurde dann mikrochirurgisch die dem Fenster zugewandte Kutis, Subkutis, der quergestreifte Hautmuskel sowie beide Schichten des Retraktormuskels samt subkutanem Fettgewebe entfernt (*Abbildung 4*). Der dadurch entstandene kreisrunde Bereich hatte einen Durchmesser von ca. 15mm. Er überschreitet somit leicht die Größe des eigentlichen Beobachtungsfensters (Durchmesser 11mm), um eine Gewebekompression und damit Beeinträchtigung der Gewebepерfusion nach dem Anbringen des vorderseitigen Rahmens zu vermeiden. Die verbleibenden Gewebeschichten, bestehend aus dem gegenüberliegenden gestreiften Hautmuskel, Subkutis und Kutis (*Abbildung 3C*), wurden mit

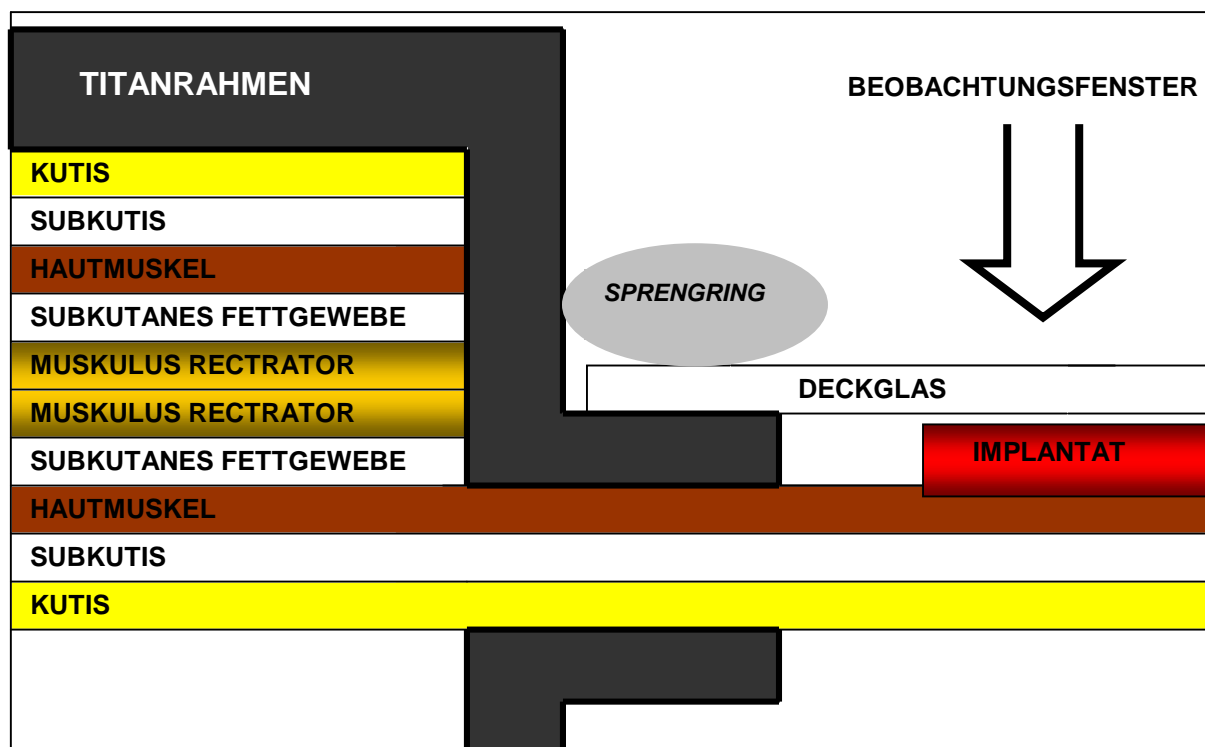


Abbildung 4: Schematische Darstellung der für die Kammerpräparation relevanten Schichten im Bereich der Rückenhaut (links) und des Beobachtungsfensters (rechts). Der Sprengring fixiert das gewebeschützende Deckglas innerhalb des Kammerrahmens. Zwischen Hautmuskel und Deckglas befindet sich das Implantat. Durch Abnehmen des Deckglases hat man jederzeit freien Zugang zur Präparation.

steriler Kochsalzlösung gespült und anschließend der vordere Kammerrahmen aufgesetzt. Dieser enthielt das Beobachtungsfenster mit Deckglas und wurde mittels Stahlmuttern und den Verbindungsschrauben in einem Abstand von ca. 0,5mm zur Kammerrückseite angebracht. Das Deckglas wurde durch Adhäsionskräfte auf dem freipräparierten Hautmuskel gehalten und mit einem Sprengring im Titanrahmen fixiert (*Abbildung 3D*). Auf diese Weise war es während des gesamten Versuchszeitraums möglich, durch Abnehmen des Deckglases freien Zugang zum Beobachtungsfeld der Präparation zu erhalten. Schließlich wurde noch der vordere Titanrahmen der Kammer an seiner Oberseite mit Haltefäden an der Hautfalte fixiert. Nach Ende der Präparation konnten sich die Versuchstiere für mindestens 48 Stunden von der Anästhesie und dem chirurgischen Trauma erholen, bevor der Versuch fortgesetzt wurde. Die Tiere tolerierten die Rückenhautkammern gut, was sich an einem normalen Schlafrhythmus und Fressverhalten der Tiere zeigte.

5.2.3. Isolierung von Spongiosa

In der Humanmedizin wird Spongiosa autolog transplantiert, d.h. Spender und Empfänger sind eine Person. Da das chirurgische Trauma für eine autologe Transplantation von Spongiosa in dieser Studie zu groß für die Hamster gewesen wäre, wurde die Spongiosa syngen transplantiert. Bei der syngen Transplantation gehören Spender und Empfänger derselben Spezies an und sind durch Inzucht genetisch weitgehend identisch.

Zur Isolierung der Spongiosa wurde das Spendertier (Alter: 8 Wochen; Gewicht: 70g) durch intraperitoneale Injektion einer Überdosis des Narkotikums Pentobarbital (mind. 150mg/kg Körpergewicht) euthanasiert. Nach der Injektion wurde sofort mit der Präparation der Tibia (*Abbildung 5A*) begonnen, um die Ischämiezeit der Spongiosa so kurz wie möglich zu halten. Hierzu wurden zunächst die Sehnen und Bänder der Kniegelenke der Hinterläufe durchtrennt und so der Unterschenkel amputiert (*Abbildung 5B*). Nach grober Reinigung der Tibia vom umgebenden Gewebe (Haut, Muskeln, Faszien und Fettgewebe) wurde der Tibiakopf mit einer wassergekühlten chirurgischen Knochensäge (Proxxon, FBS 240/E; Niersbach, Deutschland) (*Abbildung 5C*) durch den Condylus medialis und lateralis aufgesägt (*Abbildung 5D*). Anschließend wurden unter Verwendung eines Operationsmikroskops (Wild, 38400, Heerbrugg, Schweiz) kleine Stücke der Spongiosa vorsichtig mit einem Skalpell herausgeschält (*Abbildung 5F*). Nach der Isolierung wurde die Spongiosa bis zur Transplantation in DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, 10% FCS) aufbewahrt. Die Spongiosa wurde nicht weiter gereinigt, so dass sie mit allen Bestandteilen (Osteoblasten, Osteoklasten, Wachstumsfaktoren und Knochentrabekeln) transplantiert wurde.

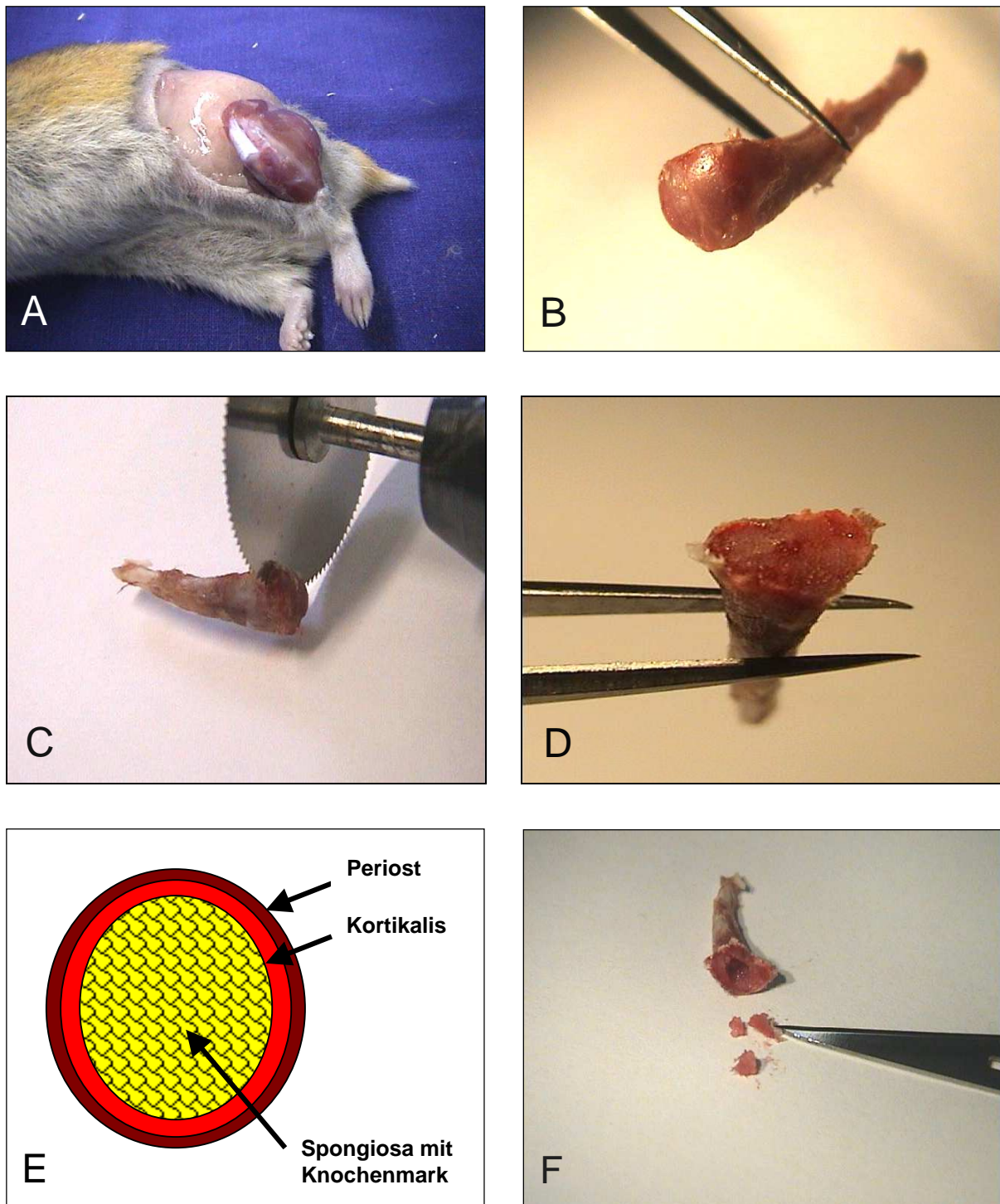


Abbildung 5: Isolierung von Spongiosa. **A)** Der Unterschenkel des Versuchstieres wird freipräpariert. **B)** Nach Amputation unterhalb des Kniegelenks werden Muskeln und Sehnen von der Tibia entfernt. **C)** Die Tibia wird horizontal durch beide Condyle aufgesägt. **D)** Bei Aufsicht auf die Sägefläche erkennt man die Kortikalis, welche die Spongiosa und die Knochenmarkshöhle umgibt. **E)** Schematische Darstellung einer querschnittenen Tibia. **F)** Mit einem Skalpell kann die Spongiosa vorsichtig aus dem Tibiakopf herausgeschält werden.

5.2.4. Ostim

Der Knochenersatzstoff Ostim ist eine gebrauchsfertige, injizierbare Paste, die aus vollsynthetischem, nanopartikulärem, phasenreinem Hydroxylapatit besteht. Ostim ist in zwei verschiedenen Darreichungsformen erhältlich, die sich bezüglich ihrer Viskosität voneinander unterscheiden. In der vorliegenden Studie wurde Ostim 35 (*Abbildung 6A*) verwendet, mit einem Feststoffgehalt von 35% und einem Wassergehalt von 65%. Seine Viskosität ermöglicht eine formschlüssige Applikation in Knochendefekte mit engem Kontakt zum Knochenlager. Die Resorptionsfähigkeit von Ostim im Organismus beruht auf seiner nanokristallinen Struktur, die eine schnelle Resorption durch Makrophagen und Osteoklasten ermöglicht [Huber et al., 2006]. Ostim wird schon nach wenigen Monaten vollständig resorbiert, so dass eine stabile knöcherne Durchbauung des Defektes möglich ist. Außerdem wirkt Ostim in geringem Maße osteokonduktiv, d.h. es beschleunigt die Proliferationsrate knochenbildender Zellen und stimuliert so die Knochenheilung und den schnellen Knochenaufbau auch großer Knochendefekte [Huber et al., 2007].

Ostim ist inzwischen europaweit zugelassen und schon bei mehr als 1000 Patienten klinisch erfolgreich eingesetzt worden. Indikationen zur Anwendung von Ostim sind u.a. Metaphysäre Frakturen und Zysten, Acetabulumrekonstruktionen, Osteotomien sowie Füllung von Cages in der Wirbelsäulen Chirurgie. Weitere Anwendungsgebiete sind die Auffüllung von Knochendefekten nach Resektion benigner Tumoren und Zysten sowie nach Entnahme von Spongiosa.

Klassifiziert wird Ostim als ein Medizinprodukt der Klasse III, das in einer nasschemischen Fällungsreaktion hergestellt wird. In seiner chemischen Zusammensetzung und kristallinen Struktur (*Abbildung 6D*) entspricht Ostim im Wesentlichen der Kalziumphosphatkomponente des natürlichen Knochens. Das Material ist gebrauchsfertig in sterilen Kartuschen abgefüllt (*Abbildung 6B*). Verantwortlicher Hersteller von Ostim ist die Osartis GmbH & Co. KG (Obernburg, Deutschland).

Wirkstoffcharakteristik von Ostim:

- Summenformel: $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$ Hydroxylapatit
- Ca/P-Verhältnis: 1,67
- Spezifische Oberfläche: 106 m²/g
- Kristallgröße: 17nm
- pH-Wert: 7,5

Für die Implantation in der Rückenhautkammer musste Ostim zunächst in eine geeignete Form und Größe gebracht werden. Durch seine Viskosität konnte Ostim für den Versuch einfach zwischen zwei Objektträgern zu einer Dicke von ca. 500µm gepresst, mit einem Skalpell in kleine quadratische Stücke (2,5 x 2,5mm) zurechtgeschnitten und anschließend implantiert werden (*Abbildung 6C*). In zwei weiteren Gruppen wurde Ostim zu kleineren Stücken mit einer Größe von ca. 1 x 1mm zurechtgeschnitten. Von diesen Stücken wurden dann jeweils vier Stücke in verschiedenen Anordnungen in die Kammern implantiert. In der Gruppe Ostim großer Implantatabstand betrug der Implantatabstand ca. 1,2mm und in der Gruppe Ostim kleiner Implantatabstand ca. 0,2mm.

5.2.5. Ostim S

Ostim S weist vergleichbare Materialeigenschaften wie Ostim auf. Der Unterschied zwischen den beiden Produkten besteht in ihrem Herstellungsverfahren. Die herkömmliche Herstellung von Ostim läuft pH-Wert gesteuert ab, wobei eine Calciumhydroxid-Emulsion entsteht. Diese wird unter festgelegten Bedingungen mit Phosphorsäure neutralisiert bis die Reaktion bei einem bestimmten pH-Wert beendet wird. Bis zu einem pH-Wert von ca. 9,5 entsteht dabei Hydroxylapatit mit einem Ca/P-Verhältnis von 1,67. Über diesen Schwellenwert hinaus entsteht unerwünschtes Calcium-defizitäres Hydroxylapatit. Rein rechnerisch muss hierbei mit einem geringen Säureüberschuss gearbeitet werden. Im Gegensatz dazu wird die Herstel-

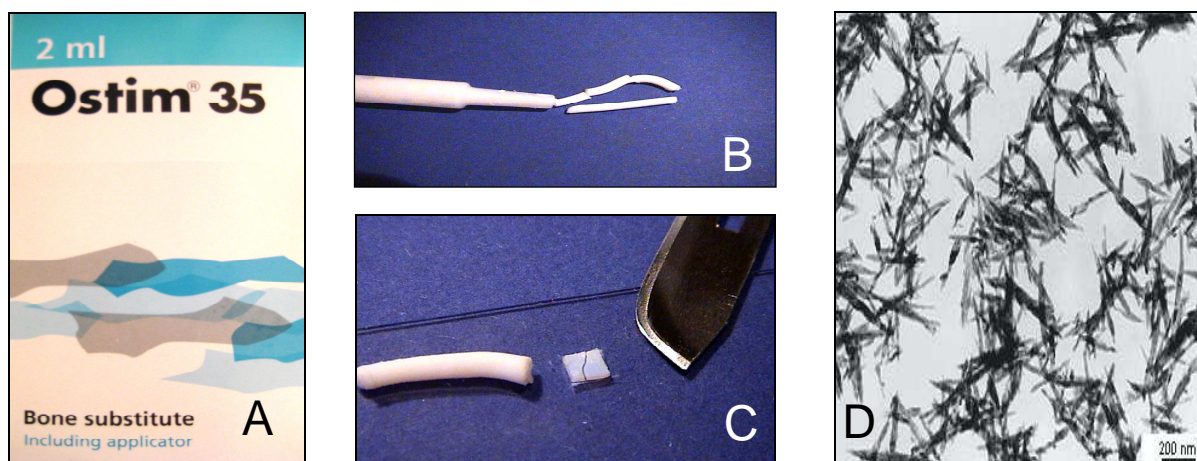


Abbildung 6: Ostim. **A)** Klinikpackung von Ostim 35. **B)** Mit der Ostim-Spritze kann die Paste direkt in einen knöchernen Defekt appliziert werden. **C)** Für die Implantation von Ostim in die Rückenhautkammer wurde die Paste zu kleinen Stückchen mit einem Durchmesser von ca. 2,5mm und einer Dicke von 0,5mm geformt. **D)** Transmissionselektronenmikroskopische Darstellung der Nanokristalle von Ostim 35.

lung von Ostim S (S = stöchiometrisch) über die Leitfähigkeit gesteuert. Der Herstellungsprozess wird hier beendet, wenn die Ionenkonzentration am geringsten, und somit nur noch Wasser und Ostim im Reaktionsgefäß vorliegen. Das so hergestellte Ostim S enthält dann neben Hydroxylapatit keine weiteren Fremdphasen mehr und ist daher reiner als Ostim. Die Proben von Ostim S für die Implantation in die Rückenhautkammer wurden wie bereits bei Ostim (siehe 5.2.4.) beschrieben aufbereitet.

5.2.6. Cerabone

Das Knochenersatzmaterial Cerabone ist eine Hydroxylapatit-Keramik, die aus anorganischen Kristallen besteht und sowohl als Formkörper wie auch als Granulat mit unterschiedlicher Korngröße zu Verfügung steht (*Abbildung 7A*). Für diese Studie wurde Cerabone in Form von Granula mit einer Größe von 0,5-1,6mm verwendet (*Abbildung 7B*). Cerabone besitzt eine Art Spongiosastruktur mit einem interkonnektierenden Makro- und Mikro-Porensystem (*Abbildung 7C*), das weitgehend mit dem des menschlichen Knochens identisch ist. Die optimale Porenweite und der neutrale pH-Wert von Cerabone ermöglichen eine komplette knöcherne Integration des Implantats nach dessen Einbau. Das Ausgangsmaterial für die Herstellung von Cerabone ist boviner spongiöser Knochen. Eine Gefahr immunologischer Reaktionen oder der Übertragung von Krankheitserregern besteht jedoch nicht, da infolge der Hochtemperaturbehandlung während der Herstellung von Cerabone im fertigen Produkt kein tierisches Resteiweiß mehr vorhanden ist. Verantwortlicher Hersteller von Cerabone ist Coripharm GmbH & Co.KG (Dieburg, Deutschland).



Abbildung 7: Die Hydroxylapatit-Keramik Cerabone. **A)** Darreichungsform von Cerabone Granulat F: Korngröße 0,5-1,6mm. **B)** Cerabone Granulat, drei bis vier dieser Granula wurden jeweils in eine Rückenhautkammer implantiert. **C)** Mikroskopische Aufnahme von Cerabone, man erkennt die interkonnektierenden Poren, die unterschiedliche Größen aufweisen. (Skalierung = 1000µm)

5.2.7. Silikon

Silikon gilt als bioinertes Implantatmaterial. Bioinert bedeutet, dass das Material keine Reaktion des Empfängergewebes an der Implantationsstelle hervorruft. Silikon wurde in der vorliegenden Studie daher in einer Kontrollgruppe implantiert. Hierzu wurde Silikon mit einer Stärke von 0,5mm in kleine Stücke von 2,5 x 2,5 mm zugeschnitten (*Abbildung 8*). Verantwortlicher Hersteller des hier verwendeten Silatos Silicone Sheeting ist die Atos Medical AB (Hörby, Schweden).

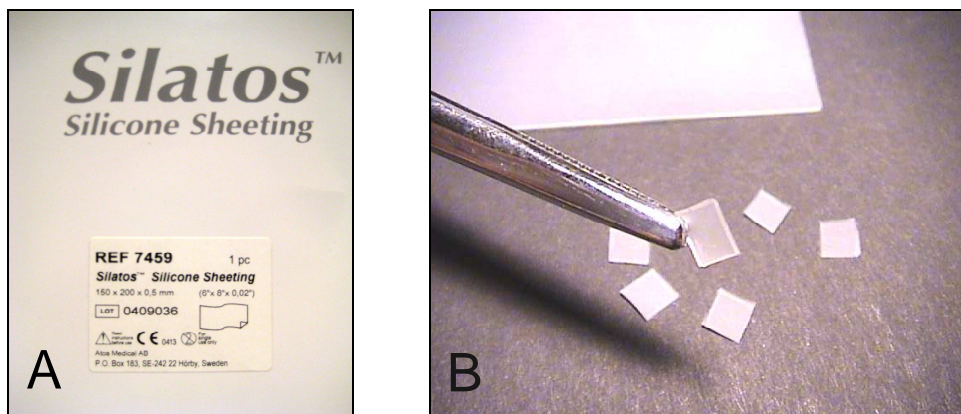


Abbildung 8: Silikon. **A)** Klinikpackung von Silatos Silicone Sheeting. **B)** Für die Implantation von Silikon in die Rückenhautkammer wurde das Material mit einer Dicke von 0,5mm in kleine quadratische Stücke mit einer Größe von ca. 2,5 x 2,5mm zugeschnitten.

5.3. Implantation der Knochenersatzstoffe

Für die Implantation der Knochenersatzstoffe wurden die Versuchstiere mit der Rückenhautkammer in einer Plexiglasröhre immobilisiert und auf einer speziell konstruierten Bühne in Seitenlage gebracht. Ein durchgehender Längsschlitz in der Plexiglasröhre ermöglichte den freien Zugriff zur Rückenhautkammer. Der Sprengring wurde entfernt und das Deckglas der Rückenhautkammer vorsichtig aus dem Titanrahmen gehoben. Um eventuelle Verunreinigungen zu entfernen, wurde das freipräparierte Gewebe nochmals mit 0,9% NaCl gespült. Anschließend wurden unter operationsmikroskopischer Sicht die verschiedenen Materialien im Zentrum der Kammerpräparation platziert (*Abbildung 9*).

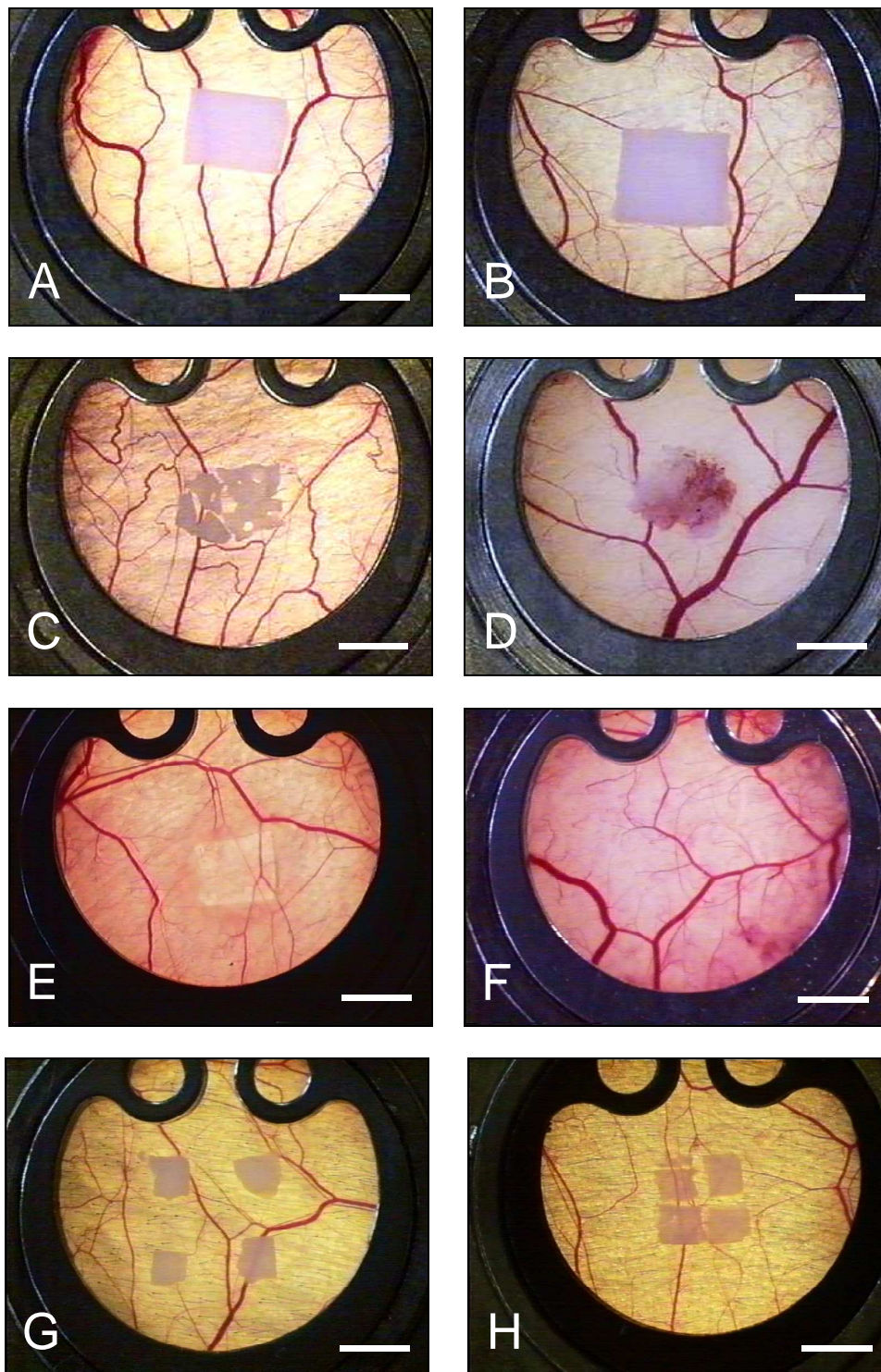


Abbildung 9: Operativmikroskopische Aufnahmen der Rückenhautkammer des Syrischen Goldhamsters direkt nach der Implantation der verschiedenen Knochenersatzstoffe. **A)** Ostim. **B)** Ostim S. **C)** Cerabone. **D)** Spongiosa. **E)** Silikon. **F)** Leere Kammer. **G)** Ostim großer Implantatabstand. **H)** Ostim kleiner Implantatabstand. (Skalierung = 2,2mm)

In den einzelnen Gruppen wurden jeweils gleich große Implantate von Ostim, Ostim S, Cerabone, Spongiosa und Silikon untersucht. In zwei Gruppen wurde Ostim zusätzlich in verschiedenen Anordnungen (Ostim größer und kleiner Implantatabstand) untersucht. Als Kontrollgruppe wurden leere Rückenhautkammern ohne Implantate eingesetzt. Nach erfolgter Implantation der verschiedenen Materialien wurde die Rückenhautkammerpräparation wieder mit einem neuen Deckglas verschlossen.

5.4. Intravitale Fluoreszenzmikroskopie

Die Vaskularisierung und Biokompatibilität der implantierten Materialien wurde mit Hilfe der intravitale Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Durch diese Technik konnten die Implantate repetitiv analysiert werden. Für die Untersuchungen wurden die Versuchstiere mittels intraperitonealer Injektion von Pentobarbital anästhesiert. Zur Darstellung der Blutgefäße innerhalb der Rückenhautkammer wurde den Versuchstieren der Fluoreszenzfarbstoff Fluorescein-Isothiocyanat (FITC)-Dextran (5%; 0,1ml, Molekulargewicht 150.000D; Fluka Biochemika, Ulm, Deutschland) injiziert, der wegen seines hohen Molekulargewichts intravasal verbleibt und so das Blutplasma anfärbt (*Abbildung 10A*). Zur *in vivo* Kontrastierung der Leukozyten diente der Fluoreszenzfarbstoff Rhodamin-6G (0,1%; 0,1ml; Molekulargewicht 479D; Sigma, St. Louis, USA) (*Abbildung 10B*). Beide Fluoreszenzfarbstoffe wurden vor der intravitale mikroskopischen Untersuchung im Verhältnis 1:1 gemischt und den Versuchstieren in den retrobulbären Venenplexus injiziert.

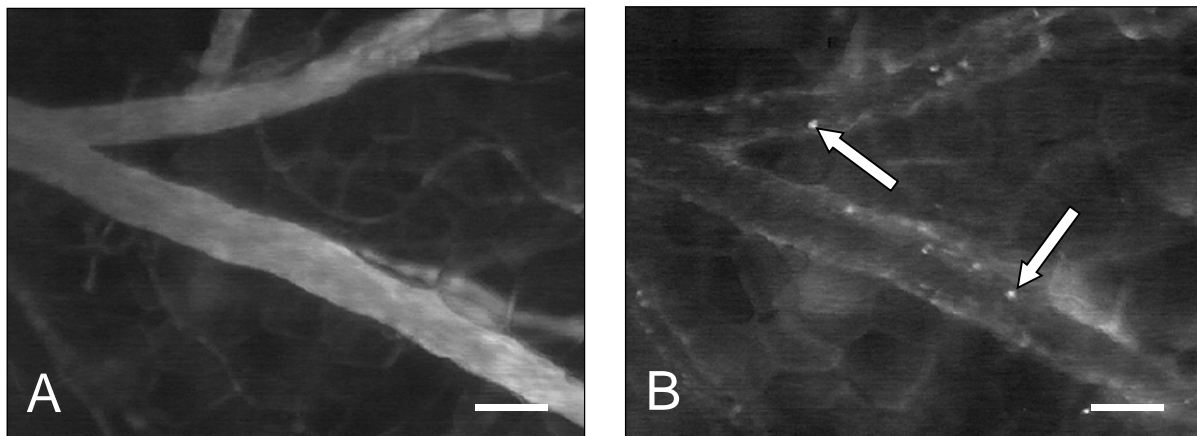


Abbildung 10: Intravitale fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen einer Sammelvenole in der Rückenhautkammer. **A)** Mit dem Fluoreszenzfarbstoff FITC-Dextran wird das Blutplasma der Gefäße angefärbt und in Blaulicht-Epi-Illumination dargestellt. **B)** Der Fluoreszenzfarbstoff Rhodamin-6G markiert selektiv die Leukozyten (\Rightarrow) als helle Punkte in Grünlicht-Epi-Illumination. (Skalierung = 30 μ m)

Die in einer Plexiglasröhre immobilisierten Versuchstiere wurden zur intravitalem Fluoreszenzmikroskopie auf einer Plexiglasbühne in horizontaler Lage auf dem Mikroskopiertisch platziert. Die Untersuchungen wurden mit einem modifizierten Leitz Orthoplan Mikroskop (Leitz GmbH, Wetzlar, Deutschland) mit Auflicht- und Durchlicht-Einrichtung durchgeführt. Das Mikroskop war mit einer 100W Quecksilber (HBO) Lichtquelle und einem Ploem-Pak-Illuminator System verbunden. Drei zwischengeschaltete Filterblöcke ermöglichten dabei eine Anregung mit Licht der Wellenlängen 330-390nm, 450-490nm und 530-560nm sowie eine Filterung des emittierten Lichts unterhalb 430nm, 515nm und 585nm. Die intravitalmikroskopischen Bilder konnten mit Hilfe einer CCD (charge coupled device) Videokamera (CF 8/1 FMC; Kappa Messtechnik GmbH, Gleichen-Rheinhausen, Deutschland) aufgenommen und mit einem Video Recorder System (Panasonic AG 7350; Matsushita Electric Ind. Co., Ltd., Japan) aufgezeichnet werden. Zwischengeschaltet war ein Videotimer (VTG 33; FOR-A Company Ltd., Japan) zur Dokumentation der Versuchstiernummer und des Untersuchungszeitpunkts (*Abbildung 11*). Für Übersichtsaufnahmen wurden ein 4x Objektiv (Numerische Aperatur (n.a.): 0.16; Olympus; Graz; Österreich) und ein 6,3x Objektiv (n.a.:0.16; Zeiss, Jena, Deutschland) mit langem Arbeitsabstand verwendet. Für Detailaufnahmen der neu gebildeten Gefäßnetzwerke innerhalb der Implantate dienten ein 10x (n.a.: 0.30; Zeiss)

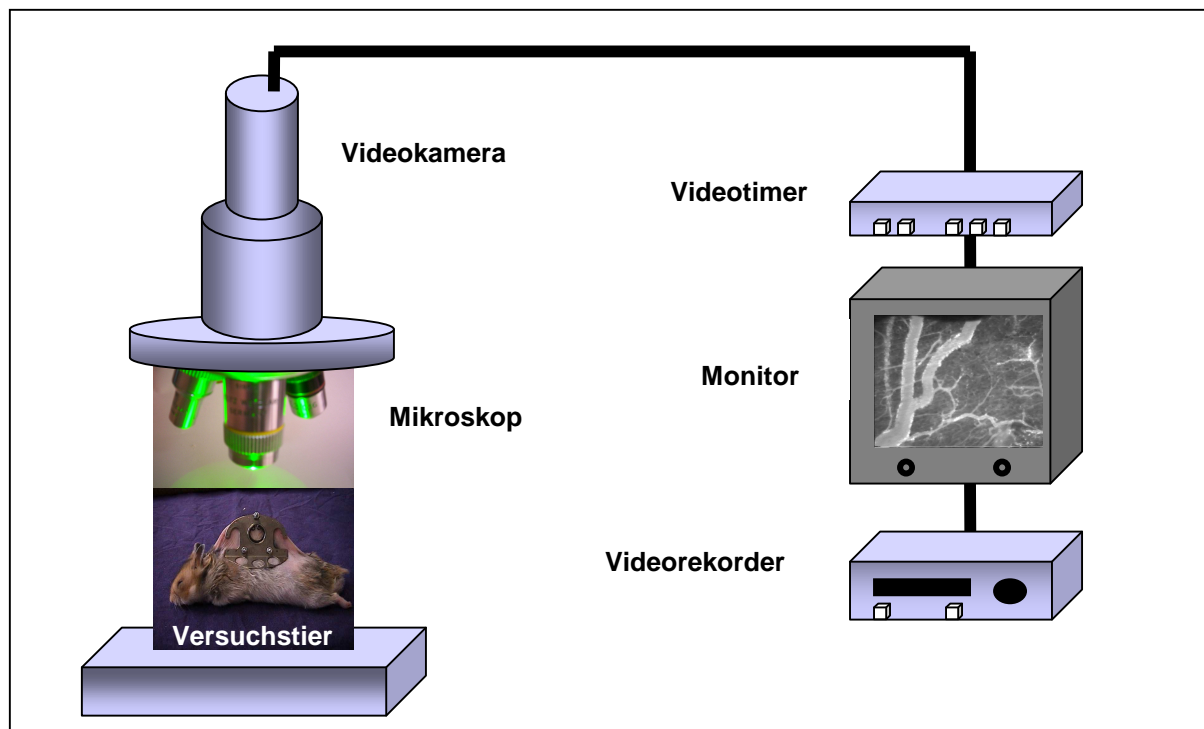


Abbildung 11: Schematische Darstellung des intravitalem Fluoreszenzmikroskopischen Arbeitsplatzes bestehend aus Mikroskop, Videokamera, Videotimer, Monitor und Videorekorder. Zur Mikroskopie wurde der Hamster immobilisiert und die Rückenhautkammer in horizontaler Lage auf dem Mikroskopiertisch fixiert.

bzw. ein 20x Objektiv (n.a.: 0.32; Zeiss) mit langem Arbeitsabstand. Mit diesen optischen Systemen konnte eine Vergrößerung von x86, x136, x216 bzw. x432 auf dem Videomonitor erzielt werden.

5.4.1. Mikrozirkulatorische Parameter

Die intravitalmikroskopischen Bilder wurden off-line, d.h. nach Beendigung der Mikroskopie mit dem computerassistierten Bildverarbeitungssystem CapImage; (Version 6.02; Dr. Zeintl Ingenieurbüro, Heidelberg, Deutschland) analysiert. Quantitativ beurteilt wurden Vaskularisierung und Biokompatibilität der Implantate innerhalb der Rückenhautkammer durch die Erfassung folgender Parameter: Im 10x Objektiv wurde der Anteil der Angiogenese-positiven Felder bestimmt und die Kapillardichte der neuen Gefäßnetzwerke gemessen. Hierfür wurden acht Regionen im Randbereich und vier Regionen im Zentrum der Implantate aufgenommen (*Abbildung 12B*). Die Leukozyten-Endothelzell-Interaktion, die Mikrohämodynamik und die makromolekulare Gefäßpermeabilität wurden mit dem 20x Objektiv in vier verschiedenen mikrovaskulären Feldern in den Randbereichen der Implantate analysiert (*Abbildung 12A*). Für diese Messungen wurde in jedem der vier Bereiche jeweils eine Sammelvenole mit einem Durchmesser von 30-40µm ausgewählt (*Abbildung 13*).

5.4.1.1. Fließverhalten der Leukozyten

Die Leukozyten wurden zur intravitalmikroskopischen Darstellung *in vivo* mit dem Fluoreszenzfarbstoff Rhodamin-6G angefärbt. Klassifiziert wurden sie dann entsprechend ihrer Interaktion mit den Endothelzellen der Gefäße in i) frei fließende Leukozyten, ii) rollende Leukozyten und iii) adhärente Leukozyten. Rollende Leukozyten wurden als Zellen definiert, die nur kurzzeitig Kontakt zum Gefäßendothel aufnehmen und dadurch eine Fließgeschwindigkeit besitzen, die etwa einem Fünftel der zentralen Stromgeschwindigkeit im Gefäß entspricht. Sie werden als Anzahl der Zellen angegeben, die pro Minute einen bestimmten Referenzpunkt innerhalb des Gefäßes passieren (Zellen/min). Adhärente Leukozyten wurden als Zellen definiert, die für die Beobachtungszeit von mindestens 20 Sekunden fest am Gefäßendothel anhaften. Die Anzahl der adhärennten Leukozyten wird als Zellen/mm² Endotheloberfläche angegeben.

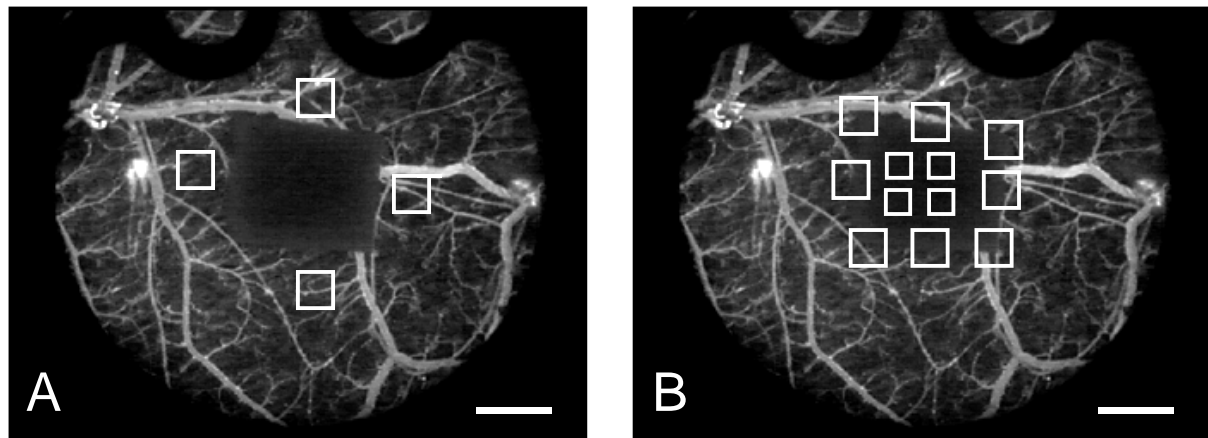


Abbildung 12: Implantiertes Ostim in der Rückenhautkammer. **A)** In vier repräsentativen Venolen im Randbereich des Implantats wurden die Parameter Durchmesser, Blutzellgeschwindigkeit, Fließverhalten der Leukozyten (rollende und adhärenente Leukozyten) und die Gefäßpermeabilität gemessen. **B)** In acht Untersuchungsfeldern im Randbereich und vier Untersuchungsfeldern im Zentrum der Implantate wurden die Parameter Funktionelle Kapillardichte und Angiogenese-positive Felder bestimmt. (Intravitale Fluoreszenzmikroskopie, Kontrastverstärkung mit FITC-Dextran in Blaulicht-Epi-Illumination, Skalierung = 2,2mm)

5.4.1.2. Gefäßpermeabilität

Die makromolekulare Gefäßpermeabilität dient als ein Parameter der Integrität des Gefäßendothels. Durch Gabe des hochmolekularen Fluoreszenzfarbstoffes FITC-Dextran können Veränderungen der Gefäßpermeabilität beurteilt werden. Normalerweise verbleibt dieser Farbstoff auf Grund seines hohen Molekulargewichts von 150.000D intravasal. Bei angiogenen und inflammatorischen Reaktionen erhöht sich allerdings die Gefäßpermeabilität, so dass FITC-Dextran durch die Gefäßwand in das umliegende Gewebe gelangen kann. Zur Quantifizierung dieses Prozesses wird die Densitometrie eingesetzt [Pries, 1988]. Bei der Densitometrie werden Grauwerte des paravasalen Gewebes (E_1) und des Blutplasmas (E_2) bestimmt und wie folgt zueinander in Verhältnis gesetzt: $E = E_1/E_2$. Unter physiologischen Bedingungen errechnet sich so für die Gefäßpermeabilität ein relativer Wert von ca. 0,2, dieser kann sich unter pathologischen Bedingungen erhöhen und sogar bis über 1 ansteigen.

5.4.1.3. Gefäßdurchmesser

Zur Computer-assistierten Quantifizierung der Durchmesser einzelner Venolen wurden zwei Randpunkte des jeweils zu messenden Gefäßes durch eine senkrecht zum Gefäßverlauf liegende Durchmesserstrecke am stehenden Videobild verbunden und deren Länge in μm bestimmt. Da durch die Verwendung des Plasma-Markers FITC-Dextran für die Fluoreszenzmikroskopie auch der Erythrozyten-freie Plasmasaum dargestellt werden konnte, waren die Gefäßgrenzen eindeutig bestimmbar.

5.4.1.4. Blutzellgeschwindigkeit

Die Blutzellgeschwindigkeit wurde in jenen Gefäßen gemessen, bei denen zuvor der Gefäßdurchmesser (siehe 5.3.1.3.) bestimmt wurde. Zur Bestimmung der Blutzellgeschwindigkeit wurde die Computer-assistierte Line-Shift-Diagramm-Methode angewendet [Klyscz et al., 1997]. Dabei wird am Computer eine Messlinie zentral in das Gefäßlumen parallel zur Flussrichtung des zu messenden Gefäßes eingezeichnet und das Videoband für ca. 10 Sekunden in Echtzeit abgespielt. Der Computer zeichnet nun ein Grauwertprofil auf, woraus ein Line-Shift-Diagramm erstellt wird, das aus abwechselnd hellen und dunklen Linien besteht. Aus der Steigung dieser Linien kann dann die Geschwindigkeit in $\mu\text{m/s}$ errechnet werden, mit der sich die Erythrozyten entlang der Messlinie bewegt haben.

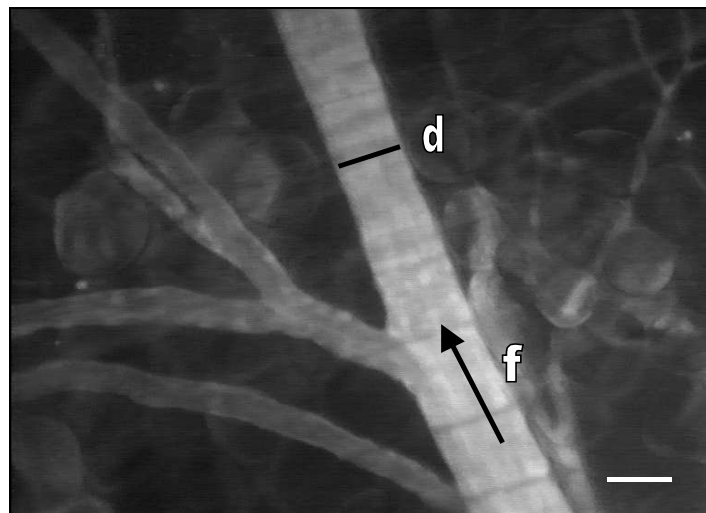


Abbildung 13: Intravitale fluoreszenzmikroskopische Darstellung einer Venole: Gezeigt ist, wie der Durchmesser (d) und die Fließgeschwindigkeit (f) gemessen wurden, woraus sich dann die Parameter „mikrovaskulärer Blutfluss“ und „Scherrate“ errechneten. (Intravitale Fluoreszenzmikroskopie, Kontrastverstärkung mit FITC-Dextran in Blaulicht-Epi-Illumination, Skalierung = $25\mu\text{m}$)

5.4.1.5. Mikrovaskulärer Blutfluss

Für die Berechnung des mikrovaskulären Blutflusses wird die Blutzellgeschwindigkeit mit dem Gefäßquerschnitt multipliziert. Allerdings muss dieser Wert korrigiert werden, da die Mikrogefäße eine geringere Fließgeschwindigkeit am Rand im Vergleich zum Zentralstrom aufweisen [Baker und Wayland, 1974]. Der hierzu eingesetzte Korrekturfaktor wird nach den Erstbeschreibern [Baker und Wayland, 1974] als *Baker-Wayland Proportionalitätsfaktor* bezeichnet. Er gleicht die Diskrepanz der gemessenen Fließgeschwindigkeit im Zentralstrom und der durchschnittlichen Gesamtgeschwindigkeit mit der folgenden Formel aus:

Mikrovaskulärer Blutfluss = $\pi \times (d/2)^2 \times v/K$

Die Variable **d** steht für den Durchmesser des untersuchten Gefäßes, **v** ist die gemessene Blutzellgeschwindigkeit im Zentralstrom und **K** ist der Baker-Wayland Proportionalitätsfaktor. Da die untersuchten Mikrogefäße in der vorliegenden Studie einen Durchmesser von ca. 30-40µm aufwiesen, wurde K als 1,6 eingesetzt.

5.4.1.6. Scherrate

Die Scherrate gibt an, wie schnell die Blutzellgeschwindigkeit an der Gefäßwand im Verhältnis zur Blutzellgeschwindigkeit in der Mitte des Gefäßes ist. Da in realen Flüssigkeiten vor allem am Gefäßendothel Reibungskräfte vorhanden sind, ergibt sich eine unterschiedliche Fließgeschwindigkeit an unterschiedlichen Orten. Die Scherrate errechnet sich nach der Newton'schen Gleichung aus der Blutzellgeschwindigkeit gemessen im Zentrum des Gefäßes und dem Gefäßdurchmesser:

$$y = 8 * v/d$$

y = Scherrate; v = Blutzellgeschwindigkeit; d = Gefäßdurchmesser

5.4.1.7. Angiogenese-positive Felder

Die Angiogenese wurde bei 216x Vergrößerung in acht Feldern im Randbereich und vier Feldern im Zentrum der Implantate untersucht. Die Untersuchungsfelder wurden als Angiogenese-positiv definiert, wenn sie Zeichen der Entwicklung neuer Blutgefäße aufwiesen. Hierzu zählten Kapillarsprossen und neu gebildete Mikrogefäße, die in das Implantat einwuchsen. Bereits dilatierte Kapillaren wurden noch nicht als Angiogenese gewertet.

5.4.1.8. Funktionelle Kapillardichte

Die funktionelle Kapillardichte gibt die Länge der neugebildeten Kapillaren in Bezug zur analysierten Fläche wieder (cm/cm²). Sie wurde für jedes Implantat in acht Untersuchungsfeldern im Randbereich und vier Untersuchungsfeldern im Zentrum gemessen (*Abbildung 12B*).

5.5. Konventionelle Histologie und Immunhistochemie

Für lichtmikroskopische Untersuchungen wurden am Ende der jeweiligen Versuchsreihen die Rückenhautkammerpräparationen mit den Implantaten in 4%iger Formaldehydlösung fixiert. Nach 24 Stunden erfolgte die Einbettung in Paraffin und die Anfertigung von Serienschnitten mit einer Schichtdicke von 4µm. Entsprechend dem histologischen Standardprotokoll wurde jeder sechste Serienschnitt mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt. Des Weiteren wurden bei einzelnen Schnitten eine Chlor-Acetat-Esterase (CAE)-Färbung zur dunkelroten Markierung von Leukozyten durchgeführt.

Zusätzlich wurden immunhistochemische Analysen einzelner Schnitte durchgeführt, welche die Färbungen PCNA und Caspase-3 umfassten. Zur PCNA (proliferating cell nuclear antigen)-Färbung werden proliferierende Zellen der Präparate durch von der Maus gewonnene anti-PCNA Antikörper als Primär-Antikörper markiert (1:200, Daco Cytomation). Als Sekundärantikörper dienten Ziege-anti-Maus-Antikörper (1:200, Amersham Biosciences). 3,3-Diaminobenzidine wurde als Chromogen verwendet. Bei der Caspase-3-Färbung dienten Kaninchen-anti-cleaved-Caspase-3-Antikörper als Primärantikörper und Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper als Sekundärantikörper. Nach Gegenfärbung mit Hämalaun nach Mayer konnten die Schnitte lichtmikroskopisch (BX60, Olympus, Hamburg, Deutschland) beurteilt werden.

5.6. Experimentelles Protokoll

5.6.1. Versuchsablauf

Für die Untersuchungen wurden zunächst die Rückenhautkammern bei Syrischen Goldhamstern präpariert. Die Tiere konnten sich dann für 48 Stunden von dem Eingriff erholen. Anschließend erfolgte die Implantation der verschiedenen Materialien, wobei darauf geachtet wurde, eine Kontamination oder mechanische Irritation der Kammerpräparation zu vermeiden. Das makroskopische Erscheinungsbild der Kammerpräparation und der implantierten Materialien wurde täglich qualitativ beurteilt und dokumentiert. Die intravitale Fluoreszenzmikroskopie erfolgte vor Implantation der Materialien in die Rückenhautkammer (Baseline = BL), 20 Minuten nach Implantation (Tag 0) sowie an den Tagen 3, 6, 10 und 14. Durch Aufzeichnung der intravitalmikroskopischen Bilder konnten folgende Parameter mit Hilfe des Computer-assistierten Analysesystems CapImage bestimmt werden:

- 1.) *Zahl der rollenden und der adhärenenten Leukozyten (siehe 5.4.1.1.)*
- 2.) *Gefäßpermeabilität (siehe 5.4.1.2.)*
- 3.) *Gefäßdurchmesser (siehe 5.4.1.3.)*
- 4.) *Blutzellgeschwindigkeit (siehe 5.4.1.4.)*
- 5.) *Mikrovaskulärer Blutfluss (siehe 5.4.1.5.)*
- 6.) *Scherrate (siehe 5.4.1.6.)*
- 7.) *Angiogenese-positive Felder im Randbereich und im Zentrum der Implantate (siehe 5.4.1.7.)*
- 8.) *Funktionelle Kapillardichte im Randbereich und im Zentrum der Implantate (siehe 5.4.1.8.)*

Am Ende der *in vivo* Experimente (Tag 14) wurden die Versuchstiere durch eine Überdosis des Narkotikums eingeschläfert und die Rückenhautkammerpräparationen histologisch und immunhistochemisch analysiert.

5.6.2. Experimentelle Gruppen

Insgesamt wurden 8 experimentelle Gruppen analysiert:

- 1.) Gruppe „*Ostim*“: In 8 Empfängertiere wurde der Knochenersatzstoff *Ostim* implantiert. *Ostim* ist eine vollsynthetische nanokristalline Hydroxylapatit-Paste.
- 2.) Gruppe „*Ostim S*“: In 8 Empfängertiere wurde der Knochenersatzstoff *Ostim S* implantiert. *Ostim S* unterscheidet sich von *Ostim* durch das Herstellungsverfahren.
- 3.) Gruppe „*Cerabone*“: In 8 Empfängertiere wurde der Knochenersatzstoff *Cerabone* implantiert. *Cerabone* ist eine häufig eingesetzte Hydroxylapatit-Keramik.
- 4.) Gruppe „*Spongiosa*“: In 8 Empfängertiere wurde frisch isolierte *Spongiosa* transplantiert. *Spongiosa* gilt zur Zeit als der Goldstandard bei der Auffüllung von Knochendefekten.
- 5.) Gruppe „*Silikon*“: In 4 Empfängertiere wurde *Silikon* implantiert. *Silikon* gilt als bioinertes Material.
- 6.) Gruppe „*Leere Kammer*“: Bei 4 Versuchstieren wurde eine leere Rückenhautkammer ohne Implantat analysiert.
- 7.) Gruppe „*Ostim kleiner Implantatabstand*“: In 4 Empfängertiere wurde der Knochenersatzstoff *Ostim* implantiert. Es wurden vier kleine Stücke in einem Abstand von ca. 0,2mm und in quadratischer Anordnung in die Rückenhautkammer implantiert.

- 8.) Gruppe „*Ostim großer Implantatabstand*“: In 4 Empfängertiere wurde der Knochenersatzstoff Ostim implantiert. Es wurden vier kleine Stücke in einem Abstand von ca. 1,2mm und in quadratischer Anordnung in die Rückenhautkammer implantiert.

5.7. Statistik

Sämtliche Werte werden als Mittelwert mit Standardfehler des Mittelwerts ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) angegeben. Dabei rekrutieren sich die Mittelwerte der einzelnen mikrozirkulatorischen Parameter an den jeweiligen Untersuchungstagen aus den Einzelwerten, welche in den jeweiligen Untersuchungsfeldern gemessen wurden.

Bei Normalverteilung der Werte erfolgte der Vergleich zwischen den Gruppen an den einzelnen Untersuchungstagen mittels „one way analysis of variance“ (ANOVA) gefolgt von dem entsprechenden post hoc Student-Newman-Keuls Test. Signifikante Unterschiede der Werte innerhalb einer Gruppe wurden mit Hilfe des gepaarten Student's t-Test und Korrektur des alpha-Fehlers nach Bonferroni für wiederholte Messungen geprüft.

Falls eine Normalverteilung der Werte ausgeschlossen werden konnte, erfolgte der Gruppenvergleich mit der Kruskal Wallis Varianzanalyse und der paarweise Vergleich mit dem Student-Newman-Keuls Test. Entsprechend wurden signifikante Unterschiede innerhalb einer Gruppe durch die Friedman Rangvarianz Analyse, gefolgt vom Wilcoxon Paar Test mit Korrektur des alpha-Fehlers für statistische Berechnungen bei Messwiederholungen bestimmt.

Sämtliche statistischen Tests erfolgten unter Verwendung des Software Pakets SigmaStat (Jandel Corporation, San Rafael, CA, USA). Bei der Prüfung wurden Unterschiede mit $P < 0,05$ als signifikant angesehen.

6. ERGEBNISSE

6.1. Mikrozirkulation der Rückenhautkammer

Die Gefäße in der Rückenhautkammer konnten durch intravenöse Gabe des Plasmamarkers FITC-Dextran (5%) an den einzelnen Untersuchungstagen kontrastreich dargestellt werden. Durch sein hohes Molekulargewicht (MG 150.000D) weist dieser Fluoreszenzfarbstoff unter physiologischen Bedingungen nur eine geringe Extravasation auf, so dass die einzelnen Mikrogefäße gut vom umliegenden Gewebe abzugrenzen waren.

Das Gefäßsystem des Hautmuskels in der Rückenhautkammer besteht aus terminalen Arteriolen (*Abbildung 14A*), die sich in nutritive Kapillaren aufzweigen, sowie aus postkapillaren Venolen, die ihrerseits von Sammelvenolen drainiert werden. Die Arteriolen verzwei-

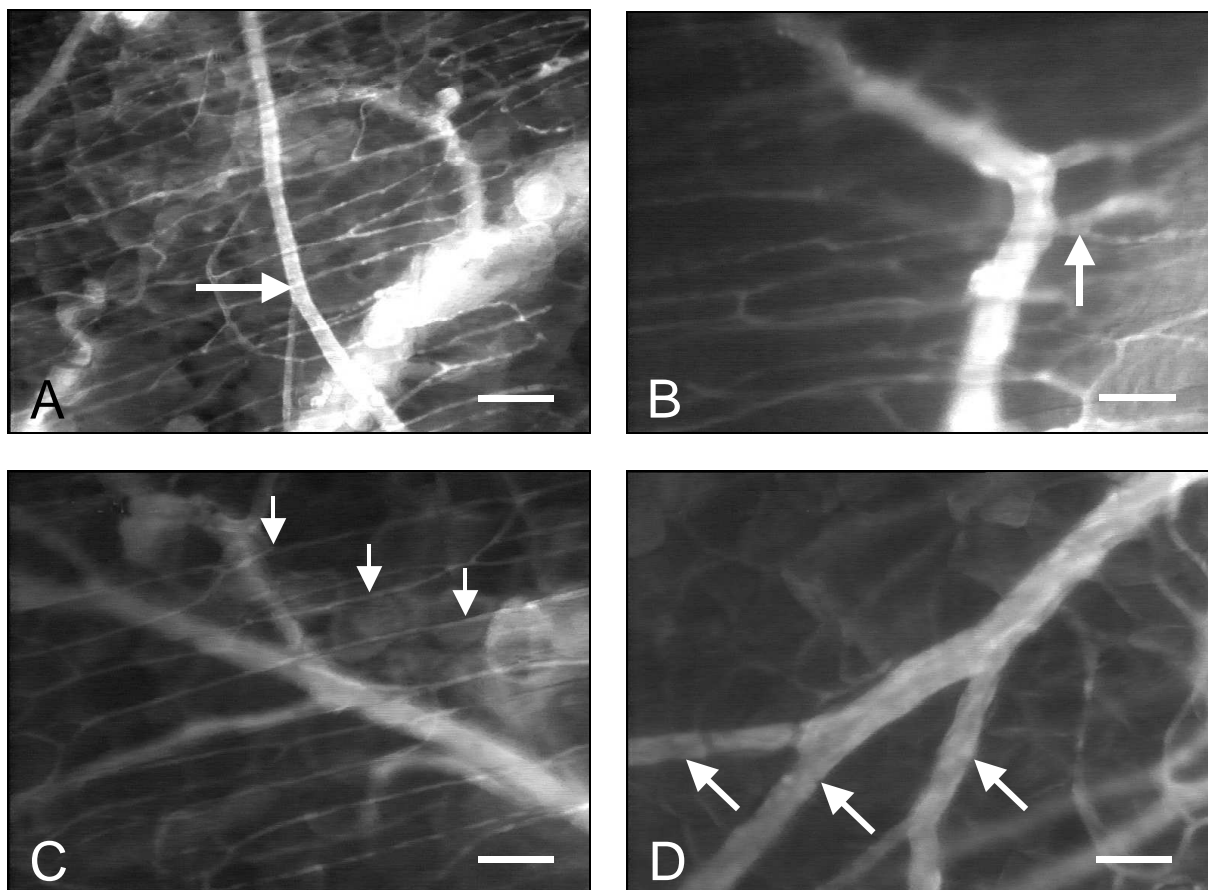


Abbildung 14: Intravitale fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der verschiedenen Gefäßsegmente in der Rückenhautkammer. **A)** Aufzweigung einer terminalen Arteriole (Pfeil). **B)** Arteriolen, die das nutritive Kapillarbett versorgen (Pfeil). **C)** Die Kapillaren (Pfeile) sind an ihrem streng parallelen Verlauf zu erkennen. Sie stehen durch Querverbindungen untereinander in Kontakt. Ihr Abstand beträgt 40-60 μ m. Im Hintergrund erkennt man eine postkapillare Venole. **D)** Mehrere postkapillare Venolen (Pfeile) münden in eine große Sammelvenole. (Intravitale Fluoreszenzmikroskopie, Kontrastverstärkung mit FITC-Dextran in Blaulicht-Epi-Illumination, Skalierung: A = 100 μ m; B, D = 70 μ m; C = 50 μ m)

gen sich innerhalb Rückenhautkammer ein- bis zweimal in einem Winkel von ca. 45°. Sie sind bei der intravitalem Fluoreszenzmikroskopie an ihrer glatten Wandstruktur, ihrem geraden Verlauf und der hohen Blutzellgeschwindigkeit gut zu identifizieren. Durch sie wird das nutritive Gefäßbett der Kapillaren mit oxygeniertem Blut und Nährstoffen versorgt (*Abbildung 14B*). Die Kapillaren haben eine typisch parallele Anordnung mit einem Abstand von ca. 40-60µm und stehen stellenweise durch Querverbindungen miteinander in Kontakt (*Abbildung 14C*). Durch diese Verbindungen können Umgehungskreisläufe gebildet werden, falls einige Kapillaren z.B. durch Kompression verschlossen werden. Nach dem Gasaustausch mit den Zellen wird das sauerstoffarme Blut über postkapillare Venolen ($d = 20-40\mu\text{m}$) und Sammelvenolen ($d = 40-120\mu\text{m}$) drainiert (*Abbildung 14D*). Die Venolen zeichnen sich im Vergleich zu den Arteriolen durch eine unregelmäßigere Wandstruktur, einen kurvigen Verlauf und eine langsamere Blutzellgeschwindigkeit aus.

6.2. Implantation und Revaskularisierung der Knochenersatzstoffe

Die Revaskularisierung der implantierten Knochenersatzstoffe wurde mit Hilfe der intravitalem Fluoreszenzmikroskopie über einen Zeitraum von 14 Tagen nach Implantation analysiert. Die Entwicklung neuer Blutgefäße vollzog sich dabei in charakteristischen Entwicklungsschritten. Während direkt nach der Implantation der Knochenersatzstoffe noch keine Veränderungen in der Mikrozirkulation zu sehen waren, konnten bereits am dritten Tag nach Implantation der verschiedenen Materialien erste Zeichen der Angiogenese nachgewiesen werden (*Abbildung 15A*). Es zeigten sich hierbei typische Merkmale der beginnenden Angiogenese wie Vasodilatation von Kapillaren und zahlreiche Gefäßsprossen, die vor allem aus den Hautmuskelkapillaren im Randbereich der Implantate auswuchsen (*Abbildung 15B*). Die Implantate waren während des gesamten Untersuchungszeitraums gut von dem darunter liegenden Hautmuskelgewebe abzugrenzen. Von den Gefäßsprossen ausgehend bildete sich unter Zunahme der funktionellen Kapillardichte bis zum vierzehnten Untersuchungstag schließlich ein kapillares Netzwerk aus. Dieses wurde durch viele kleine Anastomosen mit den Arteriolen und Kapillaren des Empfängergewebes mit oxygeniertem Blut versorgt. Der venöse Abfluss erfolgte durch Venolen, die sich ebenfalls vor allem aus Hautmuskelkapillaren entwickelt hatten.

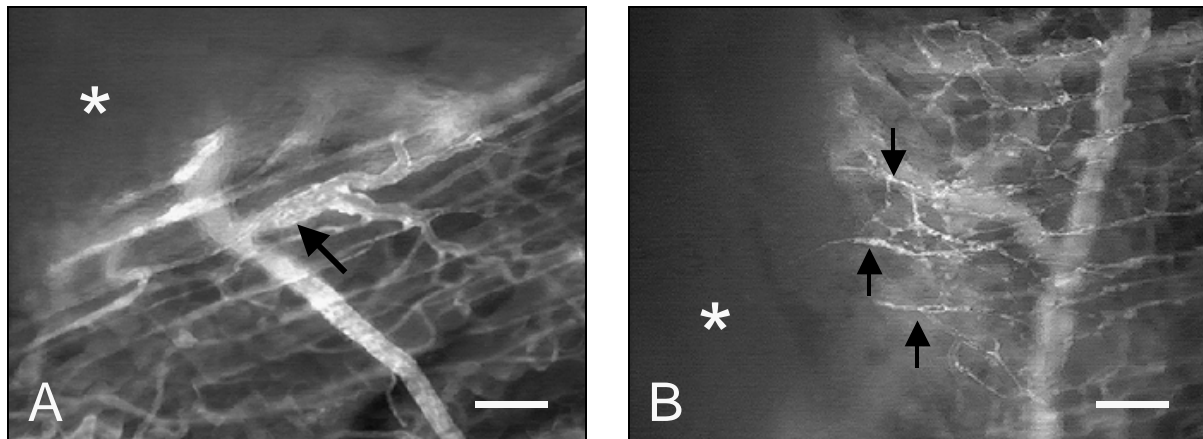


Abbildung 15: Intravitale fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen mit typischen Merkmalen beginnender Angiogenese am dritten Tag nach der Implantation von Ostim in die Rückenhautkammer. **A)** Massiv dilatierte Kapillaren (Pfeil) im Randbereich des Implantats (Stern). **B)** Entwicklung erster Gefäßwandsprossen (Pfeile). Die Gefäße sind noch schlecht perfundiert. Sie wachsen in Richtung des Implantats (Stern). (Intravitale Fluoreszenzmikroskopie, Kontrastverstärkung mit FITC-Dextran in Blaulicht-Epi-Illumination, Skalierung = 100 μ m)

6.3. Reaktion des Empfängergewebes

Die Reaktion des Empfängergewebes auf die implantierten Knochenersatzstoffe konnte anhand verschiedener Parameter analysiert und quantifiziert werden. Ausgewertet wurden Entzündungsparameter (Leukozyten-Endothelzell-Interaktion und Gefäßpermeabilität), mikrohämodynamische Parameter (Gefäßdurchmesser, Blutzellgeschwindigkeit, mikrovaskulärer Blutfluss und Scherrate) sowie Parameter zur Quantifizierung der Angiogenese (Angiogenese-positive Felder und funktionelle Kapillardichte).

6.3.1. Entzündung

Leukozyten werden entsprechend ihrer Interaktion mit dem Gefäßendothel eingeteilt in frei fließende, rollende und adhärenente Zellen. Bei vielen physiologischen aber auch pathologischen Vorgängen, wie z.B. einer ablaufenden Entzündungsreaktion exprimiert das Gefäßendothel vermehrt Rezeptoren, welche die Leukozyten dazu befähigen, an der Gefäßwand anzuhafte und in das umliegende Gewebe einzuwandern. Damit ist die Anzahl der aktivierten Leukozyten (rollende und adhärenente) in einem bestimmten Gefäßabschnitt ein guter Indikator für eine ablaufende Entzündungsreaktion. In der vorliegenden Studie würde ein signifikanter Anstieg der Zahl aktivierter Leukozyten auf eine Unverträglichkeitsreaktion

des Gewebes gegenüber des implantierten Materials hindeuten. In dieser Studie zeigte sich jedoch eine gute Biokompatibilität aller implantierten Knochenersatzstoffe, was sich in einer unveränderten Zahl rollender und adhärenter Leukozyten in den Venolen des Empfängergewebes nach Implantation der Materialien widerspiegelte (*Abbildung 16*).

6.3.1.1. Leukozyten-Endothelzell-Interaktion

Rollende Leukozyten nehmen nur kurzzeitig Kontakt zum Gefäßendothel auf. Die Anzahl der rollenden Leukozyten lag vor der Implantation der verschiedenen Materialien (Baseline) zwischen 20-30 Zellen/min ohne signifikante Unterschiede in den einzelnen Gruppen. Im weiteren Zeitverlauf änderte sich die Zahl der rollenden Leukozyten nicht mehr (*Abbildung 17*).

Adhärenente Leukozyten sind Zellen, die sich definitionsgemäß über einen Zeitraum von 20 Sekunden nicht im Gefäß weiterbewegen, also fest am Gefäßendothel anhaften. In dieser Studie lag die Zahl der adhärenenten Leukozyten unter Baseline-Bedingungen zwischen 90-150 Zellen/mm² ohne signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen (*Abbildung 18*). Am Tag der Implantation (Tag 0) war in einigen Gruppen ein leichter Anstieg der adhärenenten Leukozyten zu beobachten, was auf die Implantation der Materialien in die Rückenhautkammer zurückgeführt werden kann. Im weiteren Zeitverlauf war die Zahl der adhärenenten Leukozyten in allen Gruppen im physiologischen Bereich.

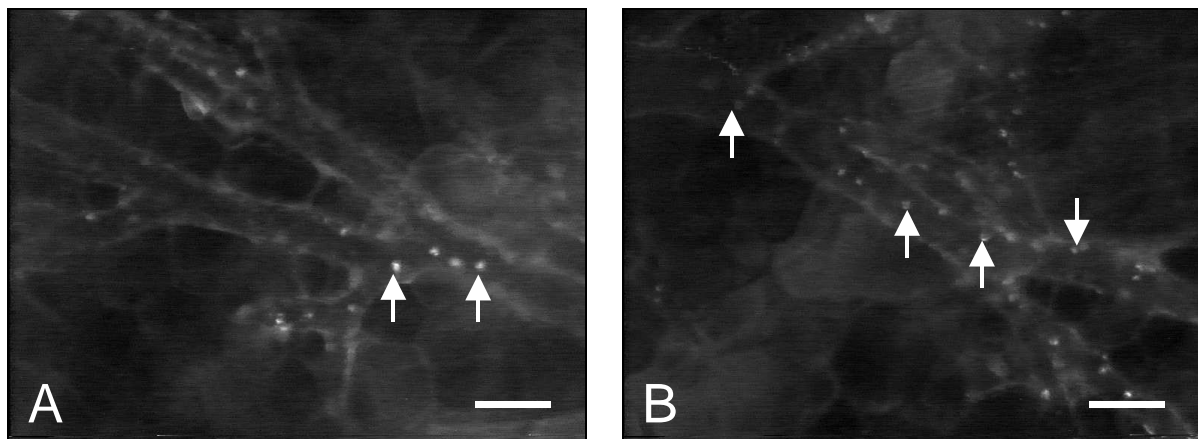


Abbildung 16: Intravitale fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von zwei Venolen mit Darstellung von Rhodamin-6G gefärbten Leukozyten. **A)** Gefäßabschnitt mit wenigen rollenden bzw. adhärenenten Leukozyten (Pfeile). **B)** Gefäßabschnitt mit vielen rollenden bzw. adhärenenten Leukozyten (Pfeile). (Intravitale Fluoreszenzmikroskopie, Leukozytenfärbung mit Rhodamin-6G in Grünlicht-Epi-Illumination, Skalierung = 50µm)

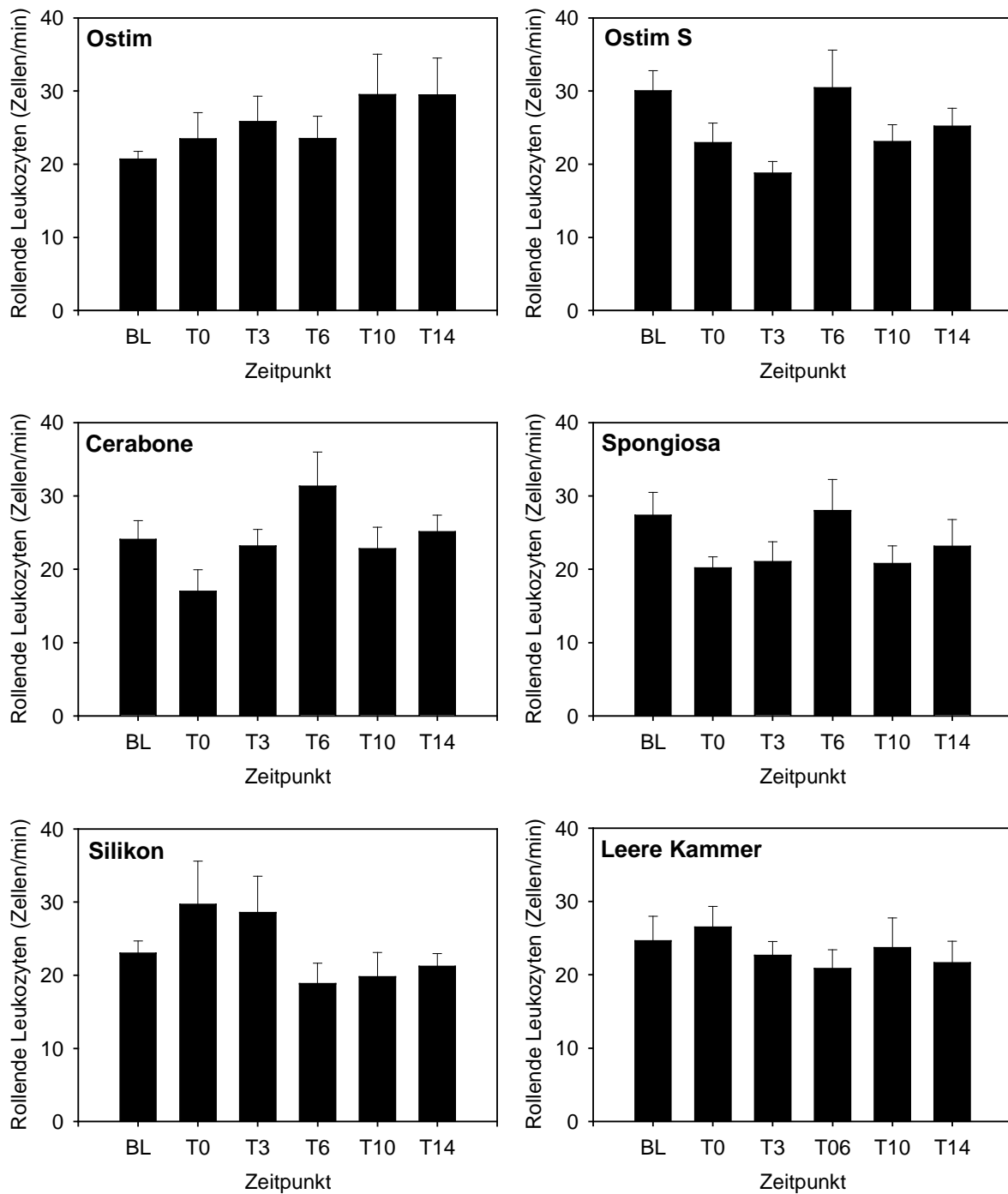


Abbildung 17: Zahl der rollenden Leukozyten (Zellen/min) in repräsentativen Venolen im Randbereich von Ostim, Ostim S, Cerabone, Spongiosa und Silikon vor der Implantation (BL), direkt nach der Implantation (T0), sowie an den Tagen 3, 6, 10 und 14. Leere Kammern ohne Implantate dienten als Kontrolle. Mittelwerte \pm SEM.

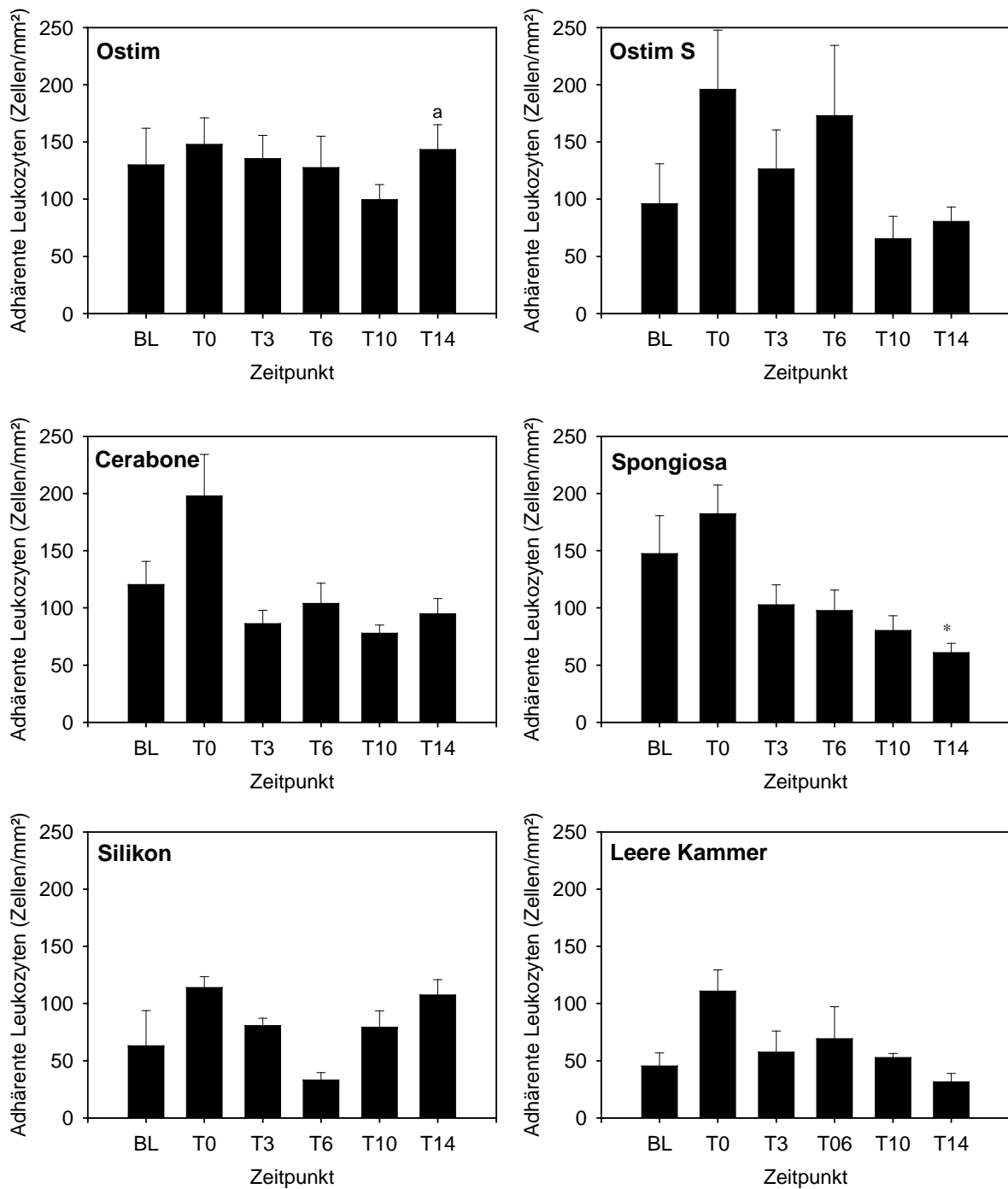


Abbildung 18: Zahl der adhärennten Leukozyten (Zellen/mm²) in repräsentativen Venolen im Randbereich von Ostim, Ostim S, Cerabone, Spongiosa und Silikon vor der Implantation (BL), direkt nach der Implantation (T0), sowie an den Tagen 3, 6, 10 und 14. Leere Kammern ohne Implantate dienten als Kontrolle. Mittelwerte ± SEM. ^ap<0,05 vs. Ostim S, Spongiosa, Leere Kammer; *p<0,05 vs. BL.

6.3.1.2. Makromolekulare Gefäßpermeabilität

Die makromolekulare Gefäßpermeabilität konnte mit Hilfe des hochmolekularen Plasmamarkers FITC-Dextran bestimmt werden (*Abbildung 19*). Zu einer erhöhten Extravasation dieses Fluorochroms kommt es z.B. bei einer stattfindenden Entzündungsreaktion aber auch im Rahmen der Angiogenese, da hierbei die Gefäßintegrität gestört ist. Nach der Implantation der Knochenersatzstoffe kam es in deren Randbereich zu einem kontinuierlichen Anstieg der Gefäßpermeabilität innerhalb aller Gruppen. Ein signifikanter Unterschied bestand hier zwischen Kontrolltieren mit leeren Kammern im Vergleich zur Spongiosa-Gruppe, die eine signifikant erhöhte Leakage an Tag 14 aufwies (*Abbildung 20*).

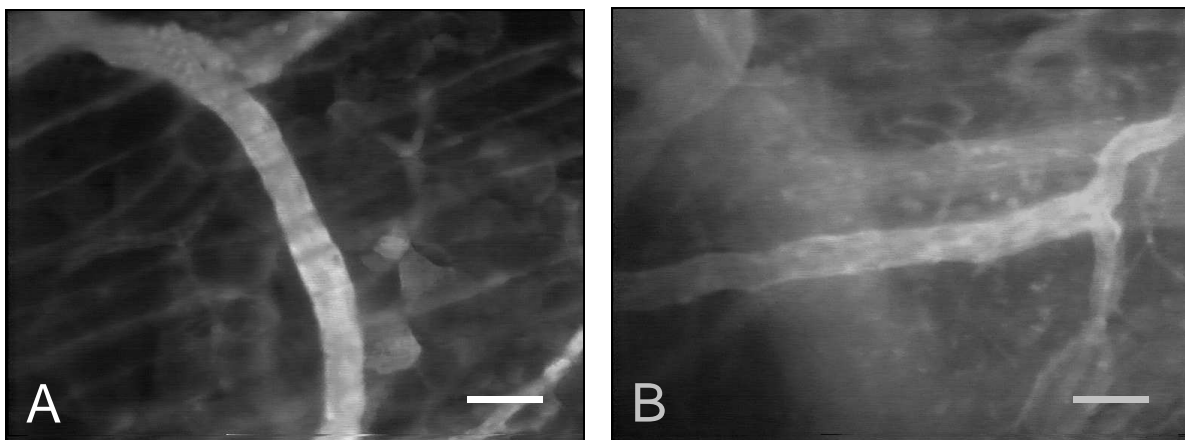


Abbildung 19: Intravitale fluoreszenzmikroskopische Aufnahme zweier repräsentativer Venolen im Randbereich von Ostim. **A)** Geringe Leakage von FITC-Dextran in der Rückenhautkammer vor Implantation von Ostim. Der größte Teil des Kontrastmittels verbleibt intravasal. **B)** Vermehrte Leakage in der Rückenhautkammer an Tag 14 nach Implantation von Ostim. Das Kontrastmittel kann durch Gefäßwandlücken in das umliegende Gewebe gelangen. (Intravitale Fluoreszenzmikroskopie, Kontrastverstärkung mit FITC-Dextran in Blaulicht-Epi-Illumination, Skalierung = 50µm)

6.3.2. Mikrohämodynamik

6.3.2.1. Gefäßdurchmesser

Der durchschnittliche Gefäßdurchmesser der untersuchten Venolen im Randbereich der Implantate lag im Verlauf der Beobachtungen zwischen 30 und 40 µm (*Abbildung 21*). Während des gesamten Untersuchungszeitraums kam es zu keinen signifikanten Unterschieden zwischen den einzelnen Gruppen.

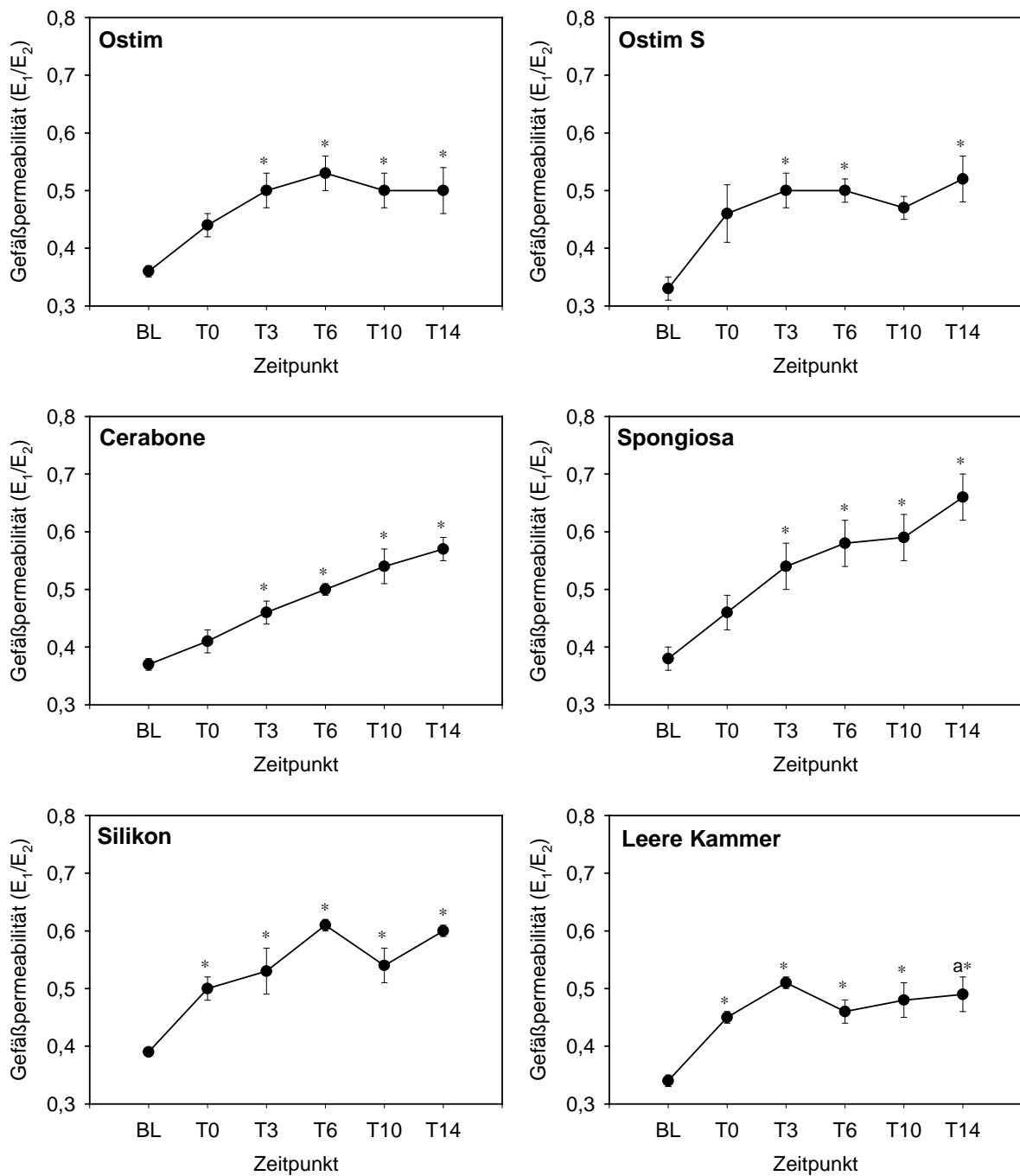


Abbildung 20: Gefäßpermeabilität (E_1/E_2) in repräsentativen Venolen im Randbereich von Ostim, Ostim S, Cerabone, Spongiosa und Silikon vor der Implantation (BL), direkt nach der Implantation (T0), sowie an den Tagen 3, 6, 10 und 14. Leere Kammern ohne Implantate dienen als Kontrolle. Mittelwerte \pm SEM. ^a $p < 0,05$ vs. Spongiosa; * $p < 0,05$ vs. BL.

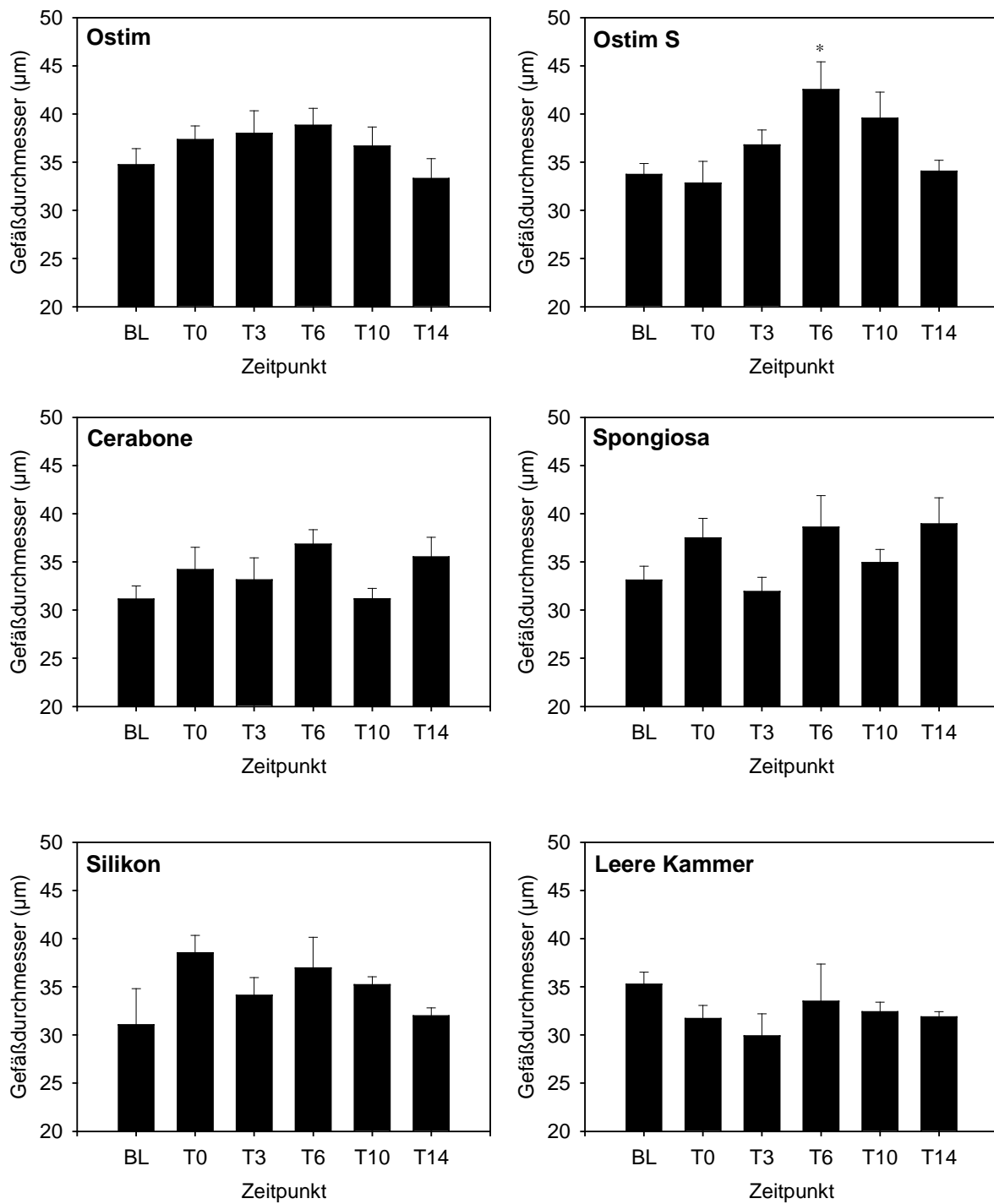


Abbildung 21: Gefäßdurchmesser (µm) in repräsentativen Venolen im Randbereich von Ostim, Ostim S, Cerabone, Spongiosa und Silikon vor der Implantation (BL), direkt nach der Implantation (T0), sowie an den Tagen 3, 6, 10 und 14. Leere Kammern ohne Implantate dienten als Kontrolle. Mittelwerte ± SEM. * $p < 0,05$ vs. BL.

6.3.2.2. Blutzellgeschwindigkeit

Die durchschnittliche Blutzellgeschwindigkeit der untersuchten Venolen im Randbereich der Implantate lag im Verlauf der Beobachtungen zwischen 200 und 450 $\mu\text{m/s}$ (Abbildung 22). Während des gesamten Untersuchungszeitraums kam es zu keinen signifikanten Unterschieden zwischen den einzelnen Gruppen.

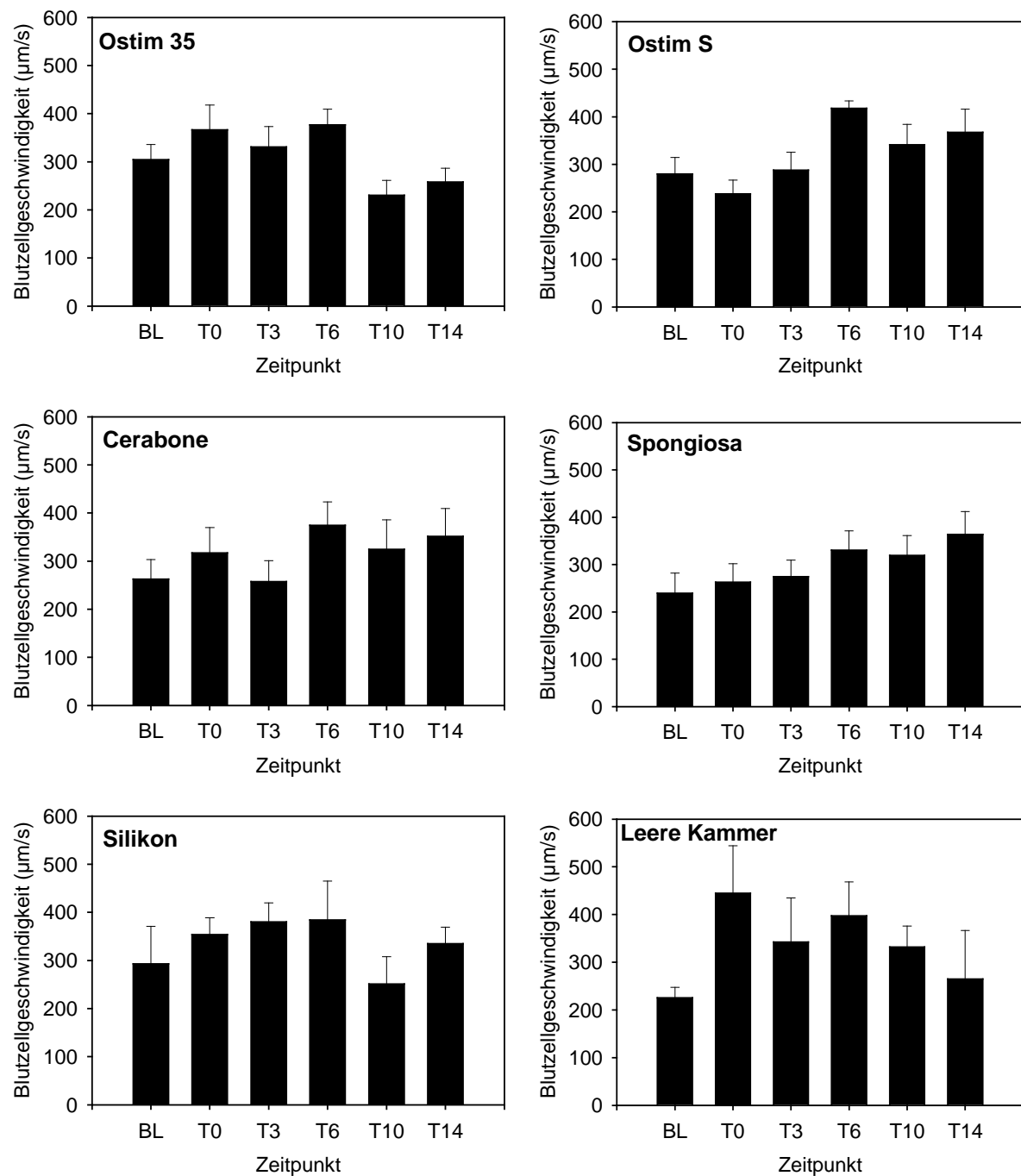


Abbildung 22: Blutzellgeschwindigkeit ($\mu\text{m/s}$) in repräsentativen Venolen im Randbereich von Ostim, Ostim S, Cerabone, Spongiosa und Silikon vor der Implantation (BL), direkt nach der Implantation (T0), sowie an den Tagen 3, 6, 10 und 14. Leere Kammern ohne Implantate dienten als Kontrolle. Mittelwerte \pm SEM.

6.3.2.3. Scherrate

Die durchschnittliche Scherrate lag im Verlauf der Beobachtungen zwischen 50 und 110 s⁻¹ (Abbildung 23). Während des gesamten Untersuchungszeitraums kam es zu keinen signifikanten Unterschieden zwischen den einzelnen Gruppen.

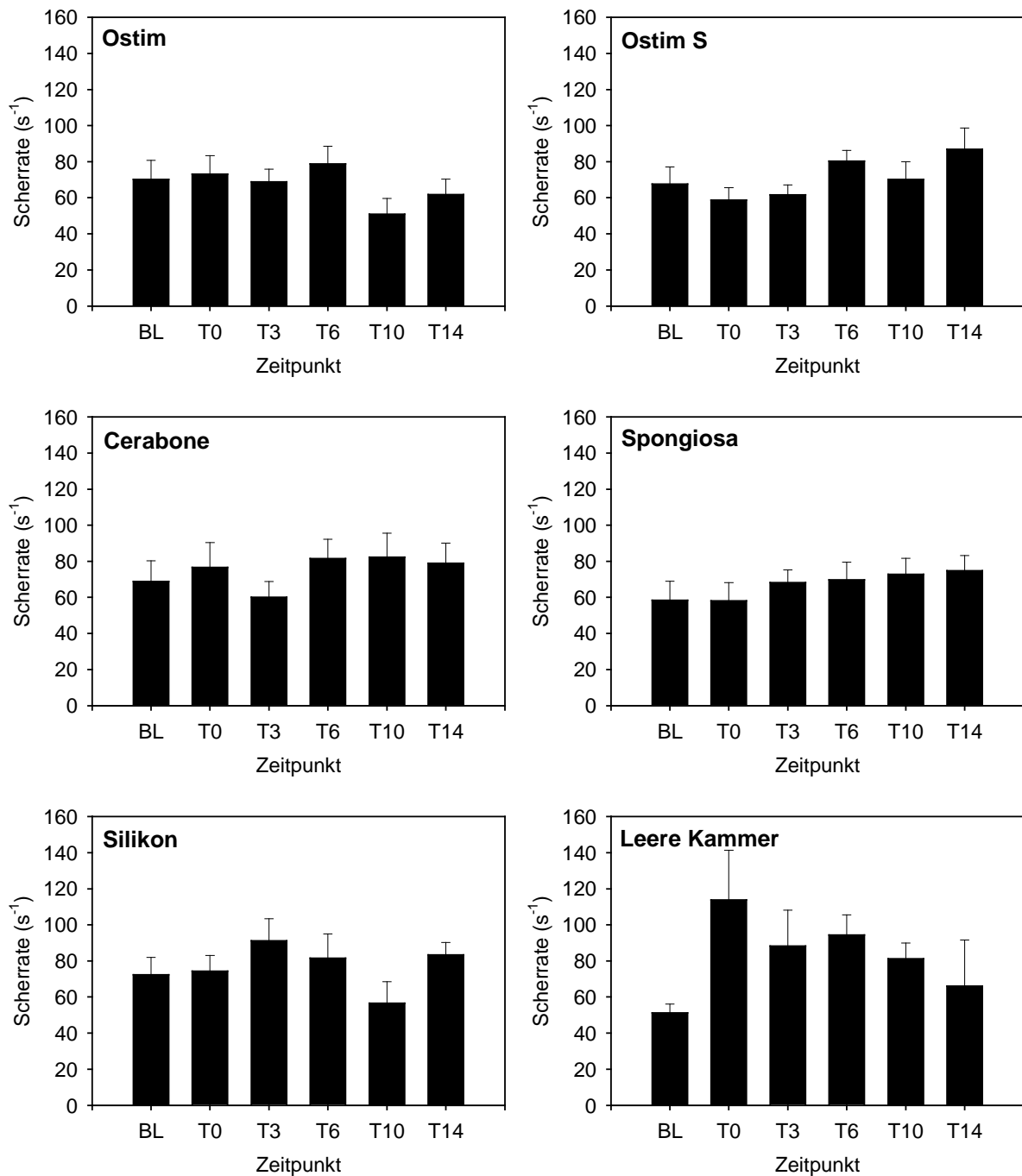


Abbildung 23: Scherrate (s⁻¹) in repräsentativen Venolen im Randbereich von Ostim, Ostim S, Cerabone, Spongiosa und Silikon vor der Implantation (BL), direkt nach der Implantation (T0), sowie an den Tagen 3, 6, 10 und 14. Leere Kammern ohne Implantate dienten als Kontrolle. Mittelwerte ± SEM.

6.3.2.4. Mikrovaskulärer Blutfluss

Der durchschnittliche mikrovaskuläre Blutfluss lag im Verlauf der Beobachtungen zwischen 100 und 300 pl/s (Abbildung 24). Während des gesamten Untersuchungszeitraums kam es zu keinen signifikanten Unterschieden zwischen den einzelnen Gruppen.

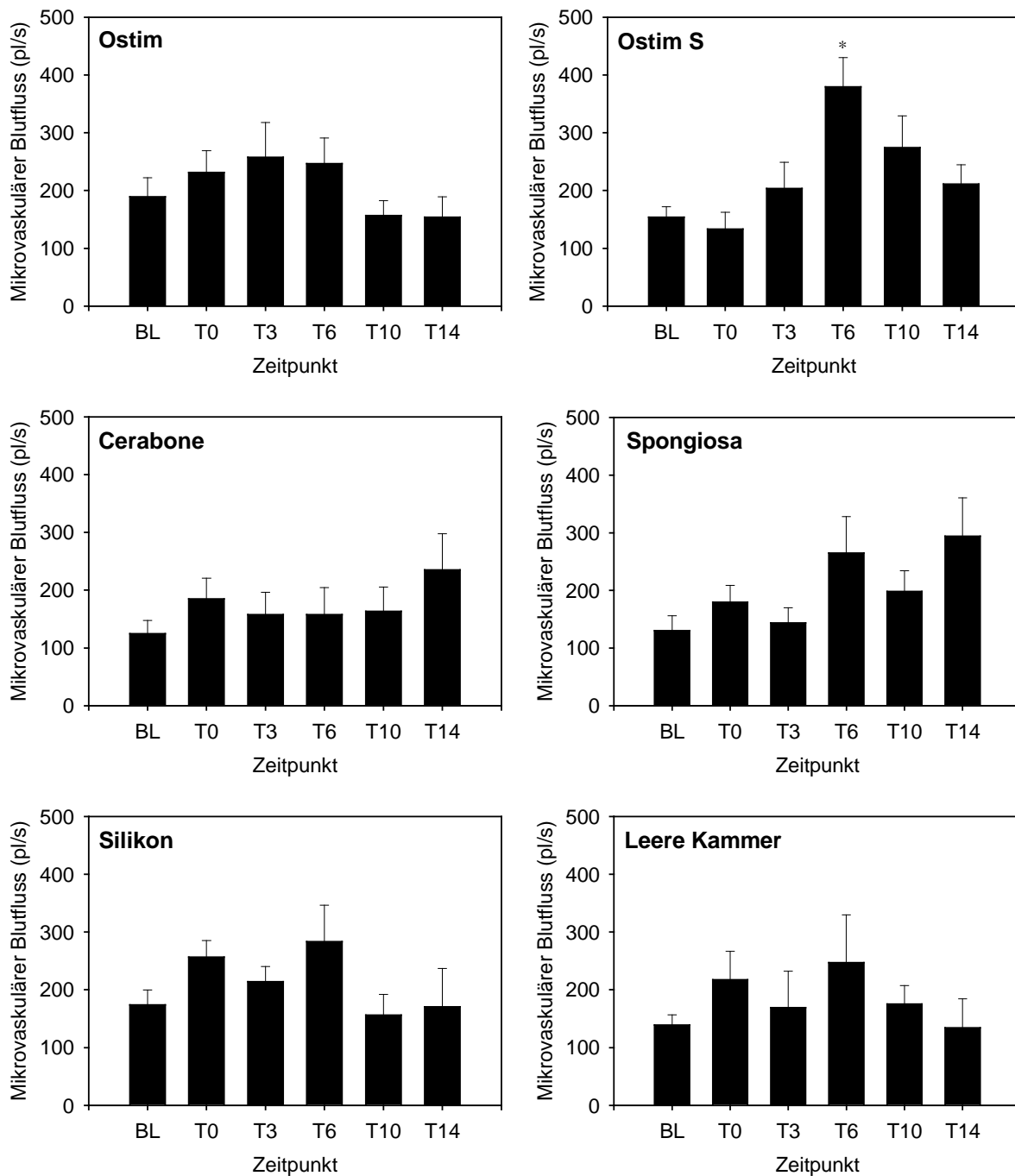


Abbildung 24: Mikrovaskulärer Blutfluss (pl/s) in repräsentativen Venolen im Randbereich von Ostim, Ostim S, Cerabone, Spongiosa und Silikon vor der Implantation (BL), direkt nach der Implantation (T0) sowie an den Tagen 3, 6, 10 und 14. Leere Kammern ohne Implantate dienten als Kontrolle. Mittelwerte ± SEM.

6.3.3. Vaskularisierung der implantierten Knochenersatzstoffe

Erste Anzeichen der Angiogenese konnten im Randbereich der Knochenersatzstoffe am Tag 3 nach Implantation beobachtet werden. Die beginnende Angiogenese war charakterisiert durch die Ausbildung von Kapillarsprossen, die sich aus den venösen Segmenten der Kapillaren und den postkapillären Venolen der quergestreiften Rückenhaulmuskulatur entwickelten. Während der folgenden Untersuchungstage wuchsen die Sprossen in die Implantate ein (*Abbildung 25*). Eine angiogene Reaktion fand nur in den Rückenhaulkammern statt, in welche die verschiedenen Materialien implantiert wurden. In der Kontrollgruppe mit leeren Rückenhaulkammern ohne Implantate waren keine Zeichen der Angiogenese nachweisbar. Dies zeigt, dass die Implantation der beiden Titanrahmen der Rückenhaulkammer per se keinen angiogenen Reiz auf das freipräparierte Muskelgewebe auslöst.

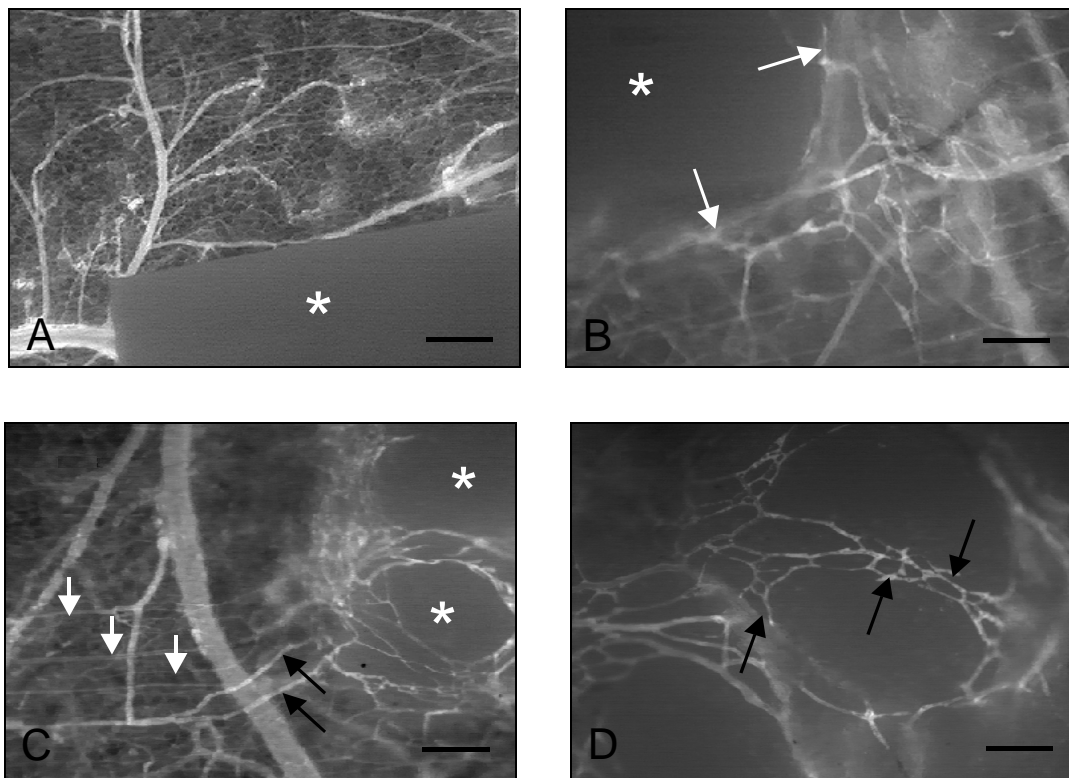


Abbildung 25: Intravitale fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Ostim. **A)** Direkt nach der Implantation (Tag 0) von Ostim (Stern) sind noch keine Zeichen der Angiogenese zu erkennen. **B)** An Tag 6 nach der Implantation von Ostim (Stern) sind erste Anzeichen der Angiogenese in den Randzonen des Implantats zu erkennen. Die noch schlecht perfundierten Kapillarsprossen wachsen in Richtung des Implantats (Pfeile). **C)** An Tag 14 sind die Randzonen der Implantate bereits gut vaskularisiert, während im Zentrum noch avaskuläre Bereiche vorhanden sind (Sterne). Das neugebildete mikrovaskuläre Netzwerk wird durch Gefäße (Pfeile) drainiert, die teilweise aus den parallel verlaufenden Kapillaren der Rückenhaulmuskulatur (Pfeilspitzen) entstanden sind. **D)** An Tag 14 nach der Implantation ist der angiogene Prozess noch nicht abgeschlossen, was an den Kapillarsprossen (Pfeile) zu sehen ist. (Pfeile). (Intravitale Fluoreszenzmikroskopie, Kontrastverstärkung mit FITC-Dextran in Baulicht-Epi-Illumination, Skalierung: A = 100µm, B, D = 20µm, C = 70µm)

6.3.3.1. Angiogenese-positive Felder

Der Anteil der Angiogenese-positiven Felder wurde in acht Untersuchungsfeldern im Randbereich und in vier Untersuchungsfeldern im Zentrum der Implantate bestimmt. Direkt nach der Implantation der Materialien an Tag 0 waren noch keine Zeichen der Angiogenese zu erkennen. Der Anteil der Angiogenese-positiven Felder nahm in allen Gruppen ab Tag 3 nach Implantation kontinuierlich zu mit signifikant gesteigerten Werten an den späteren Untersuchungszeitpunkten im Vergleich zur Baseline. Die Zunahme der Angiogenese-positiven Felder war in der Spongiosa-Gruppe am stärksten ausgeprägt. Der Anteil der Angiogenese-positiven Felder betrug in dieser Gruppe sowohl am Rand als auch im Zentrum am 14. Tag 100%, während zu diesem Zeitpunkt in den anderen Gruppen noch wesentliche Areale avaskulär waren (*Abbildung 26, 27*).

In den Rückenhautkammern der Silikon-Gruppe war nur eine geringe angiogene Reaktion nachweisbar. Bis zum 14. Untersuchungstag lag der Anteil der Angiogenese-positiven Felder im Zentrum bei 0% (*Abbildung 27*).

6.3.3.2. Funktionelle Kapillardichte

Die funktionelle Kapillardichte gibt die Länge der neugebildeten perfundierten Kapillaren in Bezug auf die Fläche der Implantate wieder. In denjenigen Untersuchungsfeldern, in denen Anzeichen der Angiogenese zu erkennen waren, wurde die funktionelle Kapillardichte der neugebildeten Blutgefäße gemessen. Die funktionelle Kapillardichte nahm in allen Gruppen, außer in der Kontrollgruppe mit den leeren Rückenhautkammern kontinuierlich bis zum Ende der Untersuchungen an Tag 14 zu (*Abbildung 30*). Zu den späteren Zeitpunkten waren daher die Werte im Vergleich zur Baseline signifikant erhöht. Dabei wies die Spongiosa zu allen Zeitpunkten eine höhere funktionelle Kapillardichte auf als alle anderen implantierten Materialien.

In den Rückenhautkammern mit Silikon fand nur im Randbereich der Implantate Angiogenese statt. Entsprechend war die funktionelle Kapillardichte im Zentrum von Silikon während des gesamten Beobachtungszeitraums 0 cm/cm². In den Rückenhautkammern ohne Implantate bildeten sich keine neuen Blutgefäße aus. Entsprechend war die funktionelle Kapillardichte hier ebenfalls 0 cm/cm² (*Abbildung 28, 29*).

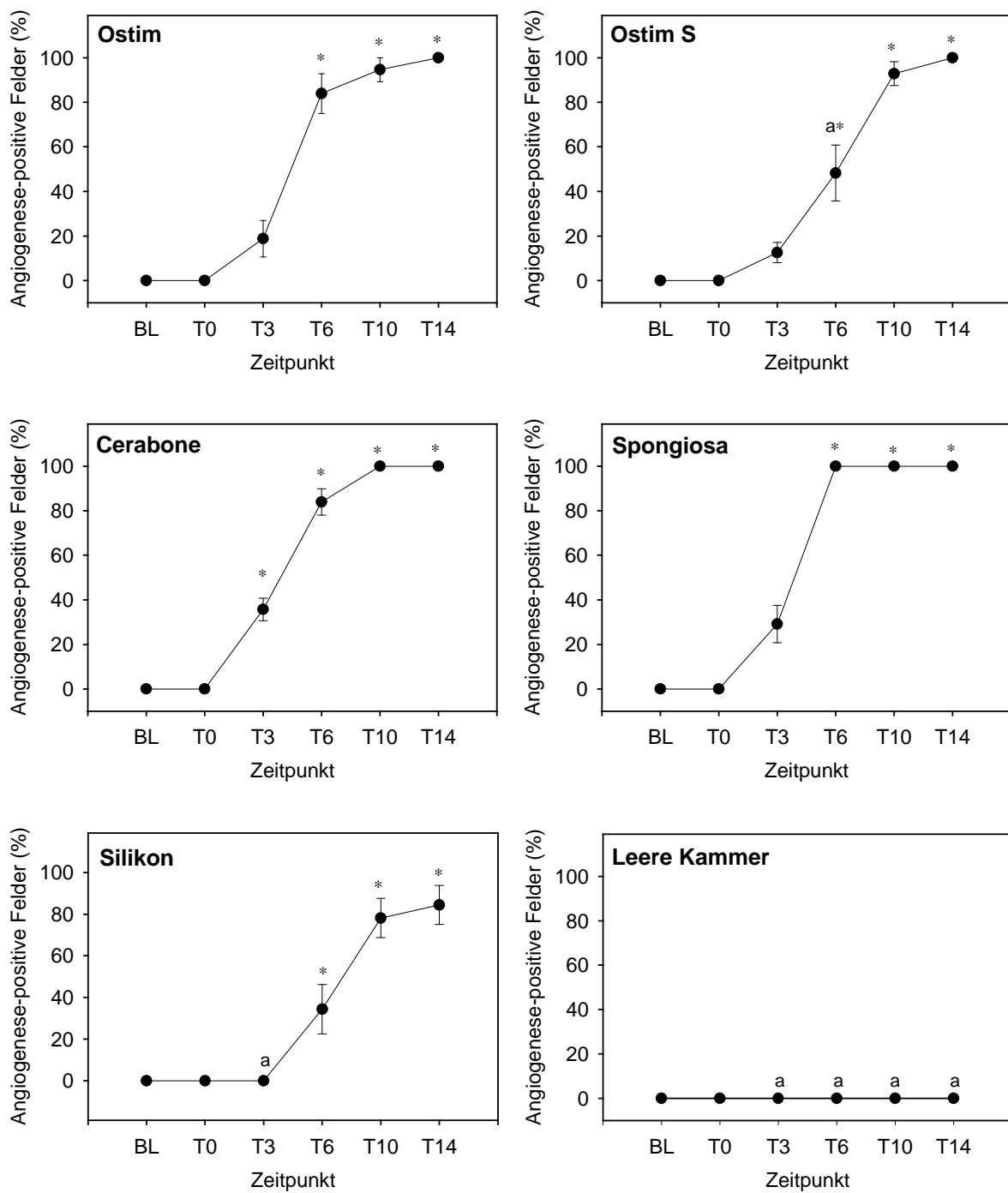


Abbildung 26: Anteil der Angiogenese-positiven Felder (%) im Randbereich von Ostim, Ostim S, Cerabone, Spongiosa und Silikon vor der Implantation (BL), direkt nach der Implantation (T0), sowie an den Tagen 3, 6, 10 und 14. Leere Kammern ohne Implantate dienten als Kontrolle. Mittelwerte \pm SEM. ^a $p < 0,05$ vs. Spongiosa; * $p < 0,05$ vs. BL.

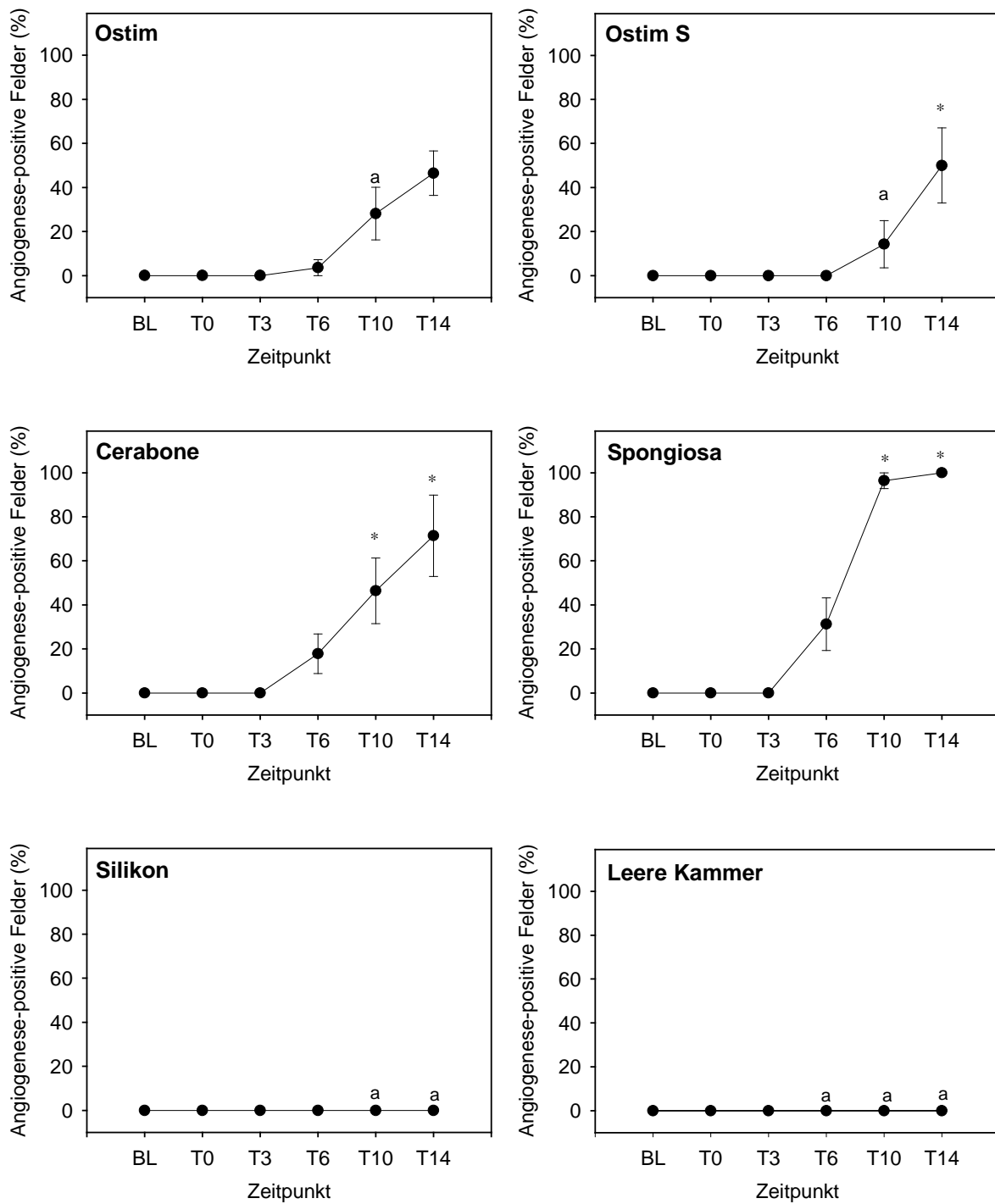


Abbildung 27: Anteil der Angiogenese-positiven Felder (%) im Zentrum von Ostim, Ostim S, Cerabone, Spongiosa und Silikon vor der Implantation (BL), direkt nach der Implantation (T0), sowie an den Tagen 3, 6, 10 und 14. Leere Kammern ohne Implantate dienten als Kontrolle. Mittelwerte ± SEM. ^ap < 0,05 vs. Spongiosa; *p < 0,05 vs. BL.

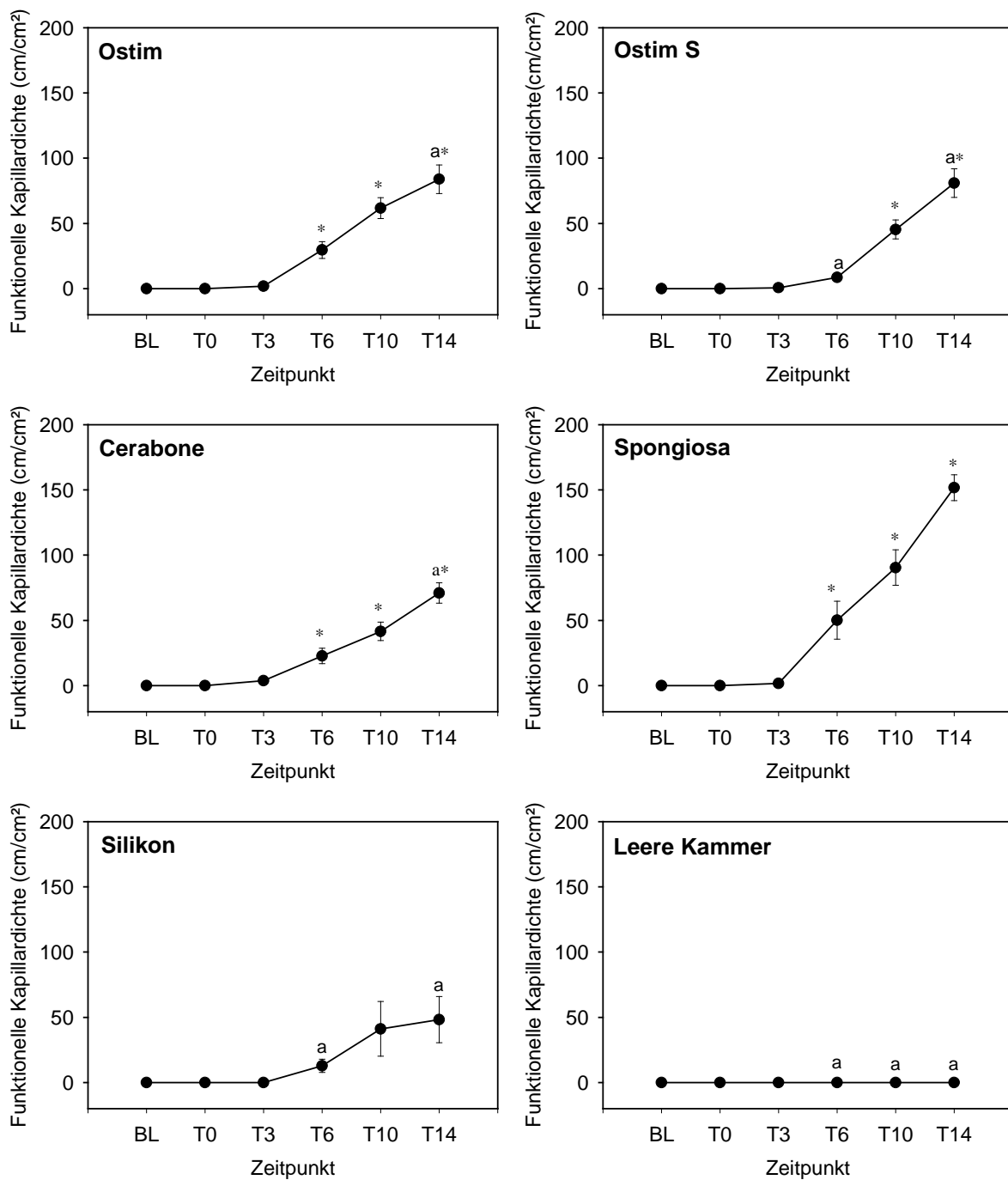


Abbildung 28: Funktionelle Kapillardichte (cm/cm²) der neugebildeten Gefäßnetzwerke im Randbereich von Ostim, Ostim S, Cerabone, Spongiosa und Silikon vor der Implantation (BL), direkt nach der Implantation (T0), sowie an den Tagen 3, 6, 10 und 14. Leere Kammern ohne Implantate dienen als Kontrolle. Mittelwerte ± SEM. ^ap<0,05 vs. Spongiosa; *p<0,05 vs. BL.

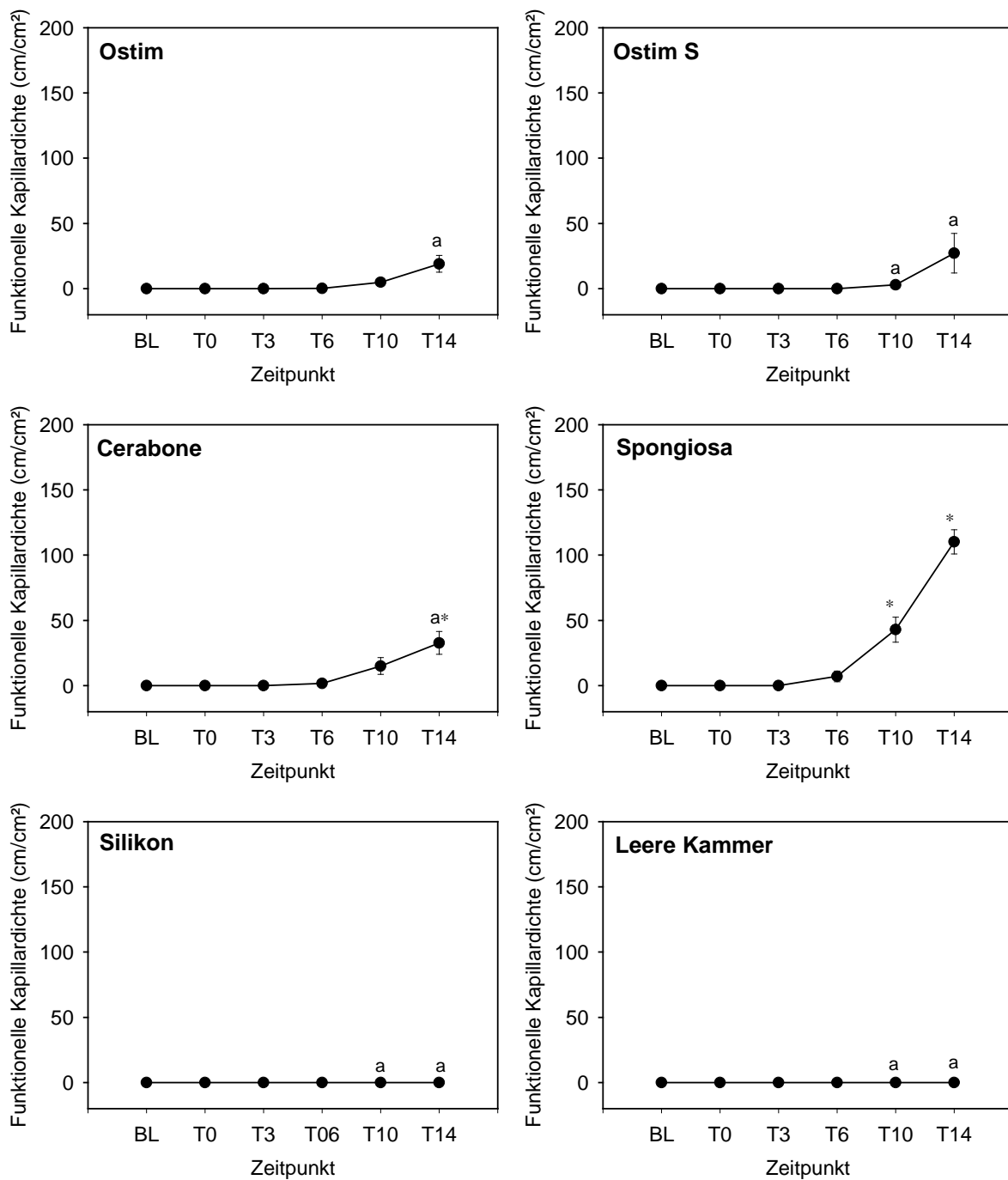


Abbildung 29: Funktionelle Kapillardichte (cm/cm²) der neugebildeten Gefäßnetzwerke im Zentrum von Ostim, Ostim S, Cerabone, Spongiosa und Silikon vor der Implantation (BL), direkt nach der Implantation (T0), sowie an den Tagen 3, 6, 10 und 14. Leere Kammern ohne Implantate dienten als Kontrolle. Mittelwerte ± SEM. ^ap<0,05 vs. Spongiosa; *p<0,05 vs. BL.

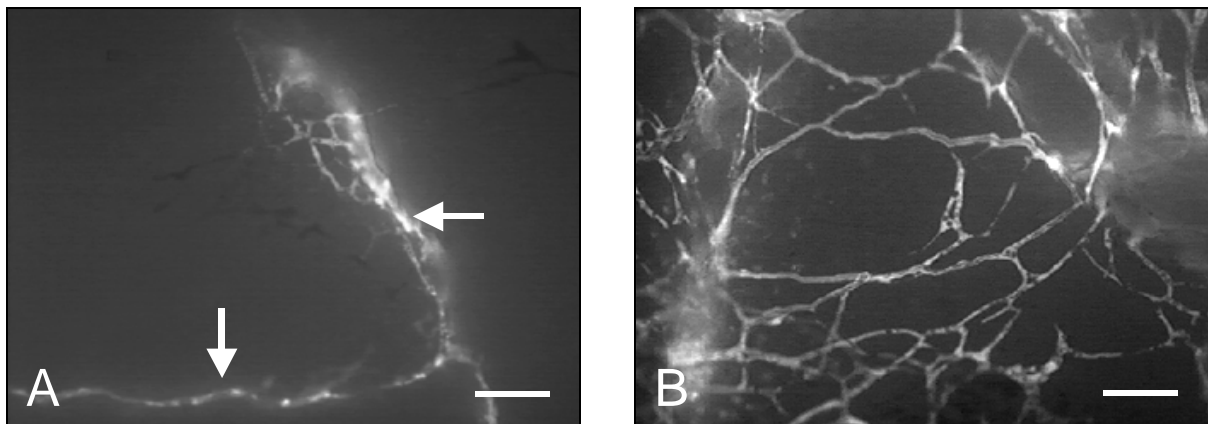


Abbildung 30: Intravitale fluoreszenzmikroskopische Darstellung der funktionellen Kapillardichte von Ostim. **A)** An Tag 6 nach Implantation waren noch große Bereiche im Zentrum der Implantate avaskulär. Nur wenige Blutgefäße konnten das Implantat durchdringen (Pfeile), wodurch sich eine niedrige funktionelle Kapillardichte ergab. **B)** An Tag 14 nach Implantation hatte sich im Zentrum der Implantate ein dichtes vaskularisiertes Gefäßnetzwerk mit einer hohen funktionellen Kapillardichte entwickelt. (Intravitale Fluoreszenzmikroskopie, Kontrastverstärkung mit FITC-Dextran in Blaulicht-Epi-Illumination, Skalierung = 20µm).

6.4. Einfluss der Größe und der Anordnung implantierter Ostim-Fragmente auf die Reaktion des Empfängergewebes

Neben dem Vergleich von Ostim mit anderen synthetischen und biologischen Knochenersatzstoffen, wurde in einem weiteren Teilabschnitt der vorliegenden Studie untersucht, welchen Einfluss die Größe und die Anordnung implantierter Ostim-Fragmente auf die Reaktion des Empfängergewebes hat. Normal implantiertes Ostim (siehe Abschnitt 6.3.) wurde hierzu verglichen mit kleinen Ostim-Fragmenten, welche mit kleinem (0,2mm) oder großem (1,2mm) Abstand zueinander in die Rückenhautkammer implantiert worden war.

Beim Vergleich der Leukozyten-Endothelzell-Interaktion zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen und im Zeitverlauf. In den drei Gruppen lag die Zahl der rollenden Leukozyten zwischen 15 und 30 Zellen/min und die Zahl der adhärenenten Leukozyten zwischen 50 und 150 Zellen/mm² (Abbildung 31).

Die Gefäßpermeabilität stieg in den drei Gruppen nach der Implantation kontinuierlich an. Dieser Anstieg war im Vergleich zur Baseline Messung signifikant gesteigert. Zwischen den einzelnen Gruppen (Ostim, Ostim großer Implantatabstand und Ostim kleiner Implantatabstand) zeigten sich jedoch keine signifikanten Unterschiede (Abbildung 32).

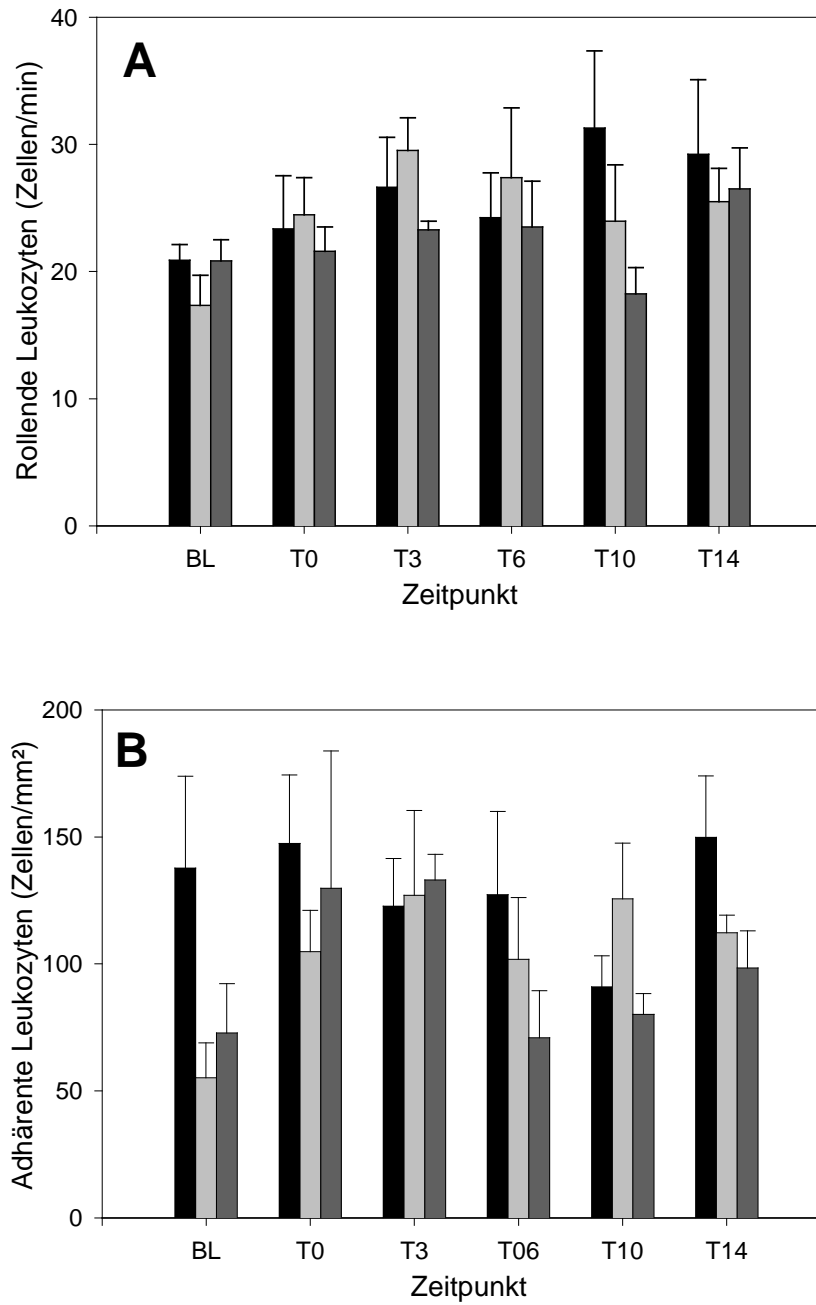


Abbildung 31: Zahl rollender Leukozyten (Zellen/min) **(A)** und adhärenente Leukozyten (Zellen/mm²) **(B)** in repräsentativen Venolen im Randbereich von Ostim (schwarze Balken), Ostim großer Implantatabstand (hellgraue Balken) und Ostim kleiner Implantatabstand (dunkelgraue Balken) vor der Implantation (BL) in die Rückenhautkammer, direkt nach der Implantation (T0) sowie an den Tagen 3, 6, 10 und 14. Mittelwerte ± SEM.

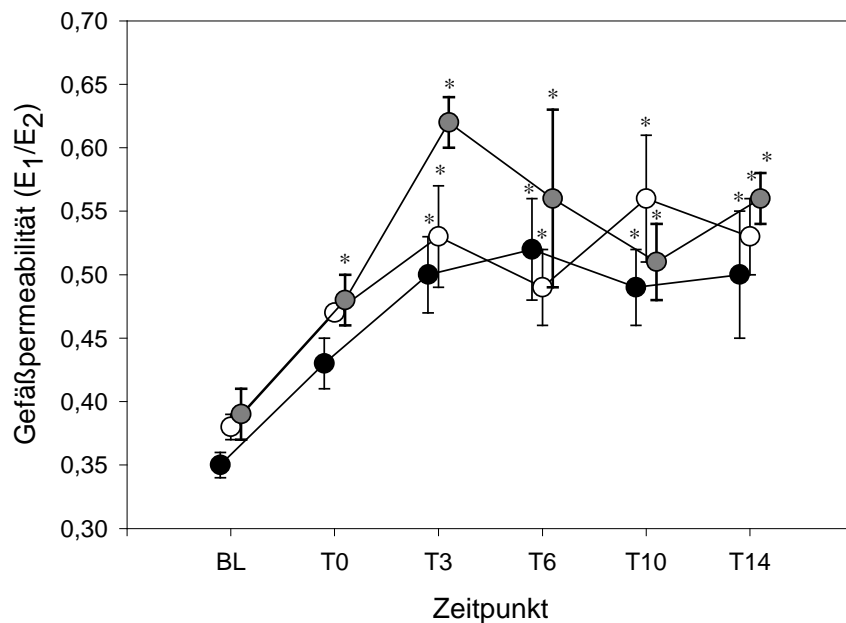


Abbildung 32: Gefäßpermeabilität (E_1/E_2) in repräsentativen Venolen im Randbereich von Ostim (schwarze Kreise), Ostim großer Implantatabstand (weiße Kreise) und Ostim kleiner Implantatabstand (graue Kreise) vor der Implantation (BL) in die Rückenhautkammer, direkt nach der Implantation (T0) sowie an den Tagen 3, 6, 10 und 14. Mittelwerte \pm SEM. * $p < 0,05$ vs. BL.

Die mikrohämodynamischen Parameter zeigten keine relevanten Unterschiede zwischen den drei Gruppen. Der Gefäßdurchmesser lag in allen Gruppen zwischen 30 und 40 μm (Abbildung 33).

Die Blutzellgeschwindigkeit lag zwischen 200 und 400 $\mu\text{m/s}$. Nur bei Ostim großer Implantatabstand zeigten sich vor der Implantation (Baseline) signifikant erniedrigte Werte. Später lagen diese allerdings wieder im physiologischen Bereich, wie bei den beiden anderen Gruppen (Abbildung 33).

Die Scherrate lag in den drei Gruppen zwischen 50 und 90 s^{-1} . Da sich die Scherrate aus den Parametern Gefäßdurchmesser und Blutzellgeschwindigkeit errechnet, zeigten sich auch hier keine relevanten Unterschiede zwischen den drei Gruppen (Abbildung 34).

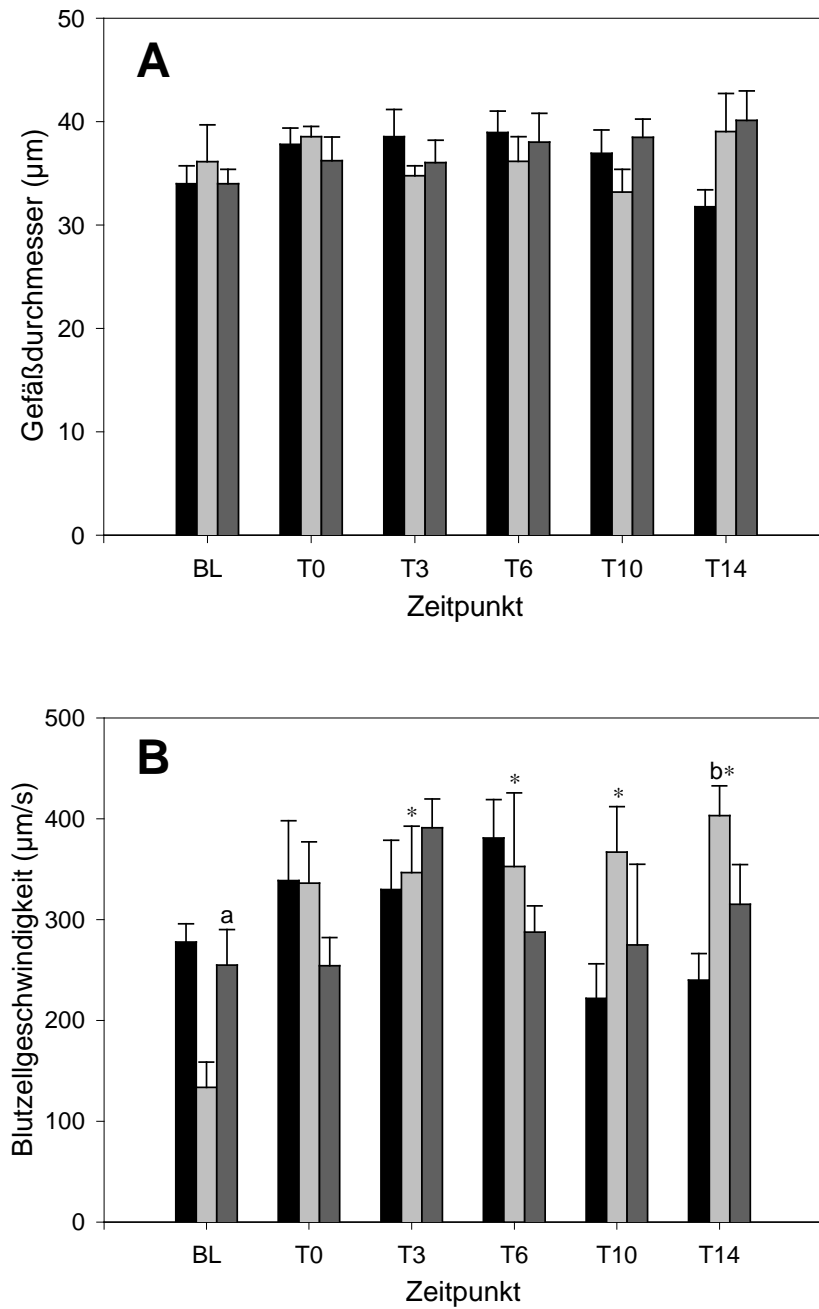


Abbildung 33: Gefäßdurchmesser (µm) (**A**) und Blutzellgeschwindigkeit (µm/s) (**B**) in repräsentativen Venolen im Randbereich von Ostim (schwarze Balken), Ostim großer Implantatabstand (hellgraue Balken) und Ostim kleiner Implantatabstand (dunkelgraue Balken) vor der Implantation (BL) in die Rückenhautkammer, direkt nach der Implantation (T0) sowie an den Tagen 3, 6, 10 und 14. Mittelwerte ± SEM. ^ap<0,05 vs. Ostim großer Implantatabstand; ^bp<0,05 vs. Ostim; *p<0,05 vs. BL.

Der mikrovaskuläre Blutfluss lag in den drei Gruppen zwischen 90 und 310 pl/s ohne relevante Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen (*Abbildung 34*).

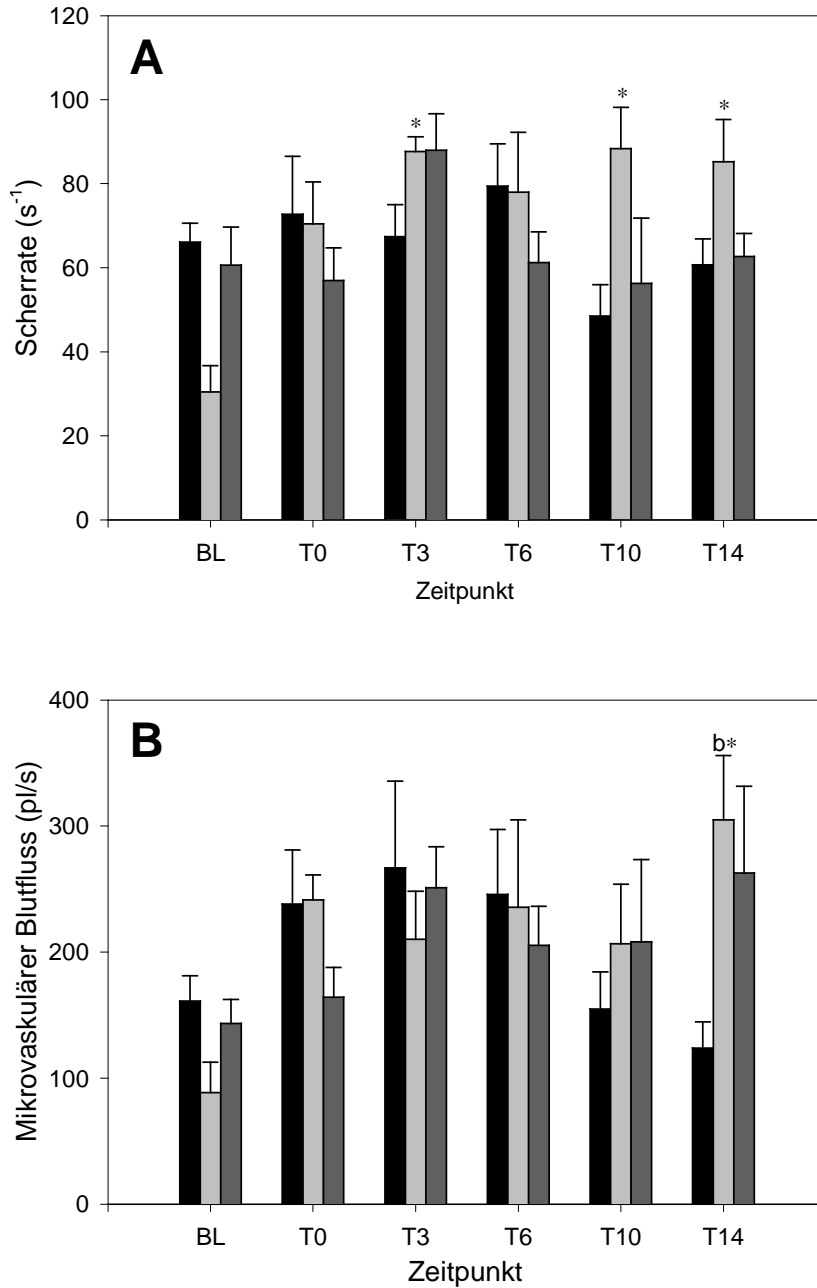


Abbildung 34: Scherrate (s⁻¹) (**A**) und mikrovaskulärer Blutfluss (pl/s) (**B**) in repräsentativen Venolen im Randbereich von Ostim (schwarze Balken), Ostim großer Implantatabstand (hellgraue Balken) und Ostim kleiner Implantatabstand (dunkelgraue Balken) vor der Implantation (BL) in die Rückenhautkammer, direkt nach der Implantation (T0) sowie an den Tagen 3, 6, 10 und 14. Mittelwerte ± SEM. ^ap<0,05 vs. Ostim; *p<0,05 vs. BL.

Der Anteil der Angiogenese-positiven Felder stieg nach der Implantation in allen drei Gruppen sowohl im Randbereich als auch im Zentrum der Implantate kontinuierlich an. Ab dem sechsten Tag zeigten sich signifikant erhöhte Werte im Vergleich zur Baseline. An den Tagen 10 und 14 zeigten sich in der Gruppe kleiner Implantatabstand signifikant gesteigerte Werte der Angiogenese-positiven Felder im Zentrum der Implantate im Vergleich zu Ostim (Abbildung 35).

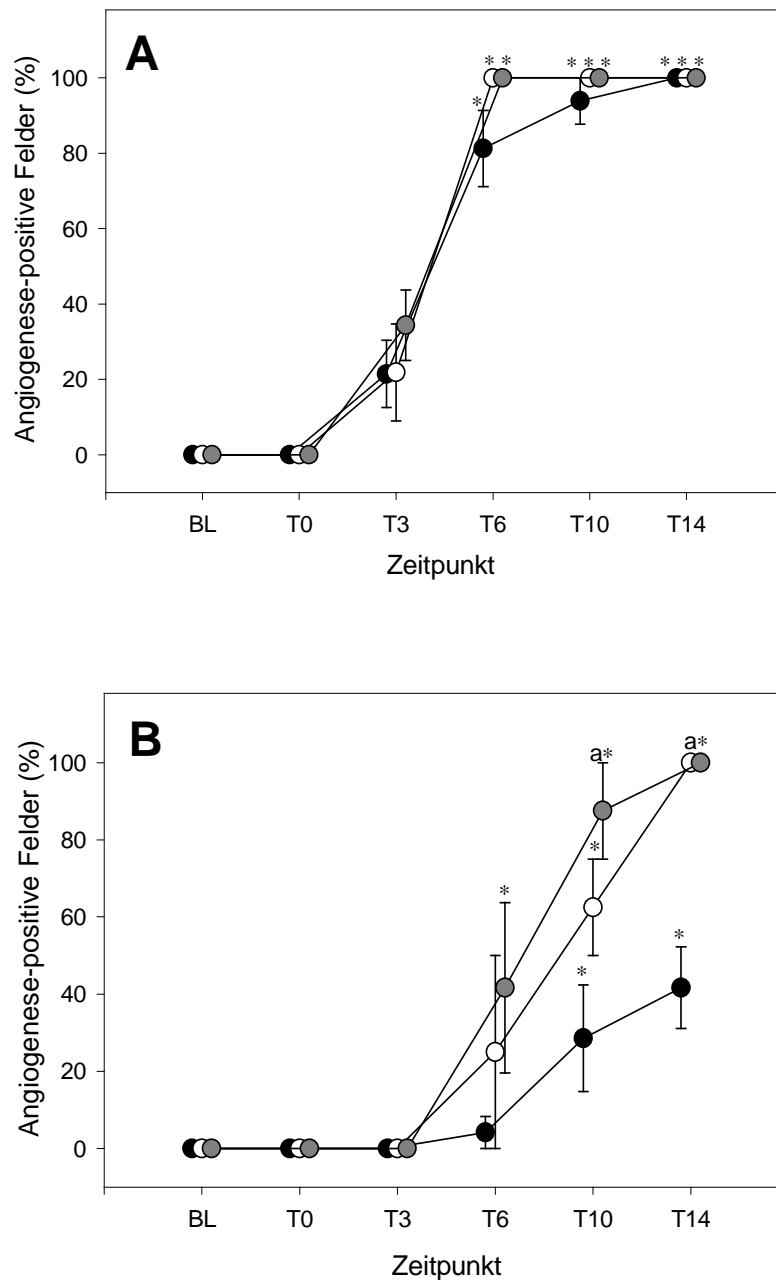


Abbildung 35: Angiogenese-positiv Felder (%) im Randbereich (A) und im Zentrum (B) von Ostim (schwarze Kreise), Ostim großer Implantatabstand (weiße Kreise) und Ostim kleiner Implantatabstand (graue Kreise) vor der Implantation (BL) in die Rückenhautkammer, direkt nach der Implantation (T0) sowie an den Tagen 3, 6, 10 und 14. Mittelwerte \pm SEM. ^a $p < 0,05$ vs. Ostim; * $p < 0,05$ vs. BL.

Die funktionelle Kapillardichte der neugebildeten Gefäße stieg in allen drei Gruppen kontinuierlich an, so dass die Werte gegen Ende der Untersuchungen signifikant gegenüber der Baseline erhöht waren. Bei den beiden Gruppen mit kleinen Ostim-Fragmenten (Ostim größer / kleiner Implantatabstand) zeigten sich an Tag 14 signifikant erhöhte Werte im Vergleich zu Ostim (Abbildung 36).

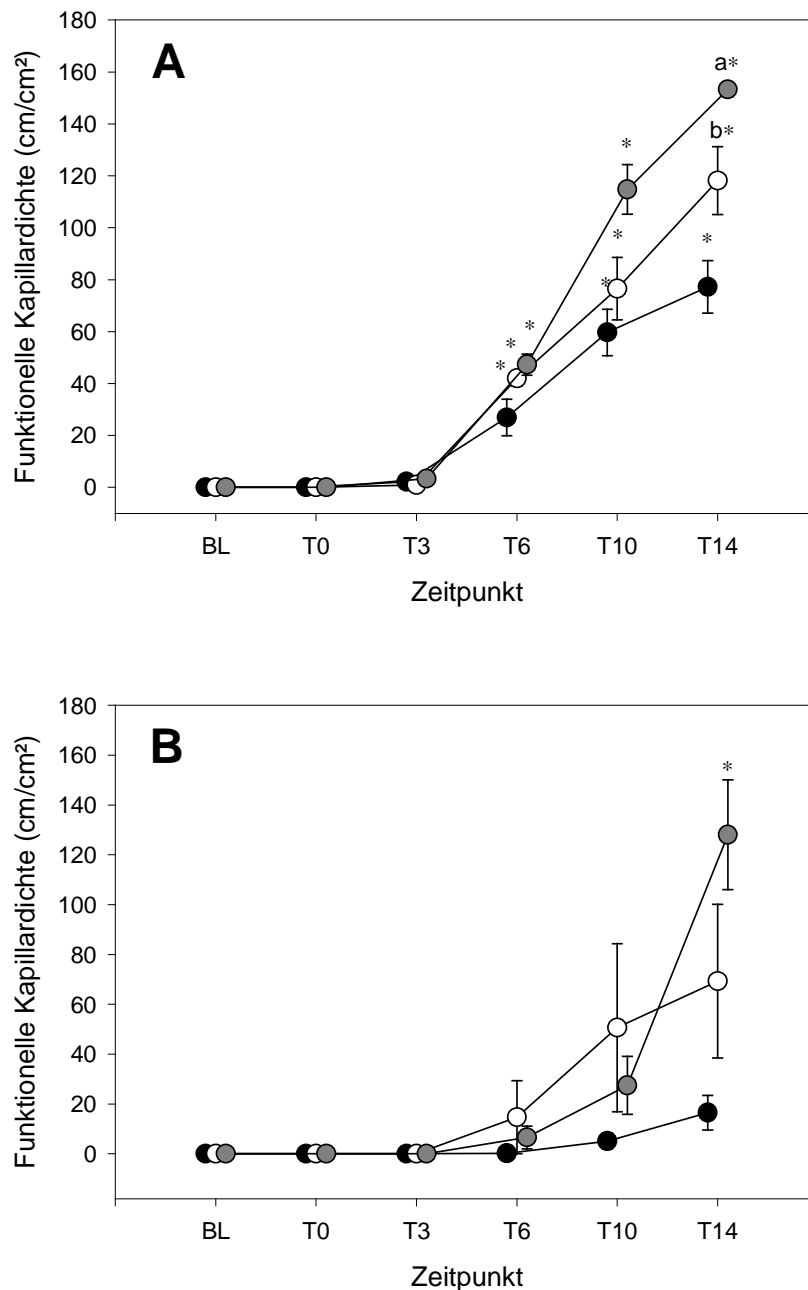


Abbildung 36: Funktionelle Kapillardichte (cm/cm²) der neugebildeten Gefäßnetzwerke im Randbereich (A) und im Zentrum (B) von Ostim (schwarze Kreise), Ostim großer Implantatabstand (weiße Kreise) und Ostim kleiner Implantatabstand (graue Kreise) vor der Implantation (BL) in die Rücken- hautkammer, direkt nach der Implantation (T0) sowie an den Tagen 3, 6, 10 und 14. Mittelwerte \pm SEM. ^ap<0,05 vs. Ostim; ^bp<0,05 vs. Ostim und Ostim kleiner Implantatabstand; *p<0,05 vs. BL.

6.5. Histologie und Immunhistochemie

6.5.1. Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Am 14. Tag nach der Implantation der Materialien wurden histologische Präparate der Rückenhautkammerpräparationen angefertigt.

In allen Rückenhautkammern, in die Materialien implantiert wurden, zeigte sich die Bildung von vaskularisiertem Granulationsgewebe (*Abbildung 37*). In der Kontrollgruppe ohne Implantate konnten auch bei der histologischen Analyse keine Zeichen der Angiogenese festgestellt werden. In dieser Gruppe waren nur die präparierten Schichten der Rückenhautkammer ohne neugebildetes Granulationsgewebe zu erkennen.

In den histologischen Präparaten der implantierten Materialien zeigte sich ein Unterschied im Wachstumsmuster der neugebildeten Blutgefäße. In den Gruppen mit den resorbierbaren Knochenersatzstoffen Ostim und Ostim S konnten die Blutgefäße in den Resorptionszonen direkt in das Biomaterial einwachsen. Im Gegensatz dazu konnten in den Gruppen mit der Hydroxylapatit-Keramik Cerabone und Silikon keine Blutgefäße in die Implantate eindringen. Die höchste Dichte an neugebildeten Blutgefäßen und Granulationsgewebe zeigte sich in der Spongiosa-Gruppe.

In keinem der histologischen Präparate konnte eine erhöhte Anzahl oder Infiltration von Entzündungszellen nachgewiesen werden, was auf die gute Biokompatibilität der implantierten Materialien hindeutet.

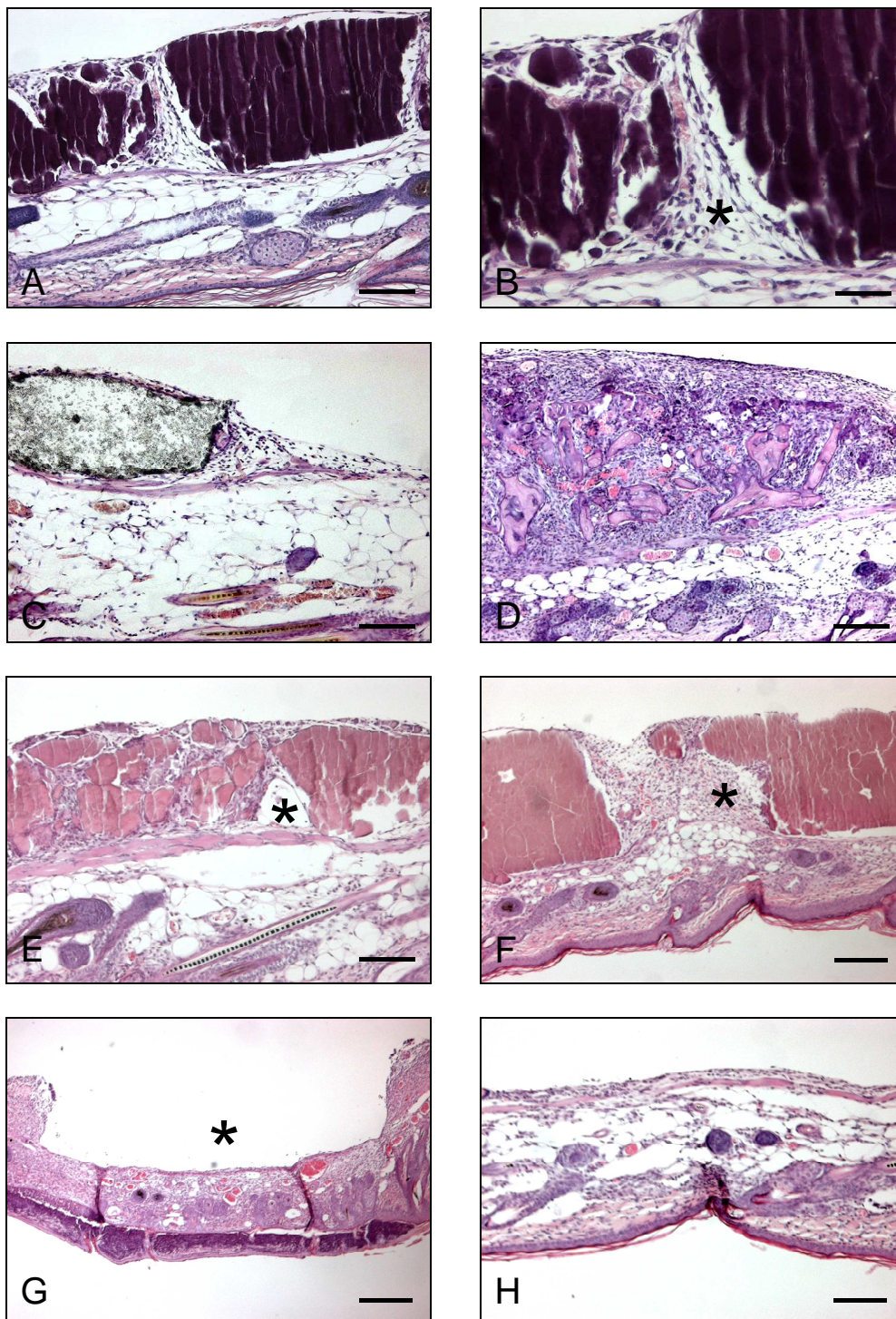


Abbildung 37: H&E-Histologie von Ostim (A, B), Cerabone (C), Spongiosa (D), Ostim kleiner Implantatabstand (E), Ostim großer Implantatabstand (F), Silikon (G) und einer leeren Kammer ohne Implantat (H) an Tag 14 nach der Implantation in die Rückenhautkammer. Die höhere Vergrößerung (B) zeigt die Bildung von Granulationsgewebe mit neugebildeten Blutgefäßen um Ostim (B). Im Gegensatz zu Cerabone zeigen sich bei Ostim bereits Areale, in denen das Material resorbiert wurde (B, E, F, Stern), so dass Blutgefäße direkt in das Biomaterial eindringen konnten. Die Spongiosa ist umgeben von reich vaskularisiertem Granulationsgewebe mit einer höheren Zelldichte im Vergleich zu den synthetischen Knochenersatzstoffen. Das implantierte Silikon wurde während der histologischen Anfärbung herausgelöst. Zu erkennen ist noch der Umriss des Implantats (G, Stern). In der Rückenhautkammer ohne Implantate (H) zeigt sich kein neu gebildetes Granulationsgewebe. (Hämatoxylin-Eosin-Färbung, Skalierung: A, C, E=50µm; B, D= 25µm; F, H= 100µm; G= 250µm)

6.5.2. PCNA

Der immunhistochemische Nachweis von PCNA zeigte eine hohe proliferative Aktivität des Granulationsgewebes in der Umgebung der Implantate (*Abbildung 38*). Dabei zeigten die Zellen im Randbereich von Ostim und Cerabone eine vergleichbare proliferative Aktivität. Die höchste proliferative Aktivität wiesen die Zellen im Randbereich der Spongiosa auf, wo auch die stärkste angiogene Reaktion beobachtet werden konnte. In der Gruppe mit Silikon war die Zahl proliferierender Zellen im Vergleich zu den anderen Implantatgruppen erniedrigt.

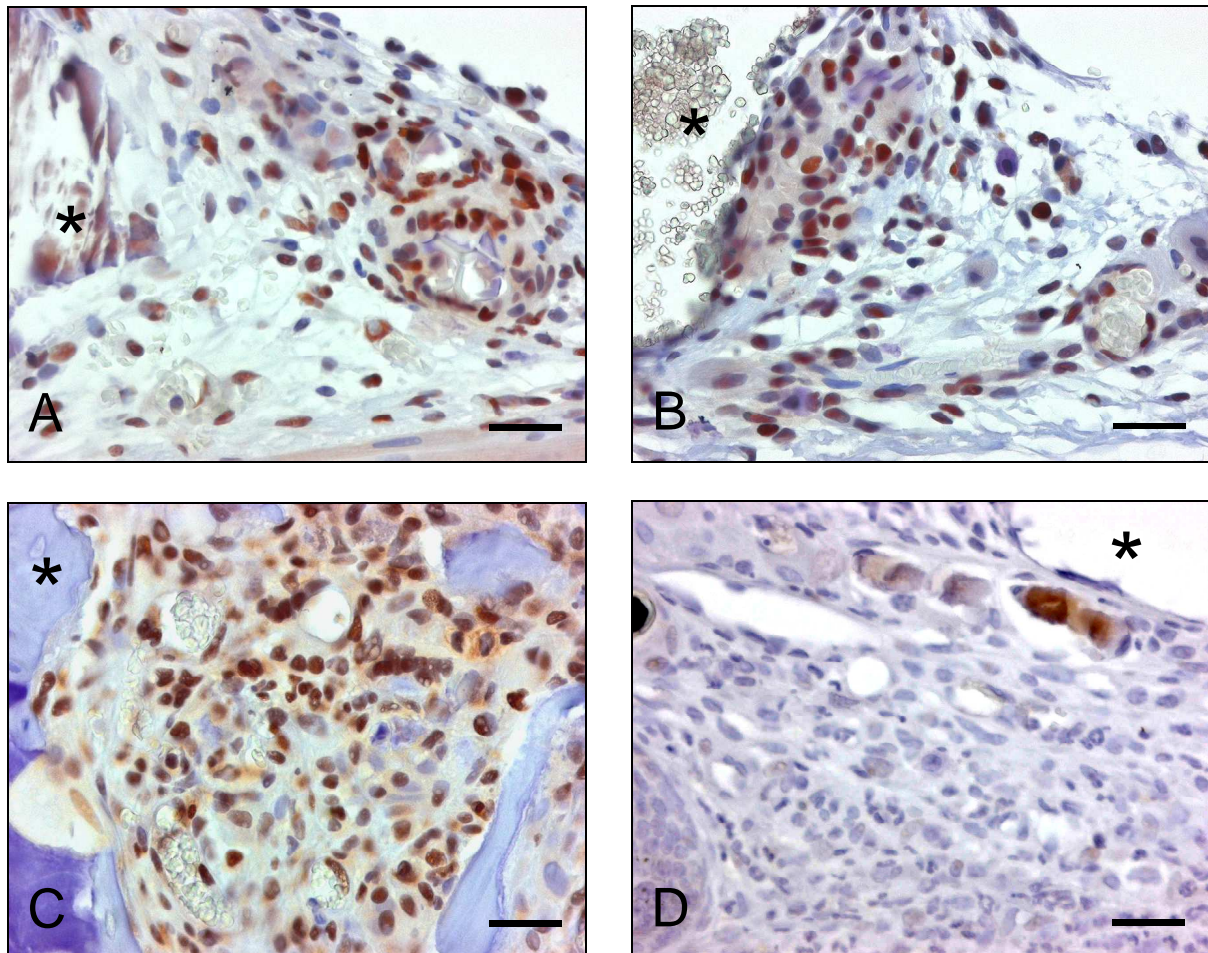


Abbildung 38: Immunhistochemischer Nachweis von PCNA-positiven Zellen innerhalb des Granulationsgewebes, das Ostim (**A**, Stern), Cerabone (**B**, Stern), Spongiosa (**C**, Stern) und Silikon (**D**, Stern), an Tag 14 nach Implantation in die Rückenhautkammer umgibt. Zu beachten ist, dass ein großer Anteil der Zellen, die Ostim und Cerabone umgeben, PCNA-positiv sind. In der Spongiosa-Gruppe zeigen fast alle Zellen, die das Implantat umgeben, eine proliferative Aktivität (rot-braun gefärbte Zellkerne). In der Umgebung des Silikon waren nur wenige Zellen PCNA-positiv. (PCNA-Färbung, Skalierung: A, B, C, D = 25 μ m)

6.5.3. Caspase-3-Färbung

In allen Untersuchungsgruppen mit implantierten Materialien wurden keine oder nur vereinzelte Caspase-3-positive Zellen im Granulationsgewebe nachgewiesen. Dies zeigt, dass sich die Materialien durch eine hohe Biokompatibilität auszeichneten und keine zytotoxischen Effekte in ihrer Umgebung induzierten (*Abbildung 39*).

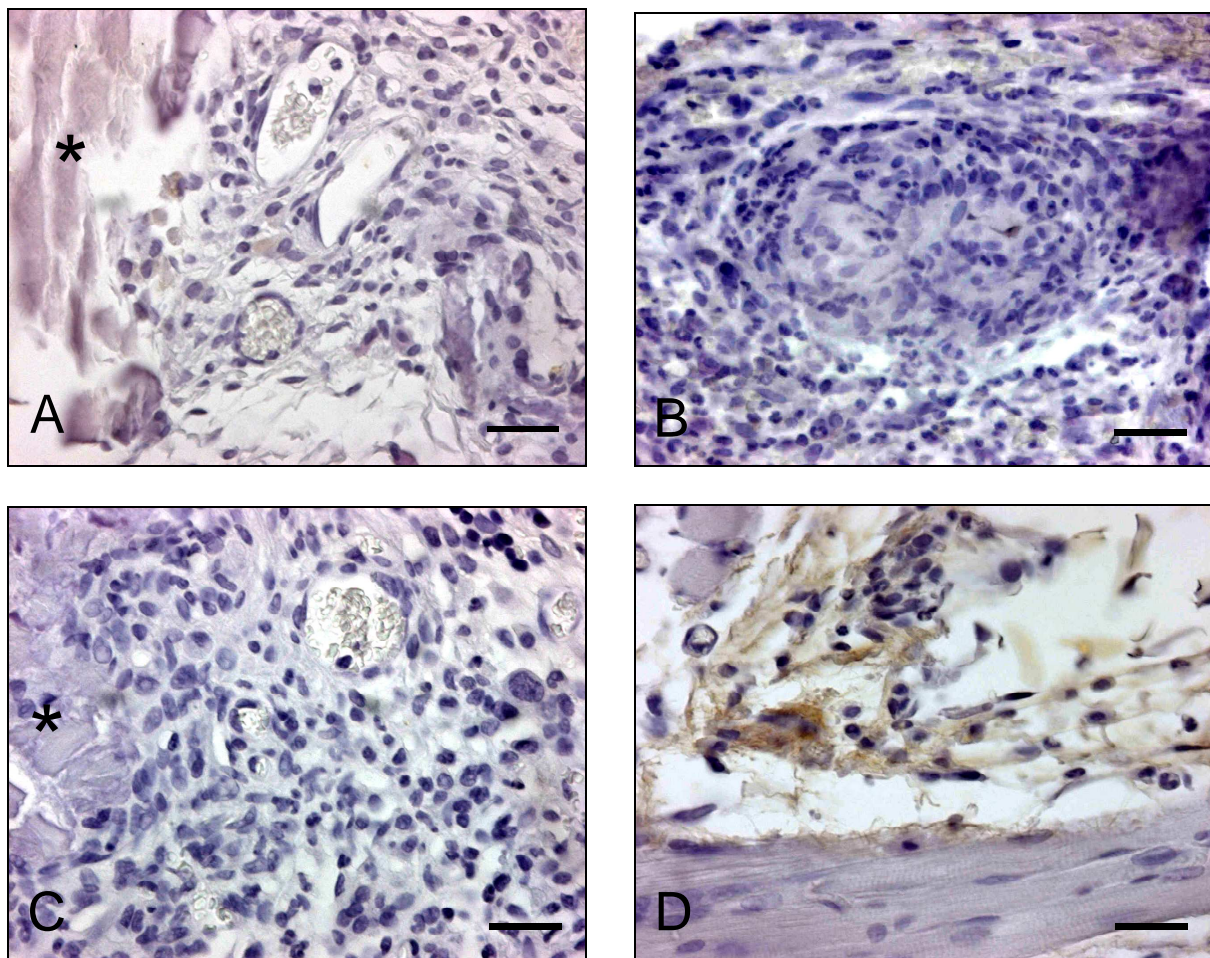


Abbildung 39: Immunhistochemischer Nachweis von Caspase-3-positiven Zellen im Randbereich von Ostim (Stern) (A), Cerabone (B), Spongiosa (Stern) (C) und Silikon (D). In keinem der Präparate fanden sich im Randbereich der Implantate eine vermehrte Anzahl apoptotischer Zellen. (Caspase-3-Färbung, Skalierung = 25µm)

6.5.4. CAE-Färbung

Bei der Chlor-Acetat-Esterase-Färbung werden Leukozyten dunkelrot angefärbt. Die histologische Darstellung der Leukozyten in den einzelnen Gruppen bestätigte die Ergebnisse der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie. Nach Implantation der Materialien kam es zu keiner vermehrten Einwanderung von Leukozyten in das neugebildete Granulationsgewebe. Im Randbereich der Implantate waren nur wenige Leukozyten zu erkennen (*Abbildung 40*).

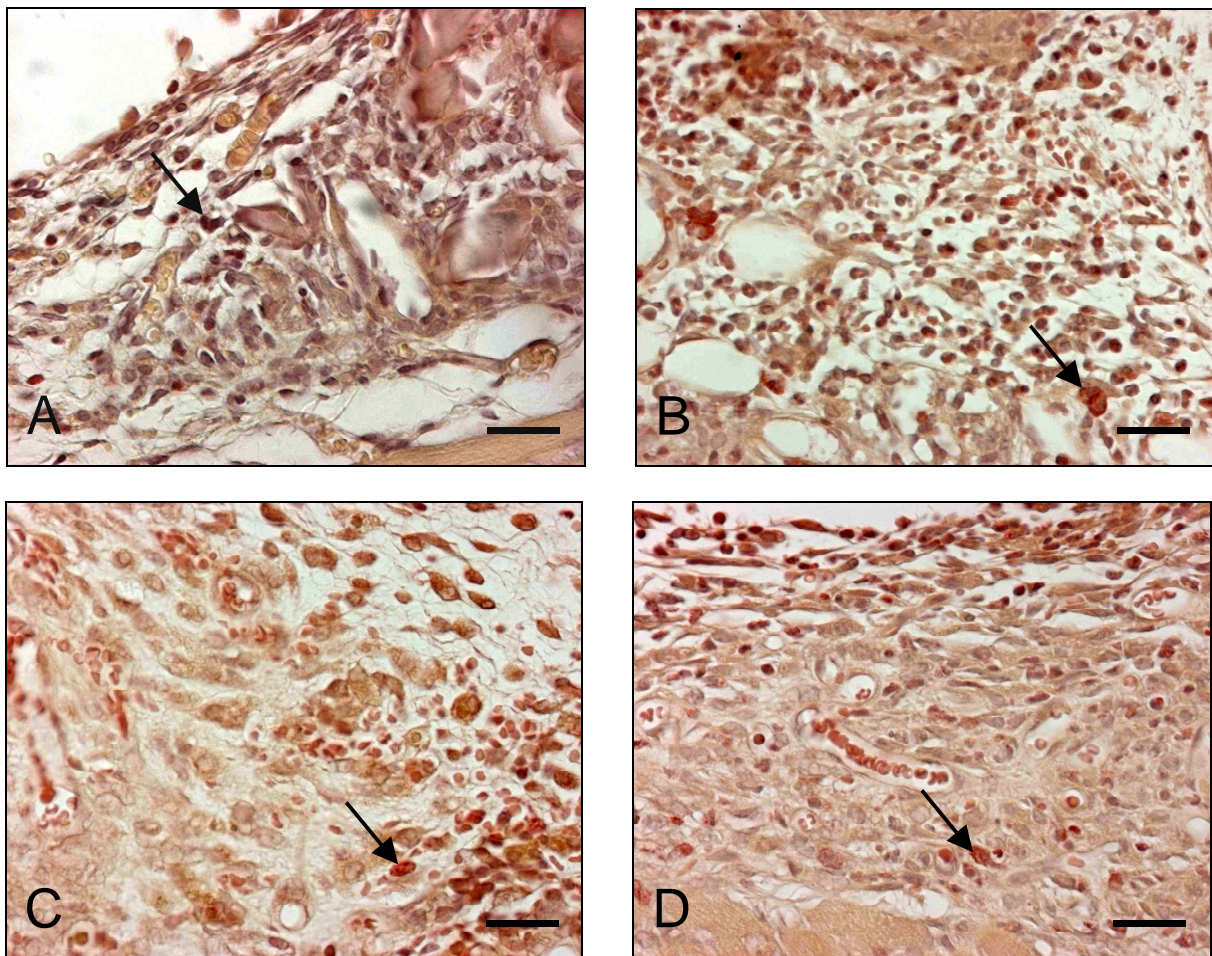


Abbildung 40: Histologische Schnittpräparate von Ostim (A), Cerabone (B), Spongiosa (C) und Silikon (D). Die Leukozyten werden durch die CAE-Färbung als dunkelrote Punkte sichtbar (Pfeile). (CAE-Färbung; Skalierung = 25µm)

6.6. Zusammenfassung der Ergebnisse

Die Ergebnisse zeigen, dass sich alle untersuchten Materialien durch eine gute Biokompatibilität auszeichnen. So zeigte die intravitale Fluoreszenzmikroskopie, dass es zu keiner Steigerung der Leukozytenaktivierung nach Implantation der Knochenersatzstoffe kam. Sowohl die Anzahl rollender wie auch adhärenter Leukozyten blieb während des Beobachtungszeitraums weitgehend konstant.

Die Implantation der verschiedenen Materialien führte nicht zu einer Verschlechterung der Mikrohämodynamik des Hautmuskels. Sämtliche mikrohämodynamischen Parameter (Durchmesser, mikrovaskulärer Blutfluss, Blutzellgeschwindigkeit und Scherrate) zeigten keine relevanten Änderungen nach Implantation der Knochenersatzstoffe.

Die Gefäßpermeabilität stieg in allen untersuchten Gruppen vom Beginn der Untersuchungen bis zum Ende an Tag 14 kontinuierlich an. Da sich keine Zeichen einer ablaufenden Entzündungsreaktion in den einzelnen Gruppen zeigten, ist davon auszugehen, dass dieser Anstieg durch die Bildung neuer Blutgefäße im Granulationsgewebe bedingt war.

In allen Gruppen, in denen ein Material in die Rückenhautkammer implantiert wurde, fand Angiogenese statt. Die stärkste angiogene Reaktion rief die Spongiosa hervor mit signifikant gesteigerten Werten der funktionellen Kapillardichte an den Tagen 10 und 14 nach Implantation. Die synthetischen Knochenersatzstoffe Ostim und Cerabone induzierten ebenfalls die Bildung neuer Blutgefäße. Interessanterweise konnten diese in der Ostim-Gruppe in Resorptionszonen einwachsen und so direkt in das Biomaterial eindringen. Im Gegensatz dazu wurden die Hydroxylapatit-Granula der Cerabone-Gruppe lediglich von Blutgefäßen umwachsen.

7. DISKUSSION

7.1. Diskussion von Material und Methodik

7.1.1. Diskussion des Modells

Das Modell der Rückenhautkammer des Syrischen Goldhamsters wurde seit seiner Erstbeschreibung durch Endrich et al. im Jahr 1980 für zahlreiche Studien zur Analyse der Mikrozirkulation unter physiologischen und pathologischen Bedingungen verwendet. Durch die intravitale Fluoreszenzmikroskopie können in diesem Modell alle Abschnitte der Mikrozirkulation, bestehend aus den terminalen Arteriolen, den nutritiven Kapillaren und den postkapillaren Venolen und Sammelvenolen, dargestellt und analysiert werden. Da das freipräparierte Gewebe durch den Titanrahmen und das Deckglas geschützt ist, weist die Rückenhautkammer auch nach mehreren Tagen in der Regel keine makroskopischen Zeichen einer Entzündung, wie Rötung und Schwellung, des Gewebes auf. Dies konnte auch in der vorliegenden Studie in der Kontrollgruppe ohne Implantate gezeigt werden. Des Weiteren weist die Rückenhautkammer im Zeitverlauf keine mikroskopischen Zeichen einer Entzündung, wie Extravasation von Plasma und korpuskulären Bestandteilen, Leukozytenaktivierung oder Degranulation von Mastzellen auf [Menger et al. 1990]. Zusätzlich sind die in Arteriolen, Kapillaren und Venolen der Rückenhautkammer erhobenen mikrohämodynamischen Parameter vergleichbar mit Daten aus anderen Mikrozirkulationsmodellen [Burton und Johnson, 1972; Endrich et al., 1982].

Durch die Verwendung verschiedener tierexperimenteller Modelle in Kombination mit der intravitalem Fluoreszenzmikroskopie wurde in den letzten Jahrzehnten die quantitative Analyse der Mikrozirkulation möglich. So wurden intravitalmikroskopische Untersuchungen der Mikrozirkulation beispielsweise am Mesenterium [Zweifach, 1973] und Omentum der Katze [Intaglietta et al., 1970], am Kremastermuskel der Ratte [Prewitt und Johnson, 1976] und der Backentasche des Hamsters [Duling, 1973] durchgeführt. Die intravenöse Gabe von Fluoreszenzfarbstoffen ermöglicht die mikrohämodynamische Untersuchung von Organen und Organgeweben wie Herz [Vollmar et al., 1995], Hirn [Wahl et al., 1985], Lunge [Kuebler et al., 1997], Muskel [Menger et al., 1992b] und Knochen [Winet, 1989]. Bei den hierzu verwendeten Modellen handelt es sich meist um Akut-Modelle, welche den Vorteil bieten, dass die Gewebe zur intravitalmikroskopischen Untersuchung leicht zugänglich und illuminierbar sind. Der Nachteil dieser Akut-Modelle ist, dass sie mit einem chirurgischen Trauma einhergehen [Fiebig et al, 1991], was zu einer Beeinflussung mikrohämodynamischer Parameter

wie Gefäßdurchmesser und Blutfluss führen kann [Lindbom et al., 1982; Yamauchi et al., 1999]. Des Weiteren ist die Beobachtungszeit auf wenige Stunden begrenzt, so dass wiederholte Messungen über mehrere Tage nicht möglich sind. So können keine dynamischen Vorgänge, wie z.B. das Wachstum neuer Blutgefäße, kontinuierlich beobachtet werden. Diese Probleme konnten mit der Entwicklung der Rückenhautkammer als chronisches Mikrozirkulationsmodell gelöst werden. Bei diesem Modell wird durch eine Erholungsphase von ca. 48 Stunden nach der Implantation der Kammer der Einfluss des mikrochirurgischen Traumas und der Anästhesie auf ein Minimum reduziert. Anschließend können repetitive Untersuchungen am wachen Versuchstier vorgenommen werden.

Seit den zwanziger Jahren des letzten Jahrhunderts, in denen die erste „transparente Kammer“ am Kaninchenohr [Sandison, 1924; 1928] etabliert wurde, konnte das Kammermodell bezüglich Implantationstechnik und Bildqualität immer weiter verbessert werden. Die früheren Modelle hatten den Nachteil, dass sich damit nur die Ausbildung von Granulationsgewebe mit ausgeprägter Neovaskularisierung im Rahmen eines Wundheilungsprozesses beobachten ließ. Heute ist es möglich, Körpergewebe so zu präparieren, dass das physiologische Gefäßsystem nicht beeinträchtigt wird. Erstmals gelang dies mit der Präparation von subkutanem Gewebe an der Rückenhautfalte von Ratten [Yamura et al., 1971; Papenfuss et al., 1979]. Inzwischen wurde das Modell der Rückenhautkammer für die Ratte [Hobbs et al., 1976], die Maus [Lehr et al., 1993] und den Hamster [Endrich et al., 1980] etabliert.

Die Präparation der Rückenhautkammer am Hamster bietet gegenüber der Maus oder der Ratte den entscheidenden Vorteil, dass sich die zu präparierenden Muskelschichten leichter voneinander lösen lassen, da kaum eine intermuskuläre Gefäßversorgung besteht und somit nur wenige Gewebebrücken zwischen den einzelnen Schichten vorhanden sind. Dadurch lässt sich das mikrochirurgische Trauma des Gewebes während der Präparation auf ein Minimum reduzieren. Darüber hinaus sind die Gewebeschichten der Hamsterpräparation deutlich transluzenter, so dass die intravitalmikroskopischen Bilder von sehr guter Qualität sind.

Zur Untersuchung von Knochenersatzstoffen existieren bereits zahlreiche Tiermodelle. So implantierte man z.B. Ostim bereits in Knochendefekte beim Hausschwein [Kilian et al., 2002a], Knochen-Allografts in die Tibia von Schafen [Lewandrowski et al., 2001], Colla-grafts in die Wirbelsäule von Hunden [Muschler et al., 1996] und PLA/PGA Copolymere in den Oberschenkelknochen von Kaninchen [Rimondini et al., 2005]. Nachteil all dieser Modelle ist, dass man die Implantationsstelle zunächst operativ freilegen muss, um an die Implantate zu gelangen. Da hierfür das Versuchstier meist getötet werden muss, kann das Implantat nur zu einem Zeitpunkt analysiert werden. Alternativ kann die Bewertung der Implantate mit indirekten Bildgebungsverfahren wie Röntgen [Sailer et al., 1999], Computertomographie

(CT) [Knop et al., 2006] oder Magnetresonanztomographie (MRT) [Fischer et al., 2006] erfolgen. Mit diesen Verfahren können jedoch keine mikrozirkulatorischen Parameter wie z.B. die Leukozyten-Endothelzell-Interaktion erfasst werden. Darüber hinaus sind Analysen an größeren Versuchstieren wie Hunden [Nishikawa et al., 2005], Ziegen [Arts et al., 2005] oder Kaninchen [Imaizumi et al., 2006] sehr kostenintensiv und aufwendig in der Durchführung, so dass oftmals nur eine kleine Anzahl an Versuchstieren untersucht werden kann. Das Rückenhautkammermodell bietet dagegen die Möglichkeit, das schützende Deckglas kurzzeitig von der Kammerpräparation zu entfernen, um so auf einfache Weise verschiedene Materialien in die Kammer zu implantieren. Danach ist jederzeit ein freier Zugang zu den Implantaten möglich.

Das Modell der Rückenhautkammer des Syrischen Goldhamsters eignete sich für die Untersuchung der Reaktion des Empfängergewebes auf implantierte Knochenersatzstoffe in besonderem Maße, da hiermit dynamische Prozesse wie Entzündung und Angiogenese im Zeitverlauf darstellbar sind. Hierzu wurden die untersuchten Knochenersatzstoffe nicht direkt in einen Knochendefekt implantiert, sondern auf das Muskelgewebe der Rückenhautkammer gelegt, was einen dauerhaften Zugang zu den Implantaten ermöglichte. Während der letzten Jahren wurde mit Hilfe des Rückenhautkammermodells bereits erfolgreich andere Biomaterialien wie Legierungen für Osteosynthesematerialien [Kraft et al., 2005; Pennekamp et al., 2006], Scaffolds für das Tissue Engineering [Druecke et al., 2004] und chirurgische Netze [Laschke et al., 2005] untersucht.

7.1.2. Diskussion der Untersuchungstechniken

Die intravitale Fluoreszenzmikroskopie wurde im Rahmen der vorliegenden Studie eingesetzt, da sie insbesondere für die wiederholte Untersuchung dynamischer Prozesse, wie z.B. Angiogenese, eine ideale Untersuchungstechnik darstellt [Vajkoczy et al., 2000]. Während andere Verfahren wie beispielsweise die Mikrosphären-Technik [Kingma et al., 2005], die Partialdruckmessung des Gewebesauerstoffes [Conzen et al., 1988, 1991], die Xenon-Clearance-Technik [Oman et al., 2004], die photoelektrische Plethysmographie [Webster und Patterson, 1976], die Thermographie [Saumet et al., 1986], die Laser-Doppler-Flowmetrie [Wellhoner et al., 2006] und Farbstofftechniken [Silverman et al., 1972] nur indirekte Aussagen über die Mikrozirkulation zulassen, können durch die intravitale Fluoreszenzmikroskopie die einzelnen Segmente der Mikrozirkulation (Arteriolen, Kapillaren und Venolen) direkt dargestellt werden [Laschke et al., 2005]. In Kombination mit der Epi-

Illuminationstechnik, die schon seit den siebziger Jahren des letzten Jahrhunderts erfolgreich angewendet wird [Ploem et al., 1974], ist eine direkte Visualisierung auch nicht transilluminierbarer Organe möglich [Ramshesh und Knisley, 2006]. Durch den Einsatz verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe können *in vivo* verschiedene zelluläre und makromolekulare Phänomene analysiert werden. Hierzu zählen das Fließverhalten der Leukozyten und der Thrombozyten [Menger et al., 1992b], Veränderungen der Gefäßpermeabilität [Pries, 1988] und Zellschäden wie Apoptose [Westermann et al., 1999] und Nekrose [Harris et al., 1997]. Aufgrund all dieser Vorteile wurde die intravitale Fluoreszenzmikroskopie in den vergangenen Jahren bereits für zahlreiche Untersuchungen der Mikrozirkulation des Gehirns [Ben Mime et al., 2005], des Pankreas [Obermaier et al., 2002], des Herzens [Sato et al., 2004] und Knochens [Klenke et al., 2005] genutzt. Mit der Einführung dieser Technik und deren Kombination mit Computer-assistierten Bildverarbeitungssystemen [Intaglietta und Tompkins, 1972] ist eine detaillierte quantitative Analyse verschiedener mikrozirkulatorischer Parameter möglich. Die mikroskopischen Bilder können auf Videobändern oder auf DVDs aufgezeichnet werden und nach dem Versuchsende ohne weitere Belastungen für die Versuchstiere ausgewertet werden. Da die intravitalmikroskopischen Aufnahmen dreidimensionale Strukturen, wie z.B. die Gefäßnetzwerke implantierter Knochenersatzstoffe, nur zweidimensional abbilden, muss dies bei der Datenerhebung berücksichtigt werden. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Studie während der Mikroskopie durch alle Ebenen der Implantate durchfokussiert. So konnte ein Eindruck der dreidimensionalen Struktur der neugebildeten Gefäßnetzwerke gewonnen werden. Zusätzlich wurde darauf geachtet, die Knochenersatzstoffe Ostim und Ostim S so dünn wie möglich zu implantieren, um eine Verformung der Stoffe durch die in der Kammer herrschenden Adhäsionskräfte zwischen Kammergewebe und Deckglas zu vermeiden. In den Gruppen mit den festen Materialien Cerabone und Spongiosa wurden ebenfalls Stücke mit geringer Dicke und einer vergleichbaren Oberfläche in die Rückenhautkammer implantiert. Während des Implantationsprozesses der verschiedenen Knochenersatzstoffe wurde darauf geachtet, dass durch den Druck der Implantate auf das Empfängergewebe die Mikrozirkulation in der Kammer nicht beeinträchtigt wurde.

Bei der Untersuchung der Rückenhautkammer mittels intravitale Fluoreszenzmikroskopie muss zusätzlich beachtet werden, dass es zu phototoxischen Effekten kommen kann. Dabei kann die Kammer entweder direkt durch Überwärmung bei langer Einwirkdauer des Lichts oder indirekt durch Anregung der eingesetzten Fluorochrome mit Bildung freier Sauerstoffradikale geschädigt werden [Povlishok et al., 1983; Penning und Dubbelman, 1994]. Mögliche Auswirkungen auf die Mikrozirkulation sind eine gesteigerte Thrombozytenaktivierung [Rosenblum, 1978; Herrmann, 1983], Endothelzellschäden [Reed und Miller, 1988], Vasospasmen [Saetzler et al., 1997], eine Reduktion der funktionellen Kapillardichte

[Friesenecker et al., 1994] sowie eine gesteigerte Leukozyten-Endothelzell-Interaktion [Gawlowski et al., 1989]. Um phototoxische Effekte in der vorliegenden Studie so weit wie möglich zu reduzieren, wurde die Beobachtungszeit auf ca. 15-20 Minuten pro Versuchstier und Untersuchungszeitpunkt beschränkt und die übliche Dosierung der Fluoreszenzfarbstoffe FITC-Dextran und Rhodamin-6G nicht überschritten. Unter diesen Bedingungen werden phototoxische Effekte auf die Mikrozirkulation weitgehend vermieden [Steinbauer et al., 2000].

7.2. Diskussion der Untersuchungsergebnisse

In der vorliegenden Studie wurden verschiedene Materialien in die Rückenhautkammer des Syrischen Goldhamsters implantiert, die als Knochenersatzstoffe dienen können. Anschließend wurde die Biokompatibilität und Vaskularisierung dieser Materialien mit Hilfe der intravitralen Fluoreszenzmikroskopie untersucht.

Eine gute Biokompatibilität ist eine wichtige Voraussetzung für den klinischen Einsatz von Biomaterialien. So wäre es möglich, dass ein Knochenersatzstoff, der eine starke inflammatorische Reaktion induziert, eine adäquate Wundheilung verhindert. Darüber hinaus kann eine inflammatorische Reaktion die Bildung von neuem Knochen, das Einwachsen von Blutgefäßen in das Implantat sowie das physiologische Knochenremodelling negativ beeinflussen [Ehrler und Vaccaro, 2000]. Im schlimmsten Fall kann sogar neugebildeter Knochen wieder osteolytisch abgebaut werden [Ignatius et al., 2001].

Die vorliegende Studie zeigte, dass sich der synthetische Knochenersatzstoff Ostim durch eine sehr gute Biokompatibilität auszeichnet. Während des 14tägigen Untersuchungszeitraums waren nach Implantation von Ostim makroskopisch in der Rückenhautkammer keine Entzündungszeichen wie z.B. Rötung und Ödembildung zu erkennen. Die mikroskopische Analyse verschiedener Entzündungsparameter ergab ebenfalls keinen Hinweis auf eine Entzündungsreaktion, wie z.B. eine gesteigerte Leukozyten-Endothelzell-Interaktion in Venolen des Empfängergewebes. Neben Ostim wurden auch Ostim S, Cerabone, Spongiosa und Silikon bezüglich ihrer Biokompatibilität untersucht. Auch in diesen Gruppen kam es zu keiner gesteigerten Leukozyten-Aktivierung in den Blutgefäßen des Empfängergewebes. Mit Hilfe histologischer Präparate konnte des Weiteren gezeigt werden, dass es auch zu keiner Infiltration der Biomaterialien durch inflammatorische Zellen kam. Die gute Biokompatibilität des untersuchten synthetischen Knochenersatzstoffes Ostim beruht wahrscheinlich auf der Tatsache, dass Ostim aus Hydroxylapatit besteht, welches identisch ist mit der kristallinen Phase des natürlichen Knochens [Posner, 1969; Imaizumi et al., 2006]. Dies gilt auch für

Ostim S und die Hydroxylapatit-Keramik Cerabone, die sehr häufig in der Klinik eingesetzt wird [Uchida et al., 1990; Matsumine et al., 2004]. In der vorliegenden Studie war die Biokompatibilität von Ostim außerdem mit der von Spongiosa vergleichbar. In beiden Gruppen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Leukozytenaktivierung, so dass Ostim eine gute Alternative zum Goldstandard Spongiosa darstellen könnte.

Die gute Biokompatibilität der Spongiosa kann darauf zurückgeführt werden, dass in der vorliegenden Studie die Spender- und Empfängertiere aus Inzuchtstämmen stammen, so dass es nicht zu einer Abstoßungsreaktion kommen konnte [Handler und Cosman, 1974]. Zusätzlich zeichnet sich die Spongiosa durch besondere immunogene Eigenschaften aus, die eine inflammatorische Reaktion des Empfängergewebes verhindern. So sind in der frisch isolierten Spongiosa unter anderem Zytokine enthalten, die einen unmittelbaren immunsuppressiven Effekt auf das Empfängergewebe der Rückenhautkammer ausüben können [Robey et al., 1993].

Das implantierte Silikon wies ebenfalls eine gute Biokompatibilität auf, was bestätigt, dass Silikon in der Medizin häufig als bioinertes Material eingesetzt wird. So eignet sich Silikon beispielsweise auch für die Implantation ins Auge [Mackiewicz et al., 2007].

Interessanterweise stieg in allen untersuchten Gruppen die makromolekulare Gefäßpermeabilität trotz ausbleibender Entzündungsreaktion über den Beobachtungszeitraum kontinuierlich an. Aus anderen Studien ist bekannt, dass durch eine Entzündungsreaktion mit leukozytärer Aktivierung und Gewebeeinfiltration die makromolekulare Gefäßpermeabilität ansteigen kann [Costa et al., 2007]. Diese ändert sich allerdings nicht nur im Rahmen einer Entzündungsreaktion des Empfängergewebes, sondern auch bei stattfindender Angiogenese. Hierbei spielt der Wachstumsfaktor VEGF eine wichtige Rolle, da dieser neben einer vermehrten Proliferation von Endothelzellen auch eine Erhöhung der vaskulären Permeabilität induziert [Stacker et al., 1999]. Während des Prozesses der Angiogenese wird die Basalmembran der Mikrogefäße zeitweise abgebaut, so dass die Endothelzellen aber auch andere Blutbestandteile und Moleküle wie FITC-Dextran in das umliegende Gewebe gelangen können [Carmeliet, 2000]. Entsprechend ging die Zunahme der makromolekularen Gefäßpermeabilität mit einer Zunahme der funktionellen Kapillardichte einher. Die höchsten Werte der makromolekularen Gefäßpermeabilität wurden in der Spongiosa-Gruppe erreicht, in der auch die stärkste angiogene Reaktion des Empfängergewebes stattfand.

Die Mechanismen, die zur Entstehung neuer Blutgefäße führen, sind bis heute noch nicht vollständig aufgeklärt, sodass in der Literatur verschiedene Theorien diskutiert werden. Eine Theorie ist, dass es bei der Angiogenese zu einer Endothelzellproliferation kommt, wobei Zellfortsätze in das umliegende Gewebe einsprossen, aus denen sich durch Vakuolisierung neue Gefäßlumina bilden können [Ausprunck und Folkman, 1976; Tsuzuki

und Sasa, 1994]. Ein anderer diskutierter Mechanismus wurde in der Lunge beschrieben, wo sich die gegenüberliegenden Wände einer Kapillare einstülpen, bis ihre Endothelzellen sich berühren, dann teilen und so neue Tochterkapillaren ausbilden [Burri und Tarek, 1990]. Weiterhin konnten die Migration von proliferierenden Endothelzellen [Sholley et al., 1984] sowie eine Längsteilung schon vorhandener Kapillaren [Frontczak-Baniewicz und Walski, 2002] als Angiogenese-Mechanismen beobachtet werden. Daneben wird den Perizyten, die sich an den Außenwänden der Kapillaren und postkapillaren Venolen anlagern, neben ihrer Fähigkeit zur Blutflussregulation durch Zellkontraktion auch eine wichtige regulatorische Funktion im Rahmen der Angiogenese zugeschrieben [Lee et al., 2007; Hall, 2006; Hirschi und D'Amore, 1997]. Die Angiogenese wird durch eine Vielzahl von Faktoren gesteuert [Milkiewicz et al., 2006]. Zu diesen Faktoren gehören körpereigene Stimulatoren der Angiogenese wie Fibroblast Growth Factors (FGFs) [Zhao et al., 2007], Vaskular Endothelial Growth Factors (VEGF A-D) [Yla-Herttuala et al., 2007], Angiopoietin [Nguyen et al., 2007] sowie Inhibitoren wie Thrombospondin [Daniel et al., 2007], Interferon [Avnet et al., 2007] und Endostatin [Lai et al., 2007]. Unter physiologischen Bedingungen befinden sich diese Faktoren im Gleichgewicht, sodass keine neuen Blutgefäße gebildet werden [Beeken und Shing, 2000]. Aktiviert wird die Angiogenese z.B. im Rahmen der Wund- und Knochenheilung durch das Überwiegen der pro-angiogenen Faktoren.

In der vorliegenden Studie wurde die Angiogenese nach Implantation der verschiedenen Knochenersatzstoffe analysiert. Ein vaskuläres Netzwerk und eine ausreichende Blutversorgung sind essentielle Voraussetzungen für Knochenwachstum und Frakturheilung [Matsumoto et al., 2006]. Der physiologische Knochenstoffwechsel wird entscheidend durch das Gefäßsystem in den Havers-Kanälen des Knochens reguliert, in dem unter physiologischen Bedingungen keine Angiogenese stattfindet [Coutelier, 1976]. Bei der Knochenregeneration hingegen ist der Knochenstoffwechsel gesteigert [Li et al., 2006], was mit einem vermehrten Substratverbrauch der Zellen einhergeht. Um den neugebildeten Knochen ausreichend mit Nährstoffen zu versorgen, werden unter diesen Bedingungen Mediatoren ausgeschüttet, die ein Gefäßwachstum induzieren. Entsprechend ermöglicht auch die Vaskularisierung implantierter Knochenersatzstoffe das Einwachsen von Knochenzellen und die Differenzierung von pluripotenten Stammzellen des umliegenden Gewebes zu Osteoblasten und Osteozyten [Cypher und Grossman, 1996; Moore et al., 2001]. In der autolog transplantierten Spongiosa sind diese Zellen bereits enthalten, sodass diese ein hohes osteogenes Potential besitzt [Bloemers et al., 2003].

Eine überschießende Bildung von vaskularisiertem Granulationsgewebe in einem aufgefüllten Knochendefekt könnte allerdings auch einen negativen Effekt auf die Knochen-

heilung haben. So wird diskutiert, dass fibröses Gewebe eine schnellere Expansionsgeschwindigkeit aufweist als Knochen [Ogiso et al., 1994]. Sicher ist jedoch, dass bei der Knochenregeneration neugebildete Blutgefäße eine wichtige Rolle spielen, da die Endothelzellen die Differenzierung von Prä-Osteoblasten zu Osteoblasten durch die Expression von sogenannten osteotropen Wachstumsfaktoren wie Endothelin-1 und IGF-1 stimulieren [Rubanyi und Polokoff, 1994]. Umgekehrt fördert die Expression von VEGF durch Osteoblasten wiederum die Proliferation von Endothelzellen und somit die Bildung neuer Blutgefäße [Deckers et al., 2000]. Knochenersatzstoffe müssen daher bei ihrer Anwendung *in vivo* in ein gut vaskularisiertes Knochenlager implantiert werden, um eine adäquate Inkorporation zu gewährleisten [Kneser et al., 2006].

In der vorliegenden Studie wurde mittels der intravitralen Fluoreszenzmikroskopie *in vivo* nachgewiesen, dass die Vaskularisierung der untersuchten Knochenersatzstoffe am dritten Tag nach Implantation in die Rückenhautkammer einsetzte und bis zum Ende der Untersuchungen an Tag 14 zur Ausbildung eines dichten Gefäßnetzwerkes von neuen Kapillaren führte. Die Revaskularisierung der Knochenersatzstoffe erfolgte dabei vom Rand der Implantate aus, ähnlich wie z.B. bei transplantierten ovariellen Follikeln, bei denen die Entstehung glomerulumartiger Kapillarnetzwerke beobachtet werden kann [Laschke et al., 2002].

Anhand der erhobenen Daten kann darauf geschlossen werden, dass die Revaskularisierung der Implantate an Tag 14 noch nicht abgeschlossen war. Dies zeigte sich in allen Gruppen an der kontinuierlichen Zunahme der funktionellen Kapillardichte. Auch gegen Ende der Untersuchungen stagnierte das Gefäßwachstum nicht, wie dies z.B. bei transplantierten Langerhans'schen Inseln der Fall ist, bei denen sich die funktionelle Kapillardichte ab dem zehnten Tag nach Transplantation in die Rückenhautkammer nicht mehr substantiell verändert [Menger et al., 1989a; Schramm et al., 2002].

Das in die Rückenhautkammer implantierte Ostim vaskularisiert sehr gut im Beobachtungszeitraum von 14 Tagen. Beim Vergleich der Gruppen Ostim mit Ostim großer Implantatabstand und Ostim kleiner Implantatabstand zeigte sich, dass die Implantate mit kleinerem Abstand in ihrem Zentrum schneller vaskularisieren. Entsprechend muss bei klinischer Anwendung von Ostim berücksichtigt werden, dass die Vaskularisierungsgeschwindigkeit des verwendeten Materials entscheidend von der eingesetzten Materialgröße abhängig ist.

Interessanterweise unterschied sich das stöchiometrisch hergestellte Ostim S in keinem der untersuchten Parameter von Ostim. Ostim S ist somit als genauso biokompatibel und angiogen wie Ostim anzusehen. Da das Herstellungsverfahren von Ostim S im Vergleich

zu konventionell hergestelltem Ostim mehrere Vorteile bietet, sollte daher zukünftig Ostim S im klinischen Einsatz bevorzugt werden.

Die frisch isolierte autologe Spongiosa rief in der Rückenhautkammer die stärkste angiogene Reaktion hervor, was sich durch eine signifikant gesteigerte funktionelle Kapillardichte der neuen Gefäßnetzwerke zeigte. Diese Beobachtung beruht am ehesten auf der Tatsache, dass in der frisch isolierten Spongiosa noch vitales Knochenmark enthalten ist. Das Knochenmark besitzt eine hohe Regenerationsfähigkeit, da es Stammzellen und endotheliale Progenitorzellen sowie verschiedene Wachstumsfaktoren enthält, welche die Entwicklung neuer Blutgefäße stimulieren und unterstützen [Engstrand, 2003; Zwaginga und Doevendans, 2003]. Ein weiterer Mechanismus der in der vorliegenden Studie zur gesteigerten Angiogenese der Spongiosa beitragen könnte, ist die Freisetzung von Hypoxie-induzierten Angiogenesefaktoren. Dies könnte gerade in den ersten Untersuchungstagen nach Transplantation ein wichtiger Stimulus zur Initiierung der Blutgefäßbildung sein [Koos und Olson, 1991; Neeman et al., 1997].

Der Vergleich der Hydroxylapatit-Paste Ostim mit der Hydroxylapatit-Keramik Cerabone zeigte, dass beide synthetischen Knochenersatzstoffe eine ähnliche angiogene Reaktion des Empfängergewebes hervorriefen. Ein wichtiger Vorteil von Ostim zeigte sich allerdings bei der histologischen Aufarbeitung der Präparate an Tag 14 nach Implantation. Im Gegensatz zu Cerabone konnten bei Ostim Areale nachgewiesen werden, in denen das Material bereits resorbiert wurde. In diesen Arealen konnte vaskularisiertes Granulationsgewebe direkt in das Biomaterial einwachsen. Diese gerichtete Vaskularisierung könnte die Regeneration von Knochendefekten verbessern. Dabei könnten die noch nicht resorbierten Teile des Materials als Gerüst und Leitschiene für einwandernde Zellen dienen [Laschke et al., 2006]. Bei Cerabone hingegen konnten sich nur in den Poren des Materials neue Blutgefäße bilden. Eine Resorption von Cerabone konnte nicht beobachtet werden.

Silikon wurde als ein bioinert geltendes Material in die Rückenhautkammer implantiert. Bioinert bedeutet prinzipiell, dass es zu keiner chemisch oder biologischen Wechselwirkung zwischen Implantat und Gewebe kommt und keine toxischen Substanzen freigesetzt werden. Der Körper reagiert auf solche Materialien meist mit der Ausbildung einer nicht adhärenten (verwachsenen) Bindegewebskapselung um das Implantat. In der Rückenhautkammer induzierte das Silikon eine angiogene Reaktion des Empfängergewebes, die v.a. im Randbereich der Implantate stattfand und vergleichbar war mit der Reaktion auf die anderen implantierten Materialien. Allerdings konnten die neuen Blutgefäße nicht in das Implantat eindringen, wie dies z.B. bei Ostim der Fall war. Entsprechend waren die Werte der funktionellen Kapillardichte und der Angiogenese-positiven Felder hier signifikant reduziert. Da Sili-

kon keine poröse Struktur besitzt, war in diesem Fall kein Leitschieneneffekt für das Gefäßwachstum zu beobachten [Mittelmeier et al., 1998].

Somit konnte in der vorliegenden Studie gezeigt werden, dass Knochenersatzstoffe eine poröse Struktur aufweisen sollten, damit neue Blutgefäße in die Materialien einwachsen können. Dabei ist die Angiogenese eine wichtige Voraussetzung für die Osteokonduktion und das Knochenwachstum [Daculsi und Passuti, 1990; van Blitterswijk et al., 1986].

Neben einer guten Vaskularisierung sollten synthetische Knochenersatzstoffe auch sicherstellen, dass nach ihrer Implantation wieder neuer Knochen gebildet werden kann. Der optimale Knochenersatzstoff sollte daher, wie dies bei Ostim der Fall ist, im Rahmen des physiologischen Knochen-Turnovers mit der Zeit komplett resorbiert und durch vitalen Knochen ersetzt werden [Rubanyi und Polokoff, 1994]. Defekte, die mit komplett resorbierbaren Materialien gefüllt wurden, erreichten nach einiger Zeit die gleiche Stabilität wie der ursprüngliche natürliche Knochen [Gauthier et al., 2003]. Bei der Implantation von nicht oder nur teilweise resorbierbaren Materialien wie der Hydroxylapatit-Keramik Cerabone zeigte sich dagegen in anderen Studien längerfristig eine geringere mechanische Stabilität des neuen Knochens [Bloemers et al., 2003].

Bei jeder Gruppe wurden in vier repräsentativen Venolen im Randbereich der Implantate verschiedene Parameter der Mikrozirkulation erhoben. Bei der späteren Auswertung dieser Parameter zeigte sich, dass kaum signifikante Unterschiede beim Gefäßdurchmesser, der Blutzellgeschwindigkeit, der Scherrate und dem mikrovaskulären Blutfluss bestanden. Dies ist für die anschließende Beurteilung der Entzündungsparameter von entscheidender Bedeutung. Es konnte somit gezeigt werden, dass die untersuchten Venolen repräsentativ und miteinander gut vergleichbar waren.

Beim Vergleich der leeren Rückenhautkammern mit den Kammern in welchen die verschiedenen Knochenersatzstoffe implantiert wurden, zeigten sich keine signifikanten Unterschiede der mikrozirkulatorischen Parameter. So konnte ein negativer Effekt der implantierten Materialien auf die Durchblutung des Empfängergewebes ausgeschlossen werden. Sollten feste Stoffe wie die Hydroxylapatit-Keramik Cerabone einen zu starken Druck auf das Empfängergewebe ausüben, könnte es zu einer Beeinträchtigung der kapillaren Perfusion und infolgedessen zu Nekrosen kommen. Eine Verschlechterung der Versorgung mit oxygeniertem Blut und Nährstoffen könnte außerdem die Angiogenese beeinträchtigen [Lu et al., 2007]. In allen Gruppen in dieser Studie, war die Perfusion der Gefäße während des gesamten Untersuchungszeitraums konstant gut. Somit konnte gezeigt werden, dass Ostim, Ostim S, Cerabone, Spongiosa und Silikon keinen negativen Einfluss auf die Blutversorgung des Empfängergewebes ausüben.

7.3. Schlussfolgerungen

In der vorliegenden experimentellen Studie konnte die nanokristalline Hydroxylapatit-Paste Ostim unter Berücksichtigung morphologischer, hämodynamischer und zellulärer Kriterien systematisch *in vivo* analysiert werden. Auf diese Weise war es möglich, neue Erkenntnisse zur Vaskularisierung und Biokompatibilität dieses Knochenersatzstoffes während der ersten vierzehn Tage nach Implantation zu erhalten. Es konnte gezeigt werden, dass sich Ostim durch eine gute Biokompatibilität auszeichnet, vergleichbar mit autolog transplantierte Spongiosa. Zwar induzierte die Spongiosa eine stärkere angiogene Reaktion im Empfänger-gewebe, Ostim bietet jedoch den wichtigen Vorteil, dass es unbegrenzt verfügbar ist und nicht wie Spongiosa in einer Operation gewonnen werden muss.

Im Vergleich zu der Hydroxylapatit-Keramik Cerabone zeigte Ostim eine entsprechende Biokompatibilität und Vaskularisierung. Allerdings ist Ostim durch seine pastöse Konsistenz und der Darreichungsform in einer gebrauchsfertigen Kartusche im klinischen Gebrauch wesentlich besser handzuhaben. Darüber hinaus kann Ostim komplett resorbiert werden, so dass Knochendefekte mit der Zeit vollständig durch neuen Knochen aufgefüllt werden und so die ursprüngliche Stabilität des Knochens wieder erreicht werden kann.

Desweiteren wurde in dieser Studie gezeigt, dass das stöchiometrische Herstellungsverfahren von Ostim keinen Einfluss auf die Gewebeverträglichkeit oder die Inkorporation des Materials in das Empfängergewebe hat. Stöchiometrisch hergestelltes Ostim ist daher bezüglich der Biokompatibilität und der angiogenen Reaktion als identisch gut wie das konventionell hergestellte Ostim zu bewerten.

7.4. Klinische Perspektiven

Zur Zeit gilt die Transplantation autologer Spongiosa als Goldstandard in der Rekonstruktion von Knochendefekten. Da jedoch die operative Entnahme der Spongiosa viele Risiken birgt, ist die Entwicklung synthetischer Knochenersatzstoffe Gegenstand intensiver Forschung. Die neu entwickelten Knochenersatzstoffe sollten möglichst osteokonduktiv, osteoinduktiv und osteogen sein. Daneben sollten sie eine Struktur aufweisen, die das Einwachsen neuer Zellen ermöglicht.

In den vergangenen Jahren wurden bereits viele Wachstumsfaktoren, die beim physiologischen Knochenstoffwechsel eine Rolle spielen, identifiziert und deren Funktion entschlüsselt [Karsenty, 2001]. Auch für die Angiogenese konnten Stimulatoren und Inhibitoren identifiziert und synthetisiert werden, die heute bereits zur pro- und antiangiogenen Therapie,

z.B. in der Behandlung von Tumoren zur Verfügung stehen [Hasan et al., 2004]. In Zukunft könnte der Einsatz dieser Wachstumsfaktoren in Kombination mit synthetischen Knochenersatzstoffen zu einer verbesserten Knochenrekonstruktion führen. So wurde in ersten Studien bereits Hydroxylapatit als Trägersubstanz mit BMP-2 beschichtet [Mukherjee et al., 2003]. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die Knochenheilung im Vergleich zur Gruppe mit Implantat ohne BMP-2 beschleunigt war. Auch die in der vorliegenden Studie verwendete Hydroxylapatit-Paste Ostim kann mit Wachstumsfaktoren angereichert werden [Kilian et al., 2002a], was zu einer beschleunigten Knochenregeneration führt [Kilian et al., 2002b]. So könnten in Zukunft die synthetischen Knochenersatzstoffe ähnlich gute Ergebnisse wie autolog transplantierte Spongiosa aufweisen und diese als Goldstandard zur Füllung von Knochendefekten ersetzen.

8. LITERATURVERZEICHNIS

1. **Adamsbaum C, Kalifa G, Seringe R, Dubousset J:** Direct Ethibloc injection in benign bone cysts: preliminary report on four patients. *Skeletal Radiol.* 22: 317-320, 1993
2. **Aho AJ, Tirri T, Kukkonen J, Strandberg N, Rich J, Seppala J, Yli-Urpo A:** Injectable bioactive glass/biodegradable polymer composite for bone and cartilage reconstruction: concept and experimental outcome with thermoplastic composites of poly(epsilon-caprolactone-co-D,L-lactide) and bioactive glass S53P4. *J Mater Sci Mater Med.* 15: 1165-1173, 2004
3. **Arrington ED, Smith WJ, Chambers HG, Bucknell AL, Davino NA:** Complications of iliac crest bone graft harvesting. *Clin Orthop Relat Res.* 329: 300-309, 1996
4. **Arts JJ, Gardeniers JW, Welten ML, Verdonschot N, Schreurs BW, Buma P:** No negative effects of bone impaction grafting with bone and ceramic mixtures. *Clin Orthop Relat Res.* 438: 239-247, 2005
5. **Ausprunk DH, Folkman J:** Vascular injury in transplanted tissues. Fine structural changes in tumor, adult, and embryonic blood vessels. *Virchows Arch B Cell Pathol.* 1: 31-44, 1976
6. **Avnet S, Cenni E, Perut F, Granchi D, Brandi ML, Giunti A, Baldini N:** Interferon-alpha inhibits in vitro osteoclast differentiation and renal cell carcinoma-induced angiogenesis. *Int J Oncol.* 30: 469-476, 2007
7. **Baker M, Wayland H:** On-line volume flow rate and velocity profile measurement for blood in microvessels. *Microvasc Res.* 7: 131-143, 1974
8. **Banwart JC, Asher MA, Hassanein RS:** Iliac crest bone graft harvest donor site morbidity. A statistical evaluation. *Spine.* 20: 1055-1060, 1995
9. **Beeken WD, Shing Y:** Tumorangio-genese und Antiangiogenesetherapie maligner Tumoren. *J Urol Urogynäkol.* 3: 7-14, 2000
10. **Ben Mime L, Arnhold S, Fischer JH, Addicks K, Rainer de Vivie E, Bennink G, Suedkamp M:** Pharmacologic cerebral capillary blood flow improvement after deep hypothermic circulatory arrest: an intravital fluorescence microscopy study in pigs. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 130: 670-676, 2005

11. **Bloemers FW, Blokhuis TJ, Patka P, Bakker FC, Wippermann BW, Haarman HJ:** Autologous bone versus calcium-phosphate ceramics in treatment of experimental bone defects. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 66: 526-531, 2003
12. **Bolander ME:** Regulation of fracture repair by growth factors. *Proc Soc Exp Biol Med.* 200: 165-170, 1992
13. **Boyce T, Edwards J, Scarborough N:** Allograft bone. The influence of processing on safety and performance. *Orthop Clin North Am.* 30: 571-581, 1999
14. **Bucholz RW, Carlton A, Holmes RE:** Hydroxyapatite and tricalcium phosphate bone graft substitutes. *Orthop Clin North Am.* 18: 323-334, 1987
15. **Buckwalter JA, Glimcher MJ, Cooper RR, Recker R:** Bone biology. I: Structure, blood supply, cells, matrix, and mineralization. *Instr Course Lect.* 45: 371-386, 1996a
16. **Buckwalter JA, Glimcher MJ, Cooper RR, Recker R:** Bone biology. II: Formation, form, modeling, remodeling, and regulation of cell function. *Instr Course Lect.* 45: 387-399, 1996b
17. **Burri PH, Tarek MR:** A novel mechanism of capillary growth in the rat pulmonary microcirculation. *Anat Rec.* 228: 35-45, 1990
18. **Burton KS, Johnson PC:** Reactive hyperemia in individual capillaries of skeletal muscle. *Am J Physiol.* 223: 517-524, 1972
19. **Cameron HU, Macnab I, Pilliar RM:** Evaluation of biodegradable ceramic. *J Biomed Mater Res.* 11: 179-186, 1977
20. **Carmeliet P:** Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med.* 6: 389-95, 2000
21. **Chan C, Thompson I, Robinson P, Wilson J, Hench L:** Evaluation of Bioglass/dextran composite as a bone graft substitute. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 31: 73-77, 2002
22. **Conzen PF, Hobbhahn J, Goetz AE, Habazettl H, Granetzny T, Peter K, Brendel W:** Splanchnic oxygen consumption and hepatic surface oxygen tensions during isoflurane anesthesia. *Anesthesiology.* 69: 643-651, 1988
23. **Conzen PF, Habazettl H, Christ M, Baier H, Hobbhahn J, Vollmar B, Peter K:** Left ventricular surface tissue oxygen pressures determined by oxygen sensitive multiwire electrodes in pigs. *Cardiovasc Res.* 25: 207-216, 1991

24. **Costa C, Incio J, Soares R:** Angiogenesis and chronic inflammation: cause or consequence? *Angiogenesis*. 10: 149-166, 2007
25. **Coutelier L:** The internal remodeling of compact bone in children. *Bull Assoc Anat (Nancy)*. 60: 95-110, 1976
26. **Cypher TJ, Grossman JP:** Biological principles of bone graft healing. *J Foot Ankle Surg*. 35: 413-417, 1996
27. **Daculsi G, Passuti N:** Effect of the macroporosity for osseous substitution of calcium phosphate ceramics. *Biomaterials*. 11: 86-87, 1990
28. **Daniel C, Amann K, Hohenstein B, Bornstein P, Hugo C:** Thrombospondin 2 functions as an endogenous regulator of angiogenesis and inflammation in experimental glomerulonephritis in mice. *J Am Soc Nephrol*. 18: 788-798, 2007
29. **Deckers MM, Karperien M, van der Bent C, Yamashita T, Papapoulos SE, Lowik CW:** Expression of vascular endothelial growth factors and their receptors during osteoblast differentiation. *Endocrinology*. 141: 1667-1674, 2000
30. **Deetjen P, Speckman E, (eds):** Physiologie. *Urban&Fischer, München*. 3.ed: 149-155, 1999
31. **Druecke D, Langer S, Lamme E, Pieper J, Ugarkovic M, Steinau HU, Homann HH:** Neovascularization of poly(ether ester) block-copolymer scaffolds in vivo: long-term investigations using intravital fluorescent microscopy. *J Biomed Mater Res A*. 68: 10-18, 2004
32. **Duling BR:** The preparation and use of the hamster cheek pouch for studies of the microcirculation. *Microvasc Res*. 5: 423-429, 1973
33. **Ebraheim NA, Elgafy H, Xu R:** Bone-graft harvesting from iliac and fibular donor sites: techniques and complications. *J Am Acad Orthop Surg*. 9: 210-218, 2001
34. **Ehrler DM, Vaccaro AR:** The use of allograft bone in lumbar spine surgery. *Clin Orthop Relat Res*. 371: 38-45, 2000
35. **Endrich B, Asaishi K, Gotz A, Messmer K:** Technical report - a new chamber technique for microvascular studies in unanesthetized hamsters. *Res Exp Med (Berl)*. 177: 125-134, 1980

36. **Endrich B, Hammersen F, Gotz A, Messmer K:** Microcirculatory blood flow, capillary morphology and local oxygen pressure of the hamster amelanotic melanoma A-Mel-3. *J Natl Cancer Inst.* 68: 475-485, 1982
37. **Engstrand T:** Molecular biologic aspects of cartilage and bone: potential clinical applications. *Ups J Med Sci.* 108: 25-35, 2003
38. **Fiebig E, Ley K, Arfors KE:** Rapid leukocyte accumulation by "spontaneous" rolling and adhesion in the exteriorized rabbit mesentery. *Int J Microcirc Clin Exp.* 10: 127-144, 1991
39. **Fischer M, Koller U, Krismer M:** The use of fresh allografts in osteochondrosis dissecans of the lateral femoral condyle. *Oper Orthop Traumatol.* 18: 245-258, 2006
40. **Foitzick T, Funk W, Roth H, Messmer K:** Splenic implants: influence of particle size and fibrin fixation on vaskularization and angioarchitecture. *Pediatr Surg Int.* 4: 263-268, 1988
41. **Friesenecker B, Tsai AG, Instaglietta M:** Capillary perfusion during ischemia-reperfusion in subcutaneous connective tissue and skin muscle. *Am J Physiol.* 267: 2204-2212, 1994
42. **Frontczak-Baniewicz M, Walski M:** Non-sprouting angiogenesis in neurohypophysis after traumatic injury of the cerebral cortex. Electron-microscopic studies. *Neuro Endocrinol Lett.* 23: 396-404, 2002
43. **Funk W, Endrich B, Messmer K:** A novel method for follow-up studies of the microcirculation in non-malignant tissue implants. *Res Exp Med (Berl).* 186: 259-270, 1986
44. **Gauthier O, Khairoun I, Bosco J, Obadia L, Bourges X, Rau C, Magne D, Bouler JM, Aguado E, Daculsi G, Weiss P:** Noninvasive bone replacement with a new injectable calcium phosphate biomaterial. *J Biomed Mater Res A.* 66: 47-54, 2003
45. **Gawlowski DM, Harding NR, Granger HJ:** Leukocyte phagocytosis and alterations in microvascular integrity elicited by FITC-dextran 150 and epi-illumination in the microcirculation of the hamster cheek pouch. *Microvasc Res.* 37: 1-15, 1989
46. **Gazdag AR, Lane JM, Glaser D, Forster RA:** Alternatives to Autogenous Bone Graft: Efficacy and Indications. *J Am Acad Orthop Surg.* 3: 1-8, 1995
47. **Giannoudis PV, Dinopoulos H, Tsiridis E:** Bone substitutes: an update. *Injury.* 3: 20-27, 2005

48. **Greenwald AS, Boden SD, Goldberg VM, Khan Y, Laurencin CT, Rosier RN:** Bone-graft substitutes: facts, fictions, and applications. *J Bone Joint Surg Am.* 2: 98-103, 2001
49. **Grimandi G, Weiss P, Millot F, Daculsi G:** In vitro evaluation of a new injectable calcium phosphate material. *J Biomed Mater Res.* 39: 660-666, 1998
50. **Hall AP:** Review of the pericyte during angiogenesis and its role in cancer and diabetic retinopathy. *Toxicol Pathol.* 34: 763-775, 2006
51. **Handler AH, Cosman EB:** Skin allograft exchanges among inbred strains of hamsters. *Life Sci.* 14: 1455-1462, 1974
52. **Harris AG, Steinbauer M, Leiderer R, Messmer K:** Role of leukocyte plugging and edema in skeletal muscle ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol.* 273: 989-996, 1997
53. **Hasan J, Shnyder SD, Bibby M, Double JA, Bicknel R, Jayson GC:** Quantitative angiogenesis assays in vivo - a review. *Angiogenesis.* 7: 1-16, 2004
54. **Herrmann KS:** Platelet aggregation induced in the hamster cheek pouch by a photochemical process with excited fluorescein isothiocyanate-dextran. *Microvasc Res.* 26: 238-249, 1983
55. **Hirschi KK, D'Amore PA:** Control of angiogenesis by the pericyte: molecular mechanisms and significance. *EXS.* 79: 419-428, 1997
56. **Hobbs JB, Chusilp S, Hua A, Kincaid-Smith P, McIver MA:** The pathogenesis of hypertensive vascular changes in the rat: microscopic and ultrastructural correlation in vivo. *Clin Sci Mol Med Suppl.* 3: 73-75, 1976
57. **Huber FX, Belyaev O, Hillmeier J, Kock HJ, Huber C, Meeder PJ, Berger I:** First histological observations on the incorporation of a novel nanocrystalline hydroxyapatite paste OSTIM in human cancellous bone. *BMC Musculoskelet Disord.* 7: 50, 2006
58. **Huber FX, Berger I, McArthur N, Huber C, Kock HP, Hillmeier J, Meeder PJ:** Evaluation of a novel nanocrystalline hydroxyapatite paste and a solid hydroxyapatite ceramic for the treatment of critical size bone defects (CSD) in rabbits. *J Mater Sci Mater Med.* In Druck, 2007

59. **Ignatius AA, Betz O, Augat P, Claes LE:** In vivo investigations on composites made of resorbable ceramics and poly(lactide) used as bone graft substitutes. *J Biomed Mater Res.* 58: 701-709, 2001
60. **Imaizumi H, Sakurai M, Kashimoto O, Kikawa T, Suzuki O:** Comparative study on osteoconductivity by synthetic octacalcium phosphate and sintered hydroxyapatite in rabbit bone marrow. *Calcif Tissue Int.* 78: 45-54, 2006
61. **Intaglietta M, Tompkins WR, Richardson DR:** Velocity measurements in the microvasculature of the cat omentum by on-line method. *Microvasc Res.* 2: 462-473, 1970
62. **Intaglietta M, Tompkins WR:** On-line measurement of microvascular dimensions by television microscopy. *J Appl Physiol.* 32: 546-551, 1972
63. **Kaemmerlen P, Thiesse P, Jonas P, Berard CL, Duquesnel J, Bascoulergue Y, Lapras C:** Percutaneous injection of orthopedic cement in metastatic vertebral lesions. *N Engl J Med.* 321: 121, 1989
64. **Karsenty G:** Minireview: transcriptional control of osteoblast differentiation. *Endocrinology.* 142: 2731-2733, 2001
65. **Kilian O, Wenisch S, Heiss C, Horas U, Dingeldein E, Schnettler R:** Ostim-Einfluss kombiniert mit autologen thrombozytären Wachstumsfaktoren auf die Knochendefektheilung in vivo. *Biomaterialien* 3/4: 126-132, 2002a
66. **Kilian O, Wenisch S, Heiss C, Horas U, Dingeldein E, Schnettler R:** Einfluss von Ostim kombiniert mit autologen thrombozytären Wachstumsfaktoren. *Biomaterialien* 3/2: 70-73, 2002b
67. **Kingma JG Jr, Simard D, Rouleau JR:** Comparison of neutron activated and radiolabeled microsphere methods for measurement of transmural myocardial blood flow in dogs. *J Thromb Thrombolysis.* 19: 201-208, 2005
68. **Klenke FM, Merkle T, Fellenberg J, Abdollahi A, Huber PE, Gebhard MM, Ewerbeck V, Sckell A:** A novel model for the investigation of orthotopically growing primary and secondary bone tumours using intravital microscopy. *Lab Anim.* 39: 377-383, 2005
69. **Klyszcz T, Junger M, Jung F, Zeintl H:** Cap image - a new kind of computer-assisted video image analysis system for dynamic capillary microscopy. *Biomed Tech (Berl).* 42: 168-175, 1997

70. **Kneser U, Schaefer DJ, Polykandriotis E, Horch RE:** Tissue engineering of bone: the reconstructive surgeon's point of view. *J Cell Mol Med.* 10: 7-19, 2006
71. **Knop C, Sitte I, Canto F, Reinhold M, Blauth M:** Successful posterior interlaminar fusion at the thoracic spine by sole use of beta-tricalcium phosphate. *Arch Orthop Trauma Surg.* 3: 204-210, 2006
72. **Koos RD, Olson CE:** Hypoxia stimulates expression of the gene for vascular endothelial growth factor (VEGF), a putative angiogenic factor, by granulosa cells of the ovarian follicle, a site of angiogenesis. *J Cell Biol.* 115: 421, 1991
73. **Kraft CN, Hansis M, Arens S, Menger MD, Vollmar B:** Striated muscle microvascular response to silver implants: A comparative in vivo study with titanium and stainless steel. *J Biomed Mater Res.* 49: 192-199, 2000
74. **Kraft CN, Burian B, Diedrich O, Gessmann J, Wimmer MA, Pennekamp PH:** Microvascular response of striated muscle to common arthroplasty-alloys: A comparative in vivo study with CoCrMo, Ti-6Al-4V, and Ti-6Al-7Nb. *J Biomed Mater Res A.* 75: 31-40, 2005
75. **Kuebler WM, Kuhnle GE, Groh J, Goetz AE:** Contribution of selectins to leucocyte sequestration in pulmonary microvessels by intravital microscopy in rabbits. *J Physiol.* 501: 375-386, 1997
76. **Ladd AL, Pliam NB:** The role of bone graft and alternatives in unstable distal radius fracture treatment. *Orthop Clin North Am.* 32: 337-351, 2001
77. **Lai LJ, Xiao X, Wu JH:** Inhibition of corneal neovascularization with endostatin delivered by adeno-associated viral (AAV) vector in a mouse corneal injury model. *J Biomed Sci.* 14: 313-322, 2007
78. **Laschke MW, Menger MD, Vollmar B:** Ovariectomy improves neovascularization and microcirculation of freely transplanted ovarian follicles. *J Endocrinol.* 172: 535-544, 2002
79. **Laschke MW, Häufel JM, Thorlacius H, Menger MD:** New experimental approach to study host tissue response to surgical mesh materials in vivo. *J Biomed Mater Res A.* 74: 696-704, 2005

80. **Laschke MW, Harder Y, Amon M, Martin I, Farhadi J, Ring A, Torio-Padron N, Schramm R, Rücker M, Junker D, Häufel JM, Carvalho C, Heberer M, Germann G, Vollmar B, Menger MD:** Angiogenesis in tissue engineering: breathing life into constructed tissue substitutes. *Tissue Eng.* 12: 2093-2104, 2006
81. **Lee JS, Semela D, Iredale J, Shah VH:** Sinusoidal remodeling and angiogenesis: a new function for the liver-specific pericyte? *Hepatology.* 45: 817-825, 2007
82. **Lehr HA, Leunig M, Menger MD, Nolte D, Messmer K:** Dorsal skinfold chamber technique for intravital microscopy in nude mice. *Am J Pathol.* 143: 1055-1062, 1993
83. **Lewandrowski KU, Schollmeier G, Ekkemkamp A, Uthoff HK, Tomford WW:** Incorporation of perforated and demineralized cortical bone allografts. Part II: A mechanical and histologic evaluation. *Biomed Mater Eng.* 11: 209-219, 2001
84. **Lieberman JR, Daluiski A, Einhorn TA:** The role of growth factors in the repair of bone. Biology and clinical applications. *J Bone Joint Surg Am.* 84: 1032-1044, 2002
85. **Lindbom L, Tuma RF, Arfors KE:** Blood flow in the rabbit tenuissimus muscle. Influence of preparative procedures for intravital microscopic observation. *Acta Physiol Scand.* 114: 121-127, 1982
86. **Lobo Gajiwala A, Agarwal M, Puri A, D'Lima C, Duggal A:** Reconstructing tumour defects: lyophilised, irradiated bone allografts. *Cell Tissue Bank.* 4: 109-118, 2003
87. **Lu C, Miclau T, Hu D, Marcucio RS:** Ischemia leads to delayed union during fracture healing: a mouse model. *J Orthop Res.* 25: 51-61, 2007
88. **Mackiewicz J, Muhling B, Hiebl W, Meinert H, Maaijwee K, Kociok N, Luke C, Zagorski Z, Kirchhof B, Jousen AM:** In vivo retinal tolerance of various heavy silicone oils. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 48: 1873-1883, 2007
89. **Matsumine A, Myoui A, Kusuzaki K, Araki N, Seto M, Yoshikawa H, Uchida A:** Calcium hydroxyapatite ceramic implants in bone tumour surgery. A long-term follow-up study. *J Bone Joint Surg Br.* 86: 719-725, 2004
90. **Matsumoto T, Kawamoto A, Kuroda R, Ishikawa M, Mifune Y, Iwasaki H, Miwa M, Horii M, Hayashi S, Oyamada A, Nishimura H, Murasawa S, Doita M, Kurosaka M, Asahara T:** Therapeutic potential of vasculogenesis and osteogenesis promoted by peripheral blood CD34-positive cells for functional bone healing. *Am J Pathol.* 169: 1440-1457, 2006

91. **McSheehy PM, Chambers TJ:** Osteoblastic cells mediate osteoclastic responsiveness to parathyroid hormone. *Endocrinology*. 118: 824-828, 1986
92. **Menger MD, Jaeger S, Walter P, Feifel G, Hammersen F, Messmer K:** Angiogenesis and hemodynamics of microvasculature of transplanted islets of Langerhans. *Diabetes*. 38: 199-201, 1989a
93. **Menger MD, Sack FU, Hammersen F, Messmer K:** Tissue oxygenation after prolonged ischemia in skeletal muscle: therapeutic effect of prophylactic isovolemic hemodilution. *Adv Exp Med Biol*. 248: 387-395, 1989b
94. **Menger MD, Hammersen F, Walter P, Messmer K:** Neovascularization of prosthetic vascular grafts. Quantitative analysis of angiogenesis and microhemodynamics by means of intravital microscopy. *Thorac Cardiovasc Surg*. 38: 139-145, 1990
95. **Menger MD, Wolf B, Hobel R, Schorlemmer HU, Messmer K:** Microvascular phenomena during pancreatic islet graft rejection. *Langenbecks Arch Chir*. 376: 214-221, 1991
96. **Menger MD, Hammersen F, Messmer K:** In vivo assessment of neovascularization and incorporation of prosthetic vascular biografts. *Thorac Cardiovasc Surg*. 40: 19-25, 1992a
97. **Menger MD, Barker JH, Messmer K:** Capillary blood perfusion during postischemic reperfusion in striated muscle. *Plast Reconstr Surg*. 89: 1104-1114, 1992b
98. **Menger MD, Laschke MW, Vollmar B:** Viewing the microcirculation through the window: some twenty years experience with the hamster dorsal skinfold chamber. *Eur Surg Res*. 34: 83-91, 2002
99. **Milkiewicz M, Ispanovic E, Doyle JL, Haas TL:** Regulators of angiogenesis and strategies for their therapeutic manipulation. *Int J Biochem Cell Biol*. 38: 333-357, 2006
100. **Mittelmeier H, Mittelmeier W, Gleitz M:** Pyrost, a spongius, mineral bone substitute. Experimental bases and 13-year clinical experience in over 1000 cases. *Orthopade*. 27: 126-135, 1998
101. **Moore WR, Graves SE, Bain GI:** Synthetic bone graft substitutes. *ANZ J Surg*. 71: 354-361, 2001
102. **Motoki DS, Mulliken JB:** The healing of bone and cartilage. *Clin Plast Surg*. 17: 527-544, 1990

103. **Mukherjee DP, Tunkle AS, Roberts RA, Clavenna A, Rogers S, Smith D:** An animal evaluation of a paste of chitosan glutamate and hydroxyapatite as a synthetic bone graft material. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 67: 603-609, 2003
104. **Muschler GF, Negami S, Hyodo A, Gaisser D, Easley K, Kambic H:** Evaluation of collagen ceramic composite graft materials in a spinal fusion model. *Clin Orthop Relat Res.* 328: 250-260, 1996
105. **Neeman M, Abramovitch R, Schiffenbauer YS, Tempel C:** Regulation of angiogenesis by hypoxic stress: from solid tumours to the ovarian follicle. *Int J Exp Pathol.* 78: 57-70, 1997
106. **Nguyen VP, Chen SH, Trinh J, Kim H, Coomber BL, Dumont DJ:** Differential response of lymphatic, venous and arterial endothelial cells to angiopoietin-1 and angiopoietin-2. *BMC Cell Biol.* 8: 10, 2007
107. **Nicholson JW:** Glass-ionomers in medicine and dentistry. *Proc Inst Mech Eng.* 212: 121-126, 1998
108. **Niedhard F, Pfeil J:** Duale Reihe Orthopädie. *Thieme, Stuttgart.* 4.ed: 311-314, 2003
109. **Nishikawa T, Masuno K, Tominaga K, Koyama Y, Yamada T, Takakuda K, Kikuchi M, Tanaka J, Tanaka A:** Bone repair analysis in a novel biodegradable hydroxyapatite/collagen composite implanted in bone. *Implant Dent.* 14: 252-260, 2005
110. **Nomura S, Takano-Yamamoto T:** Molecular events caused by mechanical stress in bone. *Matrix Biol.* 19: 91-96, 2000
111. **Obermaier R, Benz S, Von Dobschuetz E, Drognitz O, Schareck W, Jonas L, Messmer K, Hopt UT:** Characterization of microcirculatory disturbance in a novel model of pancreatic ischemia-reperfusion using intravital fluorescence-microscopy. *Pancreas.* 25: 142-148, 2002
112. **Ogiso M, Yamashita Y, Tabata T, Ramonito R, Borgese D:** The delay method: a new surgical technique for enhancing the bone-binding capability of HAP implants to bone surrounding implant cavity preparations. *J Biomed Mater Res.* 28: 805-812, 1994
113. **Oman M, Tolli J, Blind PJ, Naredi P, Hafstrom LO:** ¹³³Xe clearance estimates the effect of vasopressin on peritoneal blood flow in rats. *Hepatogastroenterology.* 51: 1037-1041, 2004

114. **Papenfuss HD, Gross JF, Intaglietta M, Treese FA:** A transparent access chamber for the rat dorsal skin fold. *Microvasc Res.* 18: 311-318, 1979
115. **Pennekamp PH, Gessmann J, Diedrich O, Burian B, Wimmer MA, Frauchiger VM, Kraft CN:** Short-term microvascular response of striated muscle to cp-Ti, Ti-6Al-4V, and Ti-6Al-7Nb. *J Orthop Res.* 24: 531-540, 2006
116. **Penning LC, Dubbelman TM:** Fundamentals of photodynamic therapy: cellular and biochemical aspects. *Anticancer Drugs.* 5: 139-146, 1994
117. **Perry CR:** Bone repair techniques, bone graft, and bone graft substitutes. *Clin Orthop Relat Res.* 360: 71-86, 1999
118. **Ploem JS, De Sterke JA, Bonnet J, Wasmund H:** A microspectrofluorometer with epi-illumination operated under computer control. *J Histochem Cytochem.* 22: 668-677, 1974
119. **Posner AS:** Crystal chemistry of bone mineral. *Physiol Rev.* 49: 760-792, 1969
120. **Povlishock JT, Rosenblum WI, Sholley MM, Wei EP:** An ultrastructural analysis of endothelial change paralleling platelet aggregation in a light/dye model of microvascular insult. *Am J Pathol.* 110: 148-160, 1983
121. **Prewitt RL, Johnson PC:** The effect of oxygen on arteriolar red cell velocity and capillary density in the rat cremaster muscle. *Microvasc Res.* 12: 59-70, 1976
122. **Pries AR:** A versatile video image analysis system for microcirculatory research. *Int J Microcirc Clin Exp.* 7: 327-345, 1988
123. **Probst A, Spiegel HU:** Cellular mechanisms of bone repair. *J Invest Surg.* 10: 77-86, 1997
124. **Ramshesh VK, Knisley SB:** Use of light absorbers to alter optical interrogation with epi-illumination and transillumination in three-dimensional cardiac models. *J Biomed Opt.* 11: 024019, 2006
125. **Reddi AH:** Initiation of fracture repair by bone morphogenetic proteins. *Clin Orthop Relat Res.* 355: 66-72, 1998
126. **Reed MW, Miller FN:** Importance of light dose in fluorescent microscopy. *Microvasc Res.* 36: 104-107, 1988

127. **Rimondini L, Nicoli-Aldini N, Fini M, Guzzardella G, Tschon M, Giardino R:** In vivo experimental study on bone regeneration in critical bone defects using an injectable biodegradable PLA/PGA copolymer. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 99: 148-154, 2005
128. **Robey PG, Fedarko NS, Hefferan TE, Bianco P, Vetter UK, Grzesik W, Friedenstein A, Van der Pluijm G, Mintz KP, Young MF:** Structure and molecular regulation of bone matrix proteins. *J Bone Miner Res.* 8: 483-487, 1993
129. **Rodan GA, Martin TJ:** Role of osteoblasts in hormonal control of bone resorption - a hypothesis. *Calcif Tissue Int.* 33: 349-351, 1981
130. **Rosenblum WI:** Fluorescence induced in platelet aggregates as a guide to luminal contours in the presence of platelet aggregation. *Microvasc Res.* 15: 103-106, 1978
131. **Ross N, Tacconi L, Miles JB:** Heterotopic bone formation causing recurrent donor site pain following iliac crest bone harvesting. *Br J Neurosurg.* 14: 476-479, 2000
132. **Rubanyi GM, Polokoff MA:** Endothelins: molecular biology, biochemistry, pharmacology, physiology, and pathophysiology. *Pharmacol Rev.* 46: 325-415, 1994
133. **Ruhé PQ, Hedberg EL, Padron NT, Spauwen PH, Jansen JA, Mikos AG:** Biocompatibility and degradation of poly(DL-lactic-co-glycolic acid)/calcium phosphate cement composites. *J Biomed Mater Res A.* 74: 533-544, 2005
134. **Sailer R, Gabl M, Lutz M, Seykora P, Pechlaner S:** Integration of porous hydroxyapatite ceramic prosthesis at the distal radius in elderly patients. Radiological examination. *Unfallchirurg.* 102: 531-534, 1999
135. **Salgado AJ, Coutinho OP, Reis RL:** Bone tissue engineering: state of the art and future trends. *Macromol Biosci.* 4: 743-765, 2004
136. **Sanan A, Haines SJ:** Repairing holes in the head: a history of cranioplasty. *Neurosurgery.* 40: 588-603, 1997
137. **Sandison JC:** A new method for microscopic study of living growing tissue by the introduction of a transparent chamber in the rabbit's ear. *Anat Rec.* 28, 1924

138. **Sandison JC:** The transparent chamber of the rabbit's ear giving a complete description of improved techniques of construction and introduction and general account of growth and behavior of living cells and tissues seen with the microscope. *Am J Anat.* 41: 447-472, 1928
139. **Sato K, Komaru T, Shioiri H, Takeda S, Takahashi K, Kanatsuka , Nakayama M, Shirato K:** Hypercholesterolemia impairs transduction of vasodilator signals derived from ischemic myocardium: myocardium-microvessel cross-talk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 24: 2034-2039, 2004
140. **Saetzler RK, Jallo J, Lehr HA, Philips CM, Vasthare U, Arfors KE, Tuma RF:** Intravital fluorescence microscopy: impact of light-induced phototoxicity on adhesion of fluorescently labeled leukocytes. *J Histochem Cytochem.* 45: 505-513, 1997
141. **Saunet JL, Dittmar A, Leftheriotis G:** Non-invasive measurement of skin blood flow: comparison between plethysmography, laser-Doppler flowmeter and heat thermal clearance method. *Int J Microcirc Clin Exp.* 5: 73-83, 1986
142. **Schlaeppli JM, Gutzwiller S, Finkenzeller G, Fournier B:** 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ induces the expression of vascular endothelial growth factor in osteoblastic cells. *Endocr Res.* 23: 213-229, 1997
143. **Schramm R, Scheuer C, Yamauchi J, Vollmar B, Menger MD:** Heat shock preconditioning impairs revascularization of freely transplanted pancreatic islets. *Transplantation.* 74: 1544-1550, 2002
144. **Seiler JG 3rd, Johnson J:** Iliac crest autogenous bone grafting: donor site complications. *J South Orthop Assoc.* 9: 91-97, 2000
145. **Sholley MM, Ferguson GP, Seibel HR, Montour JL, Wilson JD:** Mechanisms of neovascularization. Vascular sprouting can occur without proliferation of endothelial cells. *Lab Invest.* 51: 624-634, 1984
146. **Silbernagel S, Lang F:** Taschenatlas der Pathophysiologie. *Thieme, Stuttgart.* 2.ed: 132-133, 2005
147. **Silverman NR, Intaglietta M, Simon AL, Tompkins WR:** Determination of pulmonary pulsatile perfusion by fluoroscopic videodensitometry. *J Appl Physiol.* 33: 147-149, 1972

148. **Simonds RJ, Holmberg SD, Hurwitz RL, Coleman TR, Bottenfield S, Conley LJ, Kohlenberg SH, Castro KG, Dahan BA, Schable CA:** Transmission of human immunodeficiency virus type 1 from a seronegative organ and tissue donor. *N Engl J Med.* 326: 726-732, 1992
149. **Stacker SA, Vitali A, Caesar C, Domagala T, Groenen LC, Nice E, Achen MG, Wilks AF:** A mutant form of vascular endothelial growth factor (VEGF) that lacks VEGF receptor-2 activation retains the ability to induce vascular permeability. *J Biol Chem.* 274: 34884-34892, 1999
150. **Steinbauer M, Harris AG, Abels C, Messmer K:** Characterization and prevention of phototoxic effects in intravital fluorescence microscopy in the hamster dorsal skinfold model. *Langenbecks Arch Surg.* 385: 290-298, 2000
151. **Strong DM, Friedlaender GE, Tomford WW, Springfield DS, Shives TC, Burchardt H, Enneking WF, Mankin HJ:** Immunologic responses in human recipients of osseous and osteochondral allografts. *Clin Orthop Relat Res.* 326: 107-114, 1996
152. **Thorwarth M, Schultze-Mosgau S, Kessler P, Wiltfang J, Schlegel KA:** Bone regeneration in osseous defects using a resorbable nanoparticulate hydroxyapatite. *J Oral Maxillofac Surg.* 63: 1626-1633, 2005
153. **Tsuzuki H, Sasa S:** Ultrastructural observation of capillary sprouts in the dental organs of rat molars. *Kaibogaku Zasshi.* 69: 684-696, 1994
154. **Uchida A, Araki N, Shinto Y, Yoshikawa H, Kurisaki E, Ono K:** The use of calcium hydroxyapatite ceramic in bone tumour surgery. *J Bone Joint Surg Br.* 72: 298-302, 1990
155. **Vajkoczy P, Ullrich A, Menger MD:** Intravital fluorescence videomicroscopy to study tumor angiogenesis and microcirculation. *Neoplasia.* 2: 53-61, 2000
156. **van Blitterswijk CA, Grote JJ, Kuijpers W, Daems WT, de Groot K:** Macropore tissue ingrowth: a quantitative and qualitative study on hydroxyapatite ceramic. *Biomaterials.* 7: 137-143, 1986
157. **Vollmar B, Conzen P, Habazettl H, Adili F, Peter K:** Does nitrous oxide affect coronary microcirculation? An intravital microscopic study in the canine heart. *Anesth Analg.* 80: 249-255, 1995

158. **Wahl M, Unterberg A, Baethmann A:** Intravital fluorescence microscopy for the study of blood-brain-barrier function. *Int J Microcirc Clin Exp.* 4: 3-18, 1985
159. **Wang DS, Miura M, Demura H, Sato K:** 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, 1997
160. **Webster MH, Patterson J:** The photo-electric plethysmograph as a monitor of microvascular anastomoses. *Br J Plast Surg.* 29: 182-185, 1976
161. **Wellhoner P, Rolle D, Lonroth P, Strindberg L, Elam M, Dodt C:** Laser-Doppler flowmetry reveals rapid perfusion changes in adipose tissue of lean and obese females. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 291: 1025-1030, 2006
162. **Westermann S, Vollmar B, Thorlacius H, Menger MD:** Surface cooling inhibits tumor necrosis factor-alpha-induced microvascular perfusion failure, leukocyte adhesion, and apoptosis in the striated muscle. *Surgery.* 126: 881-889, 1999
163. **Winet H:** A horizontal intravital microscope-plus-bone chamber system for observing bone microcirculation. *Microvasc Res.* 37: 105-114, 1989
164. **Wozney JM, Rosen V:** Bone morphogenetic protein and bone morphogenetic protein gene family in bone formation and repair. *Clin Orthop Relat Res.* 346: 26-37, 1998
165. **Yamauchi J, Vollmar B, Wolf B, Menger MD:** Role of TNF-alpha in local surgical trauma-induced microvascular dysfunction. *Dig Surg.* 16: 400-406, 1999
166. **Yamura H, Suzuki M, Sato H:** Transparent chamber in the rat skin for studies on microcirculation in cancer tissue. *Gann.* 62: 177-185, 1971
167. **Yla-Herttuala S, Rissanen TT, Vajanto I, Hartikainen J:** Vascular endothelial growth factors: biology and current status of clinical applications in cardiovascular medicine. *J Am Coll Cardiol.* 49: 1015-1026, 2007
168. **Younger EM, Chapman MW:** Morbidity at bone graft donor sites. *J Orthop Trauma.* 3: 192-195, 1989

169. **Zhao W, Chen B, Li X, Lin H, Sun W, Zhao Y, Wang B, Zhao Y, Han Q, Dai J:** Vascularization and cellularization of collagen scaffolds incorporated with two different collagen-targeting human basic fibroblast growth factors. *J Biomed Mater Res A.* 82: 630-636, 2007
170. **Zwaginga JJ, Doevendans P:** Stem cell-derived angiogenic/vasculogenic cells: possible therapies for tissue repair and tissue engineering. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 30: 900-908, 2003
171. **Zweifach BW:** The microcirculation in the intestinal mesentery. *Microvasc Res.* 5: 363-367, 1973

9. DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich all denjenigen, die zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen haben, meinen herzlichen Dank aussprechen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn *Professor Dr. Michael Menger* und Herrn *Dr. Matthias Laschke* für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit, am Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie der Universität des Saarlandes tätig sein zu dürfen. Durch ihre persönliche Anleitung, ihre stete Unterstützung und ihre konstruktive Kritik haben beide entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Weiterhin möchte ich mich bei Frau *Elisabeth Gluding*, Frau *Janine Becker* und Frau *Claudia Scheuer* bedanken, die mir in technischen Fragen mit Rat und Tat zur Seite standen. Ihre Unterstützung bei den Laborarbeiten und der Erstellung von histologischen Präparaten war von unschätzbarem Wert.

Nicht zuletzt möchte ich all jenen danken, die mich durch interessierte Diskussionen und persönliche Anteilnahme bei meiner Arbeit unterstützt haben.

Kristina Witt

10. LEBENS LAUF

Personalien

Name: Kristina Witt
Geburtsdatum: 06.11.1981
Geburtsort: Zweibrücken
Eltern: Günther Witt und
Claudia Witt, geb. Schlachter
Geschwister: Andreas und Matthias Witt

Schulische Ausbildung

1987-1991 Hilgard-Grundschule, Zweibrücken
1991-2001 Helmholtz-Gymnasium, Zweibrücken
6/2001 Abitur

Seit 01/2002 Sanitätsoffizier bei der Deutschen Bundeswehr

Universitäre Laufbahn

10/2002 Studium der Humanmedizin an der Universität des Saarlandes,
Homburg/Saar
3/2004 Ärztliche Vorprüfung
seit 2/2005 Promotion am Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie der
Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

Publikationen

Originalarbeiten:

Laschke MW, Witt K, Pohlemann T, Menger MD: Injectable nanocrystalline hydroxyapatite paste for bone substitution: in vivo analysis of biocompatibility and vascularization. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 82: 494-505. 2007

Kongressbeiträge:

Laschke MW, Witt K, Pohlemann T, Menger MD: Biocompatibility and vascularization of the injectable hydroxyapatite paste Ostim[®]. *J Vasc Res.* 43: 566, 2006

Witt K, Laschke MW, Pohlemann T, Menger MD: In vivo analysis of biocompatibility and vascularization of the injectable hydroxyapatite paste Ostim for bone substitution. *Langenbeck's Arch Surg.* 391: 521-522, 2006