

Aus der Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie  
der Universität Würzburg

Direktor: Univ.- Prof. Dr. med. Dr. med. dent. A. C. Kübler

**Immunhistochemische Untersuchungen zur Expression von  
Wachstumsfaktoren im Rahmen der Vaskularisation knöcherner  
Kieferkammaugmentate im Schafmodell**

Inaugural - Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät  
der  
Julius-Maximilians-Universität Würzburg  
vorgelegt

von  
Steffen Christian Alexander Koerdt  
aus Arnsberg / Westf.

Würzburg, Juli 2011

**Referent :** Priv.-Doz. Dr. med. Dr. med. dent. T. Reuther

**Koreferent :** Univ.-Prof. Dr. rer. nat. J. Groll

**Dekan :** Univ.-Prof. Dr. med. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 06.03.2012

Der Promovend ist Arzt



AAA-Knochen	autolysierter-antigenextrahierter-allogener Knochen
AK	Antikörper
Aqua dest.	destilliertes Wasser
Ba	Barium
BMP	Bone Morphogenetic Protein
BSA	Bovine Serum Antibody
Ca	Calcium
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
EDRF	Endothelium Derived Relaxing Factor
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
FI	Färbeintensität
GBR	Guided Bone Regeneration
GDF	Growth and Differentiation Factors
HA	Hydroxylapatit
I.E.	internationale Einheiten
i.v.	intra venös
IGF	Insulin Like Growth Factor
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
IRS	Immunoreaktiver Score
K	Kalium
KEM	Knochenersatzmaterialien
Mg	Magnesium
ml	Milliliter
Na	Natrium
NaCl	Kochsalz

NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
OGP	Osteogenic Growth Peptide
OP	Osteogenic Protein
Pb	Blei
PDGF	Platelet Derived Growth Factors
POS	Positivität
ROI	Region of Interest
s.c.	subcutan
Sr	Strontium
TBS	Tris-buffered Saline
TGF- $\beta$	Transforming Growth Factor- $\beta$
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VEGFR-1	Vascular Endothelial Growth Factor Rezeptor-1
VEGFR-2	Vascular Endothelial Growth Factor Rezeptor-2
vWF	von-Willebrand Faktor

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	7
1.1	Übersicht.....	7
1.1.1	Klassifikation der Knochentransplantate.....	8
1.1.2	Historischer Überblick.....	9
1.2	Knochengewebe.....	10
1.2.1	Chemie und Biochemie von Knochengewebe.....	11
1.2.2	Aufbau des Lamellenknochens.....	12
1.3	Prinzip der Knochenbildung.....	13
1.3.1	Desmale Osteogenese.....	13
1.3.2	Chondrale Osteogenese.....	13
1.3.3	Remodeling.....	14
1.3.4	Osteogenität.....	14
1.3.5	Osteoinduktion.....	15
1.3.6	Osteokonduktion.....	15
1.3.7	Guided Bone Regeneration (GBR) .....	15
1.4	Knochenersatzmaterialien.....	16
1.4.1	Knochenersatzmaterialien xenogener Herkunft.....	17
1.5	Autologer Knochen zur Defektdeckung.....	17
1.6	Unterkieferaugmentation mit autogenem, kortikospongiösem Beckenkammtransplantat.....	18
1.6.1	Operationstechnik.....	19
1.6.2	Komplikationen nach Beckenkammaugmentation.....	19
1.7	Antikörper.....	20
1.7.1	Bone Morphogenetic Protein (BMP) .....	20
1.7.2	Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) .....	22
1.7.3	Vascular Endothelial Growth Factor Rezeptoren (VEGFR) .....	23
1.7.3.1	Vascular Endothelial Growth Factor Rezeptor-1 (VEGFR-1).....	23
1.7.3.2	Vascular Endothelial Growth Factor Rezeptor-2 (VEGFR-2).....	24
1.7.4	Von Willebrand Faktor (vWF).....	24
1.7.5	Stickstoffmonoxid (NO).....	25
1.7.5.1	Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS).....	25
1.7.5.1.1	Endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS).....	26
1.7.5.1.2	Induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS).....	26
1.8	Zielsetzung der Arbeit.....	26
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	28
2.1	Material.....	28

2.1.1	Geräte.....	28
2.1.2	Verbrauchsmittel.....	28
2.1.3	Chemikalien.....	29
2.1.3.1	Ansatz von 0,05 M TBS, pH 7,4.....	30
2.1.3.2	Ansatz von Phosphatpuffer (PB) 0,1 M, pH 7,4.....	30
2.1.3.3	Ansatz der DAB-Lösung.....	31
2.1.4	Antikörper.....	31
<b>2.2</b>	<b>Methoden.....</b>	<b>32</b>
2.2.1	Vorarbeiten.....	32
2.2.1.1	Tierexperimentelle Untersuchungen im Schafmodell.....	32
2.2.1.1.1	Versuchtiere und Methode.....	33
2.2.1.1.2	Anästhesie der Versuchtiere.....	33
2.2.1.1.3	Gewinnung von kortikospongiösem Beckenspan.....	33
2.2.1.1.4	Transplantation des Knochenspan auf den lateralen Unterkiefer.....	33
2.2.1.2	Konditionierungen des Transplantatlagers.....	34
2.2.1.2.1	Konditionierung 1: Kortikospongiosa (KS) .....	34
2.2.1.2.2	Konditionierung 2: Perforation des Transplantatlagers (Anfr).....	35
2.2.1.2.3	Konditionierung 3: Periostexzision (PeriostX) .....	35
2.2.1.2.4	Konditionierung 4: Periostverstärkung (Rmem) .....	36
2.2.1.2.5	Konditionierung 5: Bio-Oss® (BioOss) .....	36
2.2.1.2.6	Konditionierung 6: Silikonmembran (Sperre) .....	37
2.2.1.3	Gewinnung der Proben.....	37
2.2.1.3.1	Euthanasie der Versuchstiere.....	37
2.2.1.3.2	Fixation der Präparate.....	38
2.2.2	Immunhistochemische Untersuchungen.....	38
2.2.2.1	Entkalkung und histologischer Schnitt.....	38
2.2.2.2	Immunhistochemische Färbungen.....	39
2.2.3	Auswertung.....	42
2.2.3.1	Erstellung der Fotografien.....	42
2.2.3.2	Auswertung der Fotografien.....	43
2.2.4	Auswertung und Statistik.....	46
<b>3</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>49</b>
3.1	Bone Morphogenetic Protein (BMP).....	50
3.1.1	Deskriptive Statistik zur Positivität.....	51
3.1.2	Deskriptive Statistik zur Färbeintensität.....	53
3.1.3	Deskriptive Statistik zum Immunoreaktiven Score.....	54
3.2	Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) .....	56
3.2.1	Deskriptive Statistik zur Positivität.....	57
3.2.2	Deskriptive Statistik zur Färbeintensität.....	59
3.2.3	Deskriptive Statistik zum Immunoreaktiven Score.....	60

3.3	Vascular Endothelial Growth Factor Rezeptor (VEGFR).....	62
3.3.1	Vascular Endothelial Growth Factor Rezeptor-1 (VEGFR-1).....	62
3.3.1.1	Deskriptive Statistik zur Positivität.....	63
3.3.1.2	Deskriptive Statistik zur Färbeintensität.....	65
3.3.1.3	Deskriptive Statistik zum Immunoreaktiven Score.....	66
3.3.2	Vascular Endothelial Growth Factor Rezeptor-2 (VEGFR-2) .....	68
3.3.2.1	Deskriptive Statistik zur Positivität.....	69
3.3.2.2	Deskriptive Statistik zur Färbeintensität.....	71
3.3.2.3	Deskriptive Statistik zum Immunoreaktiven Score.....	72
3.4	von Willebrand Factor (vWF) .....	74
3.4.1	Deskriptive Statistik zur Positivität.....	75
3.4.2	Deskriptive Statistik zur Färbeintensität.....	76
3.4.3	Deskriptive Statistik zum Immunoreaktiven Score.....	78
3.5	Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS) .....	79
3.5.1	Endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS) .....	79
3.5.1.1	Deskriptive Statistik zur Positivität.....	81
3.5.1.2	Deskriptive Statistik zur Färbeintensität.....	82
3.5.1.3	Deskriptive Statistik zum Immunoreaktiven Score.....	84
3.5.2	Induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS) .....	85
3.5.2.1	Deskriptive Statistik zur Positivität.....	86
3.5.2.2	Deskriptive Statistik zur Färbeintensität.....	88
3.5.2.3	Deskriptive Statistik zum Immunoreaktiven Score.....	89
<b>4</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>91</b>
4.1	Tierexperimentelle Untersuchungen als Grundlage.....	92
4.2	Immunhistochemische Untersuchungen.....	93
4.2.1	Bone Morphogenetic Protein-2 (BMP-2).....	94
4.2.2	Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF).....	95
4.2.3	Vascular Endothelial Growth Factor Rezeptor (VEGFR).....	96
4.2.3.1	Vascular Endothelial Growth Factor Rezeptor-1 (VEGFR-1).....	97
4.2.3.2	Vascular Endothelial Growth Factor Rezeptor-2 (VEGFR-2).....	97
4.2.4	von Willebrand Factor (vWF).....	98
4.2.5	Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS).....	99
4.2.5.1	Endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS).....	99
4.2.5.2	Induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS).....	100
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>101</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>103</b>
<b>7</b>	<b>Anhang</b> .....	<b>116</b>



7.1	Statistische Auswertungen zur Signifikanz.....	116
	7.1.1 Bone Morphogenetic Protein-2 (BMP-2).....	116
	7.1.2 Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF).....	121
	7.1.3 Vascular Endothelial Growth Factor Rezeptor (VEGFR).....	125
	7.1.3.1 Vascular Endothelial Growth Factor Rezeptor-1 (VEGFR-1).....	125
	7.1.3.2 Vascular Endothelial Growth Factor Rezeptor-2 (VEGFR-2).....	129
	7.1.4 von Willebrand Factor (vWF).....	133
	7.1.5 Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS).....	135
	7.1.5.1 endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS).....	135
	7.1.5.2 induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS).....	139
7.2	Abbildungsverzeichnis.....	143
7.3	Auswertungsbogen.....	144
<b>8</b>	<b>Danksagung</b> .....	145
<b>9</b>	<b>Lebenslauf</b> .....	146

---

# 1 Einleitung

## 1.1 Übersicht

Die Transplantation von Knochenmaterial hat heute in der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie einen hohen Stellenwert und gehört auf diesem Fachgebiet zu den am häufigsten durchgeführten Operationen.[63] Die Einsatzmöglichkeiten in der Spalt- und Fehlbildungschirurgie sowie bei rekonstruktiven Eingriffen im Rahmen von Trauma oder Tumoroperationen haben sich in den letzten Jahren um Indikationen in der prä-implantologischen Chirurgie erweitert. So lassen sich räumlich begrenzte Knochendefekte im Ober- oder Unterkiefer im Rahmen der Implantologie durch die Methode der gesteuerten Geweberegeneration wieder aufbauen. Bei größeren Defekten werden Knochentransplantate zur Augmentation der atrophischen Kieferabschnitte oder des Kieferhöhlenbodens eingesetzt.[95]

Den Goldstandard für Knochentransplantationen in der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie stellt nach wie vor das autologe Transplantat dar. Je nach Indikation, Größe des zu deckenden Defekts und operativ-technischen Fragestellungen kann Knochen aus dem Kinn, dem Kieferwinkel, vom Tuber maxillae, der Kalotte, den Rippen, aus der Tibia oder dem Becken gewonnen werden.[68; 98; 97; 99]

Hierbei steht der intraoralen Knochenentnahme mit einer vereinfachten Entnahme des Transplantates die begrenzt zur Verfügung stehende Größe gegenüber. Vorteil der extraoralen Knochenentnahme, beispielsweise aus dem Beckenkamm, ist die größere zur Verfügung stehende Knochenmenge. Nachteilig ist der chirurgische Mehraufwand sowie Entnahmemorbiditäten und damit verbundene Komplikationen wie Infektionen, Blutungen, Hämatome, Nervschädigungen, Schmerzen und funktionelle Defizite.[125; 146]

Die Qualität des Transplantates stellt einen der wichtigsten Parameter für die erfolgreiche Heilung eines Knochendefektes dar. Von entscheidender Bedeutung sind des Weiteren die zu überbrückende Defektgröße sowie die Qualität des Transplantatlagers.

Die Defektgröße ist meist nicht zu beeinflussen, stellt aber eine kritische Grenze dar, da ab einer gewissen Größe, abhängig von der Lokalisation und der jeweiligen Spezies, keine Spontanheilung mehr beobachtet werden kann. Der Defekt wird mit minderwertigem Granulationsgewebe aufgefüllt, und eine knöcherne Konsolidierung unterbleibt.

Vor allem die adäquate Fixierung und Stabilisation des Transplantates und die Optimierung der Transplantateigenschaften tragen wesentlich zur Qualität der knöchernen Rehabilitation bei. Auch die Modifikation des Transplantatlagers kann einer Atrophie entgegenwirken.

Die Suche nach geeigneten Knochenersatzmaterialien sowie nach Veränderungen des Transplantates und des Transplantatlagers waren und sind Ansatzpunkt wissenschaftlicher Bestrebungen. Im Rahmen dieser Arbeit wird dieses Problem aufgegriffen und ein Schwerpunkt auf die Modifikation des Transplantatlagers und die damit einhergehenden Veränderungen auf zellulärer Ebene gelegt. (siehe Kap. 1.8)

### 1.1.1 Klassifikation der Knochentransplantate

Knochentransplantate werden entsprechend ihrer Herkunft klassifiziert. Eine Übersicht bietet Tabelle 1.

**Tabelle 1: Terminologie der Transplantationen**

Transplantatart		Herkunft des Transplantats
Autotransplantat	<i>autogen</i>	Spender und Empfänger sind identisch. Keine Abstoßungsreaktion
Isotransplantat	<i>syngen</i>	Spender und Empfänger sind genetisch identisch (z. B. eineiige Zwillinge). Keine bzw. schwache zelluläre Abstoßungsreaktion
Allotransplantat	<i>allogen</i>	Spender und Empfänger sind gen. different, gehören aber derselben Spezies an. Zelluläre Abstoßungsreaktion
Xenotransplantat	<i>xenogen</i>	Spender und Empfänger sind genetisch different, sie gehören verschiedenen Spezies an. Humorale, selten zelluläre Abstoßungsreaktion
Alloplastik	<i>alloplastisch</i>	Ersatz körpereigenen Gewebes durch künstlich hergestellte Fremdmaterialien. Keine Abstoßungsreaktion

Nach [95]

Xenogene Transplantate wurden in Form von Schädelknochen des Hundes und Rinderknochen seit dem 17. Jahrhundert transplantiert.[63]

Allogene Materialien im Rahmen der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie betreffen vor allem den von Kübler entwickelte AAA-Knochen (autolysierte, antigen-extrahierte, allogene Knochen).[80]

Bei der Implantation von alloplastischen Materialien fanden bereits früh Materialien wie Elfenbein, Gold und Holz Verwendung. Auch nicht reaktive Metalle sowie Methylmethacrylate (Knochenzement) oder Silikone wurden klinisch eingesetzt. Zunehmend wurden in den letzten Jahren bioaktive Materialien wie bioaktive Glaskeramiken, Hydroxylapatit, Trikalziumphosphat, biphasische Kalziumphosphate sowie unterschiedlich plasmabeschichtete Metallimplantate verwendet.

Autogene Transplantate besitzen eine hohe osteogene Potenz und osteoinduktive Eigenschaften und gelten seit der Arbeit von Axhausen als Goldstandard im Bezug auf Knochentransplantate.[7] Autogene Knochentransplantate werden entweder als Spongiosachips oder kortikospongiöse Späne frei verpflanzt oder mikrovaskulär mit den nutritiven Gefäßen transplantiert.[95]

### 1.1.2 Historischer Überblick

Die erste beschriebene Knochentransplantation führte van Meekeren 1668 durch. In dieser xenogenen Transplantation ersetzte van Meekeren den traumatischen Kalottendefekt eines Soldaten durch ein Transplantat vom Hund.[91]

Anfang des 19. Jahrhunderts berichtete von Walther, ein Bonner Chirurg, von der ersten erfolgreichen autologen Knochentransplantation.[138]

Die Rekonstruktion von knöchernen Defekten im Bereich der Mandibula begann Anfang des 20. Jahrhunderts mit Transplantaten aus Tibia, Beckenkamm und Transpositionen aus der Mandibula selbst.[126; 137; 111] Clementschitsch beschrieb 1950 auch einen transoralen Zugang bei atrophierter Oberkiefer im Sinne einer Augmentation.[29] In der Mitte der 1950er Jahre waren die Arbeit von Schmid, der eine Rekonstruktion von Alveolarkammdefekten mit Beckenkammtransplantaten über einen

intraoralen Zugang an beiden Kiefern beschrieb, sowie die Entwicklung einer Operationsmethode für die Kieferkammaugmentation von Rehrmann wegweisend für die Etablierung der Methode.[117; 109]

Das Problem der Resorption von Knochentransplantaten wurde von Davis et al. in zwei Arbeiten 1970 und 1975 beschrieben.[35; 34] Davis beschrieb eine Resorptionsquote von mehr als 50% in den ersten 1 ½ postoperativen Jahren und bis zu 80% des Rippen-transplantates nach 3 Jahren postoperativ. Auch transplantierte Beckenkamm zeigte in den Untersuchungen von Fazili et al. eine starke Resorption.[48]

Dieser Problematik wurde durch verschiedene operationstechnische Modifikationen der Kieferkammaugmentation begegnet. Buser et al. beschrieb 1996 den guten Erfolg der Verwendung von Membranen in Kombination mit Knochentransplantaten.[23] Die klinische Einführung von Implantaten hat durch den Stimulus auf den transplantierten Knochen ebenfalls die Resorptionsquote positiv beeinflusst.[63] Parallel wurden verschieden Studien zur Modifikation des Transplantates durchgeführt.[113; 123] Tissue Engineering und die damit verbunden Möglichkeiten sowie das Prinzip der Osteoinduktion wurden wesentlich durch die grundlegenden Arbeiten von Urist zur Verbesserung der Therapie eingesetzt.[134] Terheyden zeigte durch seine Arbeit aus den späten 1990er Jahren die Möglichkeiten und klinischen Einsatzgebiete des Tissue Engineering auf. Zur Rekonstruktion der Mandibula wurden hier mit rekombinantem BMP und rekombinantem humanem OP-1 vorbehandelte Knochentransplantate verpflanzt.[128]

Dies und die Möglichkeiten der Beeinflussung von Transplantat und Transplantatlager sind wichtige Parameter, die zur weiteren klinischen Verbesserung von Kieferkammaugmentationen im Speziellen und Knochentransplantationen im Allgemeinen beitragen.

## 1.2 Knochengewebe

Neben Zahngewebe stellt Knochen das einzige mineralisierte Gewebe des Organismus dar. Die besondere Zusammensetzung erlaubt dem Knochengewebe, auf die funktio-

nellen Belastungen besonders zu reagieren und trotz der festen Struktur und Härte lebenslang zu einem beständigen Umbau fähig zu sein.

### 1.2.1 Chemie und Biochemie von Knochengewebe

Knochengewebe hat sowohl organische als auch anorganische Komponenten, wobei nur die Verbindung und das Zusammenspiel dieser Komponenten ihm seine außergewöhnlichen Eigenschaften verleihen.

Der Mineralanteil besteht aus zumeist schwer löslichen Kalziumsalzen, fast ausschließlich Kalziumphosphaten, deren Hauptmasse (> 90%) als nanokristallines Hydroxylapatit (HA) vorliegt. Das biologische HA weist einige Abweichung gegenüber der Theorie auf, indem Metallionen wie z. B. Ba, Sr, Pb, Mg sowie K und Na das Ca im Kationengitter teilweise ersetzen.[122] Die wasser- und mineralfreie organische Knochenmatrix besteht im adulten Knochen zu über 90% aus dem Faserprotein Kollagen, zu 97% aus Kollagen Typ I. Andere Kollagentypen wie Typ V sind mit einem Anteil von 3% vorhanden. Kollagen Typ III ist an Stellen im Knochen zu finden, die bindegewebige Anteile wie Sehnen- oder Bandinsertionen aufweisen.[76; 47]

Der restliche Anteil der Knochenmatrix besteht aus „nichtkollagener Matrix“. Zusammengesetzt wird diese amorphe Knochengrundsubstanz aus Proteoglykanen, strukturellen Glykoproteinen, Phosphoproteinen und verschiedenen Polypeptiden als Wachstumsfaktoren.[122]

Vor allem die Gruppe der Wachstums- und Differenzierungsfaktoren (Growth and Differentiation Factors, GDF) sind neben der besonderen Architektur des Knochengewebes für seine adaptiven Qualitäten verantwortlich. Zu den Wachstumsfaktoren zählen TGF- $\beta$ , IGF, PDGF, OGP und andere, die insgesamt aber nur einen niedrigen Masseanteil an der Extrazellulärmatrix ausmachen und natürlicherweise nur sehr langsam und in geringen Mengen freigesetzt werden.[10]

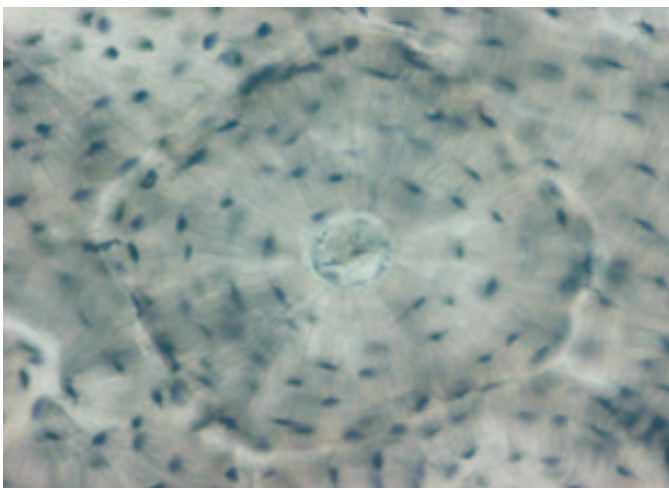
Von den Wachstumsfaktoren sind die Differenzierungsfaktoren wie BMP deutlich abzugrenzen. Sie zeichnen sich dadurch aus, eine vollständige Knochenneubildung durch Transformation von primär nicht osteogenen Zellen in Knorpel- und Knochenzellen

auszulösen. Hier finden sich auch therapeutische Ansätze.

### 1.2.2 Aufbau des Lamellenknochens

Bezüglich seiner Makrostruktur lässt sich Knochen in die äußere kompakte Kortikalis und die innere, schwammartig strukturierte Spongiosa differenzieren. Das Periost, eine dünne, aber feste und fibröse Membran, bedeckt alle Oberflächen der Kortikalis und der Spongiosa außer den Gelenkflächen und muskulotendinösen Insertionen.

Mikroskopisch sind die schichtweise angeordneten Kollagenfibrillen, die in äußere und innere General- oder Grundlamellen, Speziallamellen und Schaltlamellen unterteilt sind, charakteristisch für den Aufbau des Lamellenknochens. Hauptbestandteile sind die Osteone (Länge: 2,5 bis 1 cm; Durchmesser: 50 µm), welche aus einem zentral gelegenen Haverschen Kanal mit Gefäßen und Speziallamellen, die ringförmig um den Haverschen Kanal liegen, bestehen. Zwischen einzelnen Lamellen liegen Lakunen mit Osteozyten, von denen kleine, mit dem Haverschen Kanal in Verbindung stehende Canaliculi abgehen. Die Lamellenreste älterer abgebauter Osteone werden als Schaltlamellen bezeichnet und liegen zwischen den Osteonen. Dort finden sich keine Blutgefäße. Die querverlaufenden Volkmannschen Kanäle enthalten Gefäße und verbinden das Gefäßsystem der Haverschen Kanäle untereinander und mit den Periostgefäßen.[103; 87]



(ungefärbter Knochenschnitt, Vergrößerung: 200fach). Aus [133]

**Abbildung 1: Osteon mit angrenzenden Schaltlamellen**

---

## 1.3 Prinzip der Knochenbildung

Die Bildung von Knochengewebe im Rahmen des Wachstums, nach Frakturen und bei pathologischer Verknöcherung lässt sich grundsätzlich in zwei Formen unterscheiden: eine direkte, desmale und eine indirekte, chondrale Osteogenese.

### 1.3.1 Desmale Osteogenese

Bei der desmalen Osteogenese entsteht Knochen direkt aus embryonalem Bindegewebe, dem Mesenchym. Die Mesenchymzellen verdichten sich inselartig, und Knochen entsteht unter Umgehung des Knorpelstadiums.[107] Die Differenzierung zu Osteoblasten und die Produktion und anschließende Mineralisierung der Knochengrundsubstanz zu Osteoid führt zu sich anlagernden Knochenschichten und die weitere Differenzierung der Osteoblasten zu ruhenden Osteozyten.

Vor allem im Rahmen der Frakturheilung spielt diese Form der Osteogenese eine wichtige Rolle. Hier darf allerdings der zu überbrückende Spalt zwischen den Frakturrenden nicht breiter als 200 µm sein.[114] Kleine kortikale Defekte unterhalb einer kritischen Größe werden ebenfalls auf diese Weise konsolidiert.[71; 120]

### 1.3.2 Chondrale Osteogenese

Die ortsnahen mesenchymalen Stammzellen werden chemotaktisch angezogen und beginnen im Rahmen des Differenzierungsprozesses mit der Proliferation. Nach einer Zeitspanne von fünf bis sieben Tagen lassen sich Chondrozyten in Knorpelformationen beobachten und reagieren nachfolgend mit reaktiver Hypertrophie und Mineralisation. Diese zunächst knorpeligen Skelettanteile werden als Primordialskelett bezeichnet. Es entsteht aus Proteoglykanen, Gylkoproteinen und Kollagen Typ I bestehendem Osteoid. Die Kalzifizierung erfolgt durch Ausfällung von Kalzium-Phosphat und der Umlagerung zu Hydroxylapatitkristallen. Je nach Anlagerungsart wird die enchondrale Ossifikation, bei der die Verknöcherung von innen ausgeht und die perichondrale Ossifikation mit einer ringförmigen Anlagerung im Sinne einer Knochenmanschette unter-



schieden.[20; 45]

Nach etwa 28 Tagen ist die enchondrale Knochenbildung abgeschlossen. Diese Form der Ossifikation ist vor allem bei der sekundären Knochenheilung zu finden, bei der ein Defekt mittels eines Knorpelkallus überbrückt wird.[106]

### 1.3.3 Remodeling

Sowohl bei der desmalen wie auch bei der chondralen Form der Knochenbildung entsteht zunächst Geflechtknochen. Die Kollagenfibrillen des Geflechtknochens sind noch ungeordnet. Der Knochen hat insgesamt eine große Wachstumspotenz bei geringer mechanischer Stabilität. In der frühen Phase der Knochenbildung, bei der primären Spaltheilung und der sekundären Frakturheilung ist vor allem Geflechtknochen zu finden. Im Rahmen der Umbauvorgänge wird der minderwertige Geflechtknochen von Osteoklasten sukzessive abgebaut und durch Lamellenknochen ersetzt. Es bilden sich von Osteoblasten ausgekleidete Haversche Kanäle, die weiterhin neue Grundsubstanz bilden und durch die Anlagerung weiterer Schichten ein Osteon, ein System aus etwa vier bis zwanzig mineralisierten Knochenlamellen, um einen Haverschen Kanal herum bilden. Der neu entstandene Lamellenknochen weist eine höhere mechanische Stabilität auf und kann den funktionellen Belastungen weitaus besser standhalten. Dieser Prozess des Umbaus von Geflecht- zu Lamellenknochen wird als Remodeling bezeichnet und kann bis zu sechs Monate oder mehrere Jahre nach initialer Frakturheilung anhalten.

### 1.3.4 Osteogenität

Der Begriff Osteogenität beschreibt die Fähigkeit eines Materials, in Abwesenheit undifferenzierter Zellen Knochen zu produzieren. Die Anwesenheit vitaler, bereits differenzierter Osteoblasten oder Osteoprogenitorzellen als deren direkte Vorläufer ist hierfür erforderlich. Diese Zellen können aus den vorhandenen Bausteinen direkt knöcherne Strukturen bilden. Eine osteogene Aktivität in diesem Sinne hat lediglich das frische, vitale, autogene Knochentransplantat.

### 1.3.5 Osteoinduktion

Unter Osteoinduktion wird die Eigenschaft eines Materials verstanden, undifferenzierte mesenchymale Stammzellen chemotaktisch anzuziehen und diese dann am Einsatzort zur Proliferation und osteoblastären Differenzierung zu stimulieren. Für diesen Prozess sind osteoinduktive Proteine wie Bone Morphogenetic Proteins (BMPs), Transforming Growth Factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) und Insulin-like Growth Factor (IGF) von entscheidender Bedeutung. Neben frischen, vitalen, autologen Knochentransplantaten sind die meisten allogenen Knochenersatzmaterialien osteoinduktiv. Voraussetzung ist allerdings die Demineralisierung der extrazellulären Matrix, um die in der Matrix befindlichen morpho- und mitogenen Proteine freizulegen und damit diffusibel zu machen.[61]

### 1.3.6 Osteokonduktion

Osteokonduktion bezeichnet Materialeigenschaften, die eine reizlose Inkorporation als Füll- oder Augmentationsmaterial ermöglichen. Entlang der eingebrachten Materialien wachsen Osteoblasten ein und führen schließlich zu einem Ersatz der Leitschienen durch neu gebildeten Knochen. Das eingebrachte Material wird schleichend resorbiert. Voraussetzungen für die Osteokonduktive Potenz eines Materials sind geeignete Oberflächenstrukturen, Biokompatibilität, Porosität und geeignete chemische Faktoren.

Weitere Prinzipien der Behandlung knöcherner Defekte sind die Kallusdistraktion und die geleitete Knochenregeneration, Guided Bone Regeneration (GBR).

### 1.3.7 Guided Bone Regeneration (GBR)

Das Konzept der gerichteten Knochenregeneration (Guided Bone Regeneration, GBR) beschreibt eine Modifikation des Transplantatlagers. Damit soll das Einwachsen von wenig differenzierten Zellen und aktivierten Osteoprogenitorzellen in Defekte kritischer Größe und die damit einhergehende Auffüllung des Defektes mit Granulationsgewebe verhindert werden. Die knöcherne Konsolidierung unterbleibt in diesen Fällen. Mit der Hilfe von zellundurchlässigen Membranen lässt sich dieses Phänomen verhindern und

der Knochendefekt wird durch direkte Ossifikation mit Geflechtknochen gefüllt.[18; 15; 96]

Für die GBR stehen resorbierbare und nicht resorbierbare Membranen zur Verfügung. Nicht resorbierbare Membranen wie die e-PTFE-Membran weisen den Vorteil der höheren mechanischen Stabilität neben dem nachteiligen zweiten chirurgischen Eingriff zur Membranentfernung auf. Zu den resorbierbaren Membranen zählt beispielsweise die kollagene Bio-Gide®-Membran, die im Gegensatz zu den nicht resorbierbaren Membranen eine geringere mechanische Stabilität aufweist.[62; 100]

Klinischen kommen Membranen zur Modifikation des Transplantatlagers vor allem im Rahmen der Oralchirurgie zum Einsatz.[32; 31; 73; 115]

## 1.4 Knochenersatzmaterialien

Als Knochenersatzmaterialien (KEM) werden im Allgemeinen Implantatmaterialien verstanden, die den körpereigenen Knochen nur vorübergehend ersetzen, die Knochenneubildung stimulieren und sich im Verlauf der Knochenregeneration nach und nach auflösen.[75] Die Biokompatibilität, die Fähigkeit zur Zelladhärenz, die Platzhalterfunktion und die Fähigkeit zur Integration in das Wirtsgewebe sind charakteristische Fähigkeiten von KEM.

Analog zur Nomenklatur der Transplantationen lassen sich auch KEM nach ihrer Herkunft in autologe, allogene, xenogene und alloplastische Materialien klassifizieren, wie Tabelle 2 verdeutlicht.

**Tabelle 2: Klassifikation der Knochenersatzmaterialien (KEM)**

autolog	autologer Knochen
allogen	Demineralisierte Knochenmatrix (DBM, Grafton), Knochenmatrixgelantine, AAA-Knochen
xenogen	Bio-Oss®
alloplastisch	Hydroxylapatite, vollsynthetische Materialien

Allgemein lässt sich sagen, dass die erfolgreiche Verwendung von KEM von vielen Faktoren abhängig ist. Neben der Qualität des Transplantatlagers und der Art des

Transplantates beeinflussen die lokal vorherrschenden mechanischen Beanspruchungen an das Transplantat auch den Grad der Ausprägung des osteokonduktiven und osteoinduktiven Potentials.[9]

Da in der vorliegenden Arbeit neben autologen Knochentransplantaten lediglich Bio-Oss® zur Augmentation verwendet wurde, soll nur auf die KEM xenogener Herkunft näher eingegangen werden.

#### 1.4.1 Knochenersatzmaterialien xenogener Herkunft

Zu den klinisch wichtigsten KEM xenogener Herkunft gehört Bio-Oss®. Dabei handelt es sich um ein aus Rinderspongiosa produziertes Hydroxylapatit, welches durch thermische und chemische Behandlung (Protolyse) von allen organischen Bestandteilen befreit wurde, wobei die ursprüngliche Mineralstruktur weitgehend erhalten bleibt.[94] Die Porengröße variiert um mehrere hundert µm. Die Spongiosa ähnelt in Makro- und Mikrostruktur mit einer spezifischen Oberfläche von ca. 80 m<sup>2</sup>/g der des Menschen. Bio-Oss® wird als nicht resorbierbar klassifiziert und bleibt nach der Implantation formstabil. Es zeigt eine osteokonduktive Wirkungsweise.[116]

Auch zeigt Bio-Oss® in experimentellen Untersuchungen zur Reaktivität des umgebenden Gewebes und im Bezug auf den Grad der Osseointegration verschiedener in der kraniofazialen Chirurgie verwendeten KEM signifikant bessere Ergebnisse.[70]

Ein xenogenes KEM mit osteoinduktivem Potential stellt COLLOSS® dar. Hierbei handelt es sich um ein Knochenextrakt vom Rind, das neben Kollagen noch andere Proteine wie Wachstumsfaktoren und BMPs enthält.[96]

#### 1.5 Autologer Knochen zur Defektdeckung

Das autogene Knochentransplantat stellt durch seine osteogene, osteoinduktive und osteokonduktive Potenz nach wie vor den Goldstandard bei der Rekonstruktion knöcherner Defekte dar und ist hier anderen Materialien weit überlegen.[78]

Nachteilig sind die zusätzliche Knochenentnahme mit einer erhöhten Entnahme-

morbidität und verlängerte Operationszeiten. Auch kann das autologe Knochentransplantat meist erst nach regulativen Umbauvorgängen den biomechanischen Anforderungen der Defektregion gerecht werden.[110]

Autogene Knochentransplantate können in verschiedenen Variationen anhand der morphologischen Organisationsstruktur transplantiert werden. Die Einheilung und Umbauvorgänge erfolgen bei Spongiosatransplantationen auf Grund der lockeren Struktur und der damit verbundenen hohen Revaskularisierungsgeschwindigkeit im Vergleich am schnellsten. Dabei ist die Vaskularisierung der Spongiosa um den Faktor zehn, die Umbaurate spongiöser Transplantate um den Faktor drei größer als vergleichbare Vorgänge in autologen Kortikalistransplantaten.[112]

Reine Kortikalistransplantate sind in Regionen erhöhter physikalischer Belastung möglich, aber auf Grund der schlechteren Vaskularisation und der geringeren osteogenen Potenz ist hier die Einheilung im Vergleich zum Spongiosatransplantat erschwert. Die Vorteile der Spongiosatransplantate, verbunden mit einer erhöhten mechanischen Stabilität, vereint das kombinierte Kortikalis-Spongiosa-Transplantat.

Klinisch kommen autologer Knochen als freie, nicht vaskularisierte Transplantate und vaskularisierte freie und gestielte Transplantate zum Einsatz.

Im frei transplantierten Knochen sind meist auf Grund der Ischämie die Mehrheit der zellulären Elemente zugrunde gegangen. Lediglich die mesenchymalen Stammzellen des Knochenmarks (Bone Marrow Stem Cells, BMSC) sind gegenüber den ischämischen Bedingungen im Transplantat am widerstandsfähigsten und sind auch für den erfolgreichen Einbau des autologen Knochens in das Transplantatlager verantwortlich.[9]

## 1.6 Unterkieferaugmentation mit autogenem, kortikospongiösem Beckenkammtransplantat

Erste Beckenkammtransplantate wurden von Lexer im Rahmen der Behandlung von Gesichtsschädeldefekten im I. Weltkrieg verwendet.[82]

Gerade im Bezug auf die präprothetische Chirurgie spielt die Augmentation der Kiefer

---

eine zunehmend wichtigere Rolle. Autogene freie Knochentransplantate gelten heute allgemein als Goldstandard.[9; 78]

### 1.6.1 Operationstechnik

Die Operation sollte als minimalinvasive Technik mit geringer Morbidität erfolgen, um eine hohe und langzeitstabile Erfolgsquote des Kieferkammaufbaus zu sichern. Das Beckenkammtransplantat wird aus der inneren Fläche des Beckens kranial der Spina iliaca anterior superior mit Hilfe einer oszillierenden Säge und Meißeln entnommen. Die Entnahme verschieden großer Knochenstreifen je nach zu deckendem Defekt reduziert die extrakorporale Manipulation sowie die Gesamtoperationszeit und etwaige Komplikationen. Bis jetzt liegen Erfahrungen bis zu einer Größe des Knochentransplantates von 14 x 6 cm vor.[148]

Die entstandenen Entnahmedefekte werden zur postoperativen Blutungsprophylaxe mit Knochenwachs verschlossen, und es wird ein Thrombin-getränktes Kollagen-hämostyptikum eingelegt. Im Allgemeinen können die Patienten bei gutem Befinden die Klinik nach einer Nacht verlassen.

Bei der Transplantation des entnommenen monokortikalen Knochenstreifens ist vor allem auf eine ausreichende Abdeckung mit Weichgewebe zu achten. Um dies zu gewährleisten stehen für die absolute Kieferkammaugmentation mittels freiem Beckenkammtransplantat mit der muko-muskulär-periostalen Lappenpräparation (MMP-Flap) und der Tunneltechnik zwei Verfahren zur Verfügung, die eine hohe Verlässlichkeit der Weichgewebsabdeckung sicherstellen.[148]

### 1.6.2 Komplikationen nach Beckenkammaugmentation

Probleme, die nach einer Augmentation mit autogenem Knochen aus dem Beckenkamm auftreten können, betreffen zum Einen die Entnahmestelle. In einer großen retrospektiven Studie von Wippermann et al. wurden knapp 1200 Kasuistiken untersucht. Dabei ergab sich eine operative Revisionsquote von 2,8 %. In 19,6 % traten postoperative Komplikationen wie Hämatome auf. 55 % der Patienten klagten auch über anhaltende Beschwerden wie Sensibilitätsstörungen oder Belastungsschmerzen.[141]

Weiterhin problematisch ist in diesem Zusammenhang die Resorptionsquote der Knochentransplantate. Vor allem die unvorhersehbare Resorption und der strukturelle Kollaps im Rahmen von Remodelling-Vorgängen sind ein vorrangiges Problem.[1; 2] Nicht fixierte Knochentransplantate können im ersten Jahr nach Transplantation einen Volumenverlust von bis zu siebzig Prozent aufweisen.[105; 85]

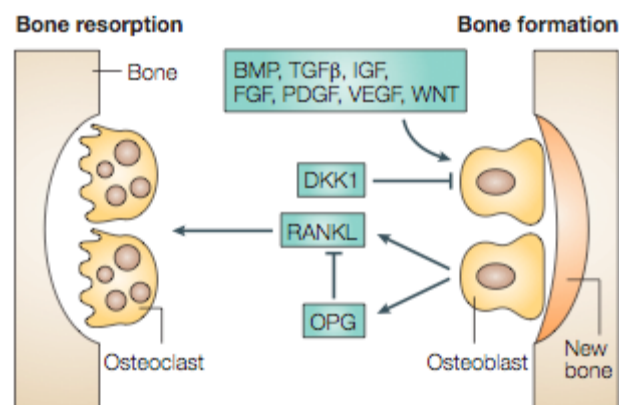
Verhoven et al. berichtet von einer signifikanten Resorption im ersten Jahr nach Transplantation und einer weitergehenden Resorption in den Folgejahren.[136] Kortikaler Knochen kann bis zu 33 % seiner Festigkeit verlieren und sich über einen sechs bis achtzehn monatigen Zeitraum in der Remodelling-Phase befinden.[46]

Vor allem durch die Entwicklung des verwendeten Beckenkamms als enchondraler Knochen finden sich höhere Resorptionsquoten als bei membranösem Knochen wie beispielsweise der Kalotte.[121; 147; 67]

## 1.7 Antikörper

### 1.7.1 Bone Morphogenetic Protein (BMP)

Bone Morphogenetic Proteins (BMPs) sind seit den Untersuchungen zur Knochenneubildung von Urist in den 1960er Jahren bekannt und gehören zu den osteoinduktiven Faktoren.[134]



aus [84]

**Abbildung 2: Rolle der Osteoblasten und Osteoklasten bei Remodelling Vorgängen des Knochens**

Osteoinduktive Faktoren sind deutlich von Wachstumsfaktoren abzugrenzen. Sie zeichnen sich dadurch aus, dass sie in der Lage sind, eine vollständige Knochenneubildung durch Transformation von primär nicht osteogenen Zellen in Knorpel- und Knochengewebe auszulösen.

BMPs sind auf Grund ihrer genetischen Struktur ein Bestandteil des Transforming Growth Factor -  $\beta$  Signalweges und bilden eine eigenständige Untergruppe mit siebzehn verschiedenen Faktoren in der TGF- $\beta$  Superfamilie. BMP hat wichtige Funktionen während der Embryogenese in Rahmen der Entwicklung des Knorpelgerüsts und bei der Differenzierung mesenchymaler Stammzellen zu Chondrozyten und Osteoblasten. [61] Neben BMP stimulieren Insulin Like Growth Factor (IGF), Fibroblast Growth Factor (FGF), Platelet-Derived Growth Factor (PDGF) und Vascular Endothelial Growth Factor die Proliferation und Differenzierung von Osteoblasten.[84]

Auch im Bezug auf die Fraktur- und Defektheilung spielen BMPs eine entscheidende Rolle. Die Arbeit von Bostrom zeigt das Potential der BMPs, Stammzellen zu rekrutieren und als chondrozytäre und osteoblastäre Zellen zu differenzieren.[14]

Hierbei wurde das Verteilungsmuster von BMP - 2 und - 4 in der Phase der Frakturheilung untersucht. So zeigen sowohl Zellen in der Nähe des Frakturspaltens wie auch die den neugebildeten Knochen umgebenden Osteoblasten ein positives immunhistochemisches Signal. Eine Reihe von weiteren in-vitro Experimenten konnte die Bedeutung der BMPs im Rahmen der Frakturheilung unterstreichen. So regt rekombinantes BMP-2 Osteoblasten zur Proliferation an, stimuliert die Synthese von Kollagen und Osteocalcin, veranlasst durch Chemotaxis Osteoblasten zur Migration und steigert die Expression von weiteren BMPs und extrazellulären Matrixproteinen. [145]

Präklinisch konnte in tier- und humanexperimentellen Studien die osteoinduktive Potenz von BMP gezeigt werden.[17; 53; 12; 13] Die histologischen Untersuchungen des durch BMP induzierten Knochens zeigte Remodelling- und Integrationsprozesse mit dem umgebenden Knochengewebe äquivalent der physiologischen Prozesse. Dies konnte auch im Rahmen der Anwendung im kieferchirurgischen Spektrum gezeigt werden.[17; 142; 64]

Auch die Alveolarkammaaugmentationsverfahren profitieren vom Einsatz rekombinan-



ten BMP-2.[16; 140] Besonders die Subgruppe der BMP-2 sind als endogener Mediator im Rahmen der Fraktur- und Knochendefektheilung unerlässlich und eine notwendige Komponente der Signalkaskade.[130]

Der klinische Einsatz von BMP-2 im Rahmen der Frakturheilung wurde in einer Phase-II-Studie bei offenen Tibiaschaftfrakturen erprobt. Die Anwendung von BMP-2 direkt in der Fraktur erfolgt mittels „Dibotermine  $\alpha$ “, einem Implantations-Kit mit humanem, rekombinantem BMP-2 und einer Matrix aus Rinderkollagen als Trägermaterial. In der prospektiv, kontrolliert und randomisierten Studie mit 450 Patienten (BESTT) zeigte sich eine Signifikanz im Bezug auf die Geschwindigkeit der Heilung der Tibiafraktur als auch auf die geringere Rate an revidierenden Eingriffen zur Förderung der Frakturheilung. Bei der Implantation von „Dibotermine  $\alpha$ “ traten zudem weniger Infektionen auf.[59]

### 1.7.2 Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)

VEGF gehört zur Gruppe der Zytokine. Hierbei handelt es sich um eine heterogene Gruppe löslicher Proteine und Peptide, die als Mittel der interzellulären Kommunikation von verschiedensten Zellarten gebildet werden. Die Aktivität der Zielzellen wird koordiniert, indem Zytokine an spezifische hochaffine Rezeptoren binden und somit durch Reaktionskaskaden zellspezifische Aktionen auslösen.[65]

Das Zytokin VEGF wurde Anfang der 1980er Jahre durch Untersuchungen von Senger zuerst als ein Protein beschrieben, welches die Gefäßpermeabilität in der Haut von Meeresschweinchen steigert. Das Protein erhielt auf Grund dieser Eigenschaft den Namen VPF, vascular permeability factor.[119]

Weitere Arbeiten berichteten über die Reinigung und Sequenzierung eines endothelspezifischen Mitogens mit dem Namen VEGF und die Tatsache, dass es sich bei VPF und VEGF um das gleiche Molekül handelt.[52; 81]

VEGF spielt sowohl im Rahmen der Embryogenese als kardio-vaskulärer Wachstumsfaktor als auch im adulten Organismus eine wichtige Rolle.[25; 49] Durch VEGF wird die Angiogenese induziert, die Endothelzellen zur Proliferation angeregt und Apoptose

inhibiert. Durch die Stimulation der NO-Synthetase in Endothelzellen führt VEGF darüber hinaus zur Vasodilatation.[143; 50]

Die pathologische Expression von VEGF in Tumoren wird als Grund für die vermehrte Gefäßbildung und damit die notwendige Durchblutung zur Entwicklung von Tumoren gesehen.[51]

Die Bedeutung von VEGF während Ossifikationsprozessen war Gegenstand einer Reihe wissenschaftlicher Arbeiten. Grundsätzlich konnte die Bedeutung von VEGF bezüglich der chemotaktischen Migration von humanen Osteozyten und der Maturation von neu entstandenem Kallus gezeigt werden.[90; 124]

VEGF scheint als Wachstumsfaktor der Angiogenese besonders in den frühen Stadien der Knochenbildung und -heilung wichtig zu sein und nicht nur im Knochen die Angiogenese, sondern auch den Knochenersatz und den Knochenumsatz zu fördern.[101]

### 1.7.3 Vascular Endothelial Growth Factor Rezeptoren

Kurz nach der Entdeckung von VEGF wurden auch dessen Rezeptoren identifiziert.[135]

Die Rezeptoren besitzen sieben immunoglobulinartige Domänen im extrazellulären Anteil und sind durch einen intrazellulären Tyrosinkinase-spaltenden Anteil als Untergruppe der Tyrosinkinase-Rezeptoren charakterisiert.[36; 128; 54] Zu der Gruppe der VEGF-Rezeptoren gehören drei Rezeptoren, von denen VEGFR-1 und VEGFR-2 im Rahmen dieser Arbeit näher untersucht wurden. VEGFR-3 wird nur in Lymphgefäßen exprimiert und bindet spezielle VEGF Isoformen.[72]

#### 1.7.3.1 Vascular Endothelial Growth Factor Rezeptor 1 (VEGFR-1)

Vorwiegend wird der VEGF-Rezeptor 1, auch Flt-1 genannt, auf Endothelzellen exprimiert. Des Weiteren zeigen Trophoblastenzellen, Monozyten und renale Mesangiumszellen Expression von VEGFR-1.[37; 28; 127; 8]

Im Rahmen der Knochenheilung kommt der Rezeptor weiterhin auf Osteoprogenitor-

---

zellen und Osteoblasten vor.[38; 132]

### 1.7.3.2 Vascular Endothelial Growth Factor Rezeptor 2 (VEGFR-2)

Der VEGF-Rezeptor 2, auch Flk-1 genannt, wird ebenfalls vor allem auf Endothelzellen gefunden.[128] Eine Expression des Rezeptors zeigt sich noch auf hämatopoetischen Stammzellen, Megakaryozyten, retinalen Vorläuferzellen und Tumorzellen, wie beispielsweise beim Malignen Melanom.[58; 74; 144]

Besonders VEGFR-2 scheint für die Induktion der Endothelzellproliferation wichtig zu sein, wie durch VEGF-Mutanten, die selektiv entweder an VEGFR-1 oder VEGFR-2 binden, gezeigt werden konnte.[77]

Im Gegensatz zu VEGFR-1 wird VEGFR-2 bei Ossifikationsprozessen lediglich in Endothelzellen und nicht auf Osteoblasten exprimiert.[132]

### 1.7.4 Von-Willebrand-Faktor (vWF)

Der von-Willebrand-Faktor (vWF) spielt als multimeres Glykoprotein eine wichtige Rolle in der primären Hämostase. Entsteht ein vaskulärer Defekt, so dient der vWF als molekulare Brücke zwischen den Thrombozyten und dem Subendothelium und führt somit zur Bildung einer Thrombozytenaggregation und in der Folge zur Eindämmung der Blutung.[39]

Die Adhäsion von subendothelial gelegenen vWF mit unstimulierten Thrombozyten wird durch GPIIb und GPIIb/IIIa, spezifische Glykoproteine der Thrombozytenmembran vermittelt.[118]

Auch hämodynamischer Scherstress führt zur Aktivierung von Thrombozyten. Ligand der entstehenden Thrombozytenaggregationen ist Fibrinogen, oder bei höherem Scherstress vWF.[92]

Des Weiteren transportiert und stabilisiert vWF den Faktor VIII im Plasma. Wahrscheinlich schützt der vWF den Faktor VIII vor proteolytischem Abbau oder er moduliert die proteolytische Aktivierung des Faktor VII.[11]

Synthetisiert wird der vWF ausschließlich in Endothelzellen und gilt damit als pro-

agnostischer Marker für endotheliale Dysfunktionen. In der Literatur ist die Rolle des vWF als Marker der Endothelidentifikation und endothelialen Dysfunktion weithin belegt. [83; 86; 27]

### 1.7.5 Stickstoffmonoxid (NO)

Stickstoffmonoxid (NO) ist ein farbloses und in Wasser nur wenig lösliches Gas, das seit den Arbeiten von Arnold et al. in den 1970er Jahren nicht wie lange angenommen als Zellgift, sondern als spezifischer Aktivator der löslichen Guanylatcyclase Bedeutung erlangte.[5]

Aufgrund seiner gefäßrelaxierenden Wirkung schon länger bekannt und auch in Nitroverbindungen therapeutisch genutzt war der Endothelium Derived Relaxing Factor (EDRF). Dass EDRF mit NO identisch ist, konnte in den 1980er Jahren gezeigt werden. Damit wurde erstmals eine niedermolekulare und darüber hinaus gasförmige Substanz gefunden, die eine hormonähnliche Wirkung ausübt.[56; 102; 66]

Die Bedeutung von NO für eine Vielzahl von physiologischen Prozessen wie der Regulation des Gefäßtonus, der unspezifischen Immunabwehr oder der Funktion von Neuronen in peripheren und zentralen Abschnitten des Nervensystems konnte in zahlreichen Arbeiten ermittelt werden.[93]

In Bezug auf den Knochenmetabolismus wird NO mit der Inhibition von Osteoklasten und der Stimulation der Osteogenese in Verbindung gebracht.[24]

Des Weiteren kann NO seine Wirkung neben dem NO / cGMP-Weg auch direkt oder nach Reaktion mit reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und der Bildung von Peroxynitrit entfalten.[60] ROS sind in die Regulation von Osteoklasten und Osteoblasten einbezogen.[108]

#### 1.7.5.1 Stickstoffmonoxid-Synthasen (NOS)

NO wird im Körper von Stickstoffmonoxid-Synthasen (NOS) durch eine NADPH-abhängige Oxidation der Guanidino-Stickstoffgruppe des L-Arginin mit Hilfe von molekularem Sauerstoff synthetisiert.[88; 19] NO wird den drei verschiedenen Isoformen

---

eNOS auch NOS III, iNOS auch NOS II und nNOS auch NOS I produziert.

Die Darstellung der verschiedenen Isoformen mit Hilfe der Immunhistochemie ist eine etablierte Methode in der molekularen Zellbiologie. [26] In dieser Arbeit finden Antikörper gegen eNOS und iNOS Verwendung.

#### 1.7.5.1 Endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS)

Vermehrte Expression von endothelialer NOS wird vor allem in den kortikalen Blutgefäßen und Osteozyten im Rahmen der frühen Frakturheilung beobachtet.[30] In Untersuchungen zur Osteoklasten vermittelten Knochenresorption des Alveolarkamms findet sich ebenfalls eine starke Expression von eNOS in Osteoklasten, was für die Bedeutung von NO im Rahmen der Regulation der Osteoklasten spricht.[79]

#### 1.7.5.2 Induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS)

Induzierbare NOS wird vor allem in der späteren Phase der Frakturheilung in enostalen Osteoblasten und Chondroblasten exprimiert.[30]

Die Expression von iNOS erhöht sich in Fällen inflammatorischer Erkrankungen des Knochens.[4] Auch eine Bedeutung in der Regulation der Frakturheilung wurde beschrieben.[40]

### 1.8 Zielsetzung der Arbeit

Auf Grund der unvorhersehbaren und nicht steuerbaren Atrophie nach der Transplantation von autologem Knochen sollen Mechanismen, welche die Resorption beeinflussen, in dieser Arbeit auf zellulärer Ebene, immunhistochemisch untersucht werden.

Hierbei wird der Schwerpunkt nicht auf der Untersuchung des Knochentransplantates selbst, sondern des knöchernen Transplantatlagers liegen. Dies ist in vergangenen Untersuchungen bisher wenig beachtet worden.[110]

Die unterschiedlichen Konditionierungen des Transplantatlagers und die damit einher-

---

gehenden Veränderungen der Knochenumbauvorgänge werden in dieser Arbeit näher untersucht.

Bei allen Knochenneubildungs- und –umbauprozessen, wie sie etwa bei der Frakturheilung aber auch bei Knochenerkrankungen auftreten, kommt es zu einer Änderung des physiologischen Gleichgewichtes zwischen Proliferation und Apoptose im Knochen. Hierzu soll Folgendes näher untersucht werden:

1. Die Rolle von BMP als Wachstumsfaktor und Osteoinduktor, um Veränderungen des physiologischen Gleichgewichtes in Knochen darzustellen.
2. VEGF als Proliferationsfaktor der Angiogenese und seinen Einfluss auf Revaskularisierungsprozesse und damit die erfolgreiche Einheilung des Knochentransplantates. Darüberhinaus soll die Bedeutung von VEGF für den Knochenersatz sowie den Knochenumbau herausgestellt werden.
3. Die VEGF Rezeptor-Isoformen VEGFR-1 und VEGFR-2 als Endothelzellmarker, um Revaskularisierungsprozesse im Rahmen der Knochenheilung zu verdeutlichen.
4. Die Rolle des von-Willebrand-Faktors ebenfalls als Marker des Endothels, um Angiogenesevorgänge herauszustellen.
5. Stickstoffmonoxidsynthetase (NOS) als weiteres Signalmolekül der Angiogenese in seinen Isoformen eNOS und iNOS sowie deren Bedeutung für das Knochenwachstum als Regulatoren der Osteogenese.

Im Rahmen dieser Arbeit wird die Bedeutung der einzelnen untersuchten Moleküle für die Steuerung der Knochenentwicklung und –regeneration in Abhängigkeit der jeweiligen Konditionierungen des Transplantatlagers mit besonderem Augenmerk auf Vaskularisationsprozesse in den folgenden Kapiteln dargestellt.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte

Absaugpumpe	Hartenstein
Laborwaage	Kern KB
Tischzentrifuge	Labnet
Lichtmikroskop	Leica – Leitz DM RBE/RD
Digitalkamera	Olympus - Camedia C - 4040 Zoom
pH-Meter	inoLab
Pipetten	Eppendorf
Pipettierhilfe (accu-jet <sup>®</sup> )	Hartenstein

#### 2.1.2 Verbrauchsmittel

Magnetrührstäbchen	Hartenstein
Filterpapier	Schleicher & Schuell (Hartenstein)
Objektträger Glas (Elka)	Assistent (Hartenstein)
Deckgläser	Hartenstein
Fettstift (Pap Pen)	G. Kisker
Plastikschälchen	Hartenstein

Löffel	Hartenstein
Glasgefäße	Hartenstein
Einmalpipetten aus Plastik, 10 ml (Cellstar <sup>®</sup> )	Greiner
Pasteurpipetten aus Glas	Brand
Einmal-Pasteurpipetten aus PE, 3 ml	Hartenstein
Verschlussfolie (Parafilm <sup>®</sup> )	Amer. National Can (Hartenstein)

### 2.1.3 Chemikalien

Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	Merck
Destilliertes Wasser (Aqua dest.)	Uni Würzburg
Kochsalz (NaCl)	Roth
Salzsäure (HCl)	Riedel-de Haën
Diaminobenzidin (DAB)	Sigma
Dinatrium-Hydrogenphosphat-Dihydrat	Roth
Natrium-Dihydrogenphosphat-Monohydrat	Noras
Ammoniumchlorid	Merck
Nickel-II-Sulfat	Merck
β-D-Glukose	Merck
Glukose-Oxidase	Sigma



---

Xylol	Roth
Ethanol (100%, 96% und 70%)	SAP
Wasserstoffperoxid	Merck
Methanol	J. T. Baker
Triton X-100	Schwarz/Mann Biotech
Rinderalbumin (BSA)	PAA Laboratories
Horseradish-Peroxidasekomplex	GE Healthcare UK Limited
Enthelan	Merck

#### 2.1.3.1 Ansatz von 0,05 M TBS, pH 7,6

6,057 g Tris(hydroxymethyl)-aminomethan in ca. 250 ml Aqua dest. lösen; 8,766 g NaCl (= 150 mM) dazugeben und mit 1 M HCl = 80 ml auf pH 7,6 einstellen. Anschließend mit Aqua dest. auf 1000 ml auffüllen und dabei den pH-Wert kontrollieren.

#### 2.1.3.2 Ansatz von Phosphatpuffer (PB) 0,1 M, pH 7,4

Der PB wird für die Entwicklung mit DAB benötigt. Es werden 14,4 g/l Dinatrium-Hydrogenphosphat-Dihydrat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ ) und 2,6 g/l Natrium-Dihydrogenphosphat-Monohydrat ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ ) zusammengegeben und ein pH-Wert von 7,4 eingestellt.

### 2.1.3.3 Ansatz der DAB-Lösung

Ansatz der Substanzen für die Diaminobenzidin (DAB) -Entwicklung zum

Aliquotieren:

DAB	5000 mg in 100 ml Aqua dest.
NH <sub>4</sub> Cl	4000 mg in 100 ml Aqua dest.
NiSO <sub>4</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	130 mg in 10 ml Aqua dest.
10% Glukose	10 g β-D-Glukose in 100 ml Aqua dest.
Glukose-Oxidase	1,2 mg in 1 ml Aqua dest.

In 15 ml 0,1 M PB (pH 7,4) werden 150 µl DAB-Lösung (= 7,5 mg), 150 µl NH<sub>4</sub>Cl (= 6 mg), 300 µl NiSO<sub>4</sub> (= 0,05 M), 300 µl 10% Glukose sowie 50 µl Glukose-Oxidase gelöst. Da die Lösung anschließend trüb wird, muss sie filtriert werden.

### 2.1.4 Antikörper

ECL Streptavidin biotylated Horseradish Peroxidase complex, Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg

Biotinylated Goat Anti-Rabbit Immunglobulins Code No. E 0432, DakoCytomation, Glostrup, Denmark

Polyclonal Goat Anti-Mouse Immunglobulins/Biotinylated Code No. E 0433, DakoCytomation, Glostrup, Denmark

VEGFR-1 (N-term) Rabbit Monoclonal Antibody, Clone ID: Y-103, No. C04309, Epitomics Inc., Burlingame, CA, USA

Rabbit anti-Human Flk-1 Receptor Tyrosine Kinase (KDR, VEGFR2), No. F4565-09,  
United States Biological, Swampscott, MA, USA

Rabbit ant-Human Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), No. V2110-13B,  
United States Biological, Swampscott, MA, USA

Monoclonal Anti-human Pro-BMP-2 Antibody, No. MAB2260, R&D Systems,  
Minneapolis, MN, USA

Polyclonal Rabbit Anti-Human Von Willebrand Factor, Code-No. A 0082,  
DakoCytomation, Glostrup, Denmark

Anti-iNOS, Inducible Nitric Oxide Synthase, rabbit polyclonal antibody, No. SA-200,  
BIOMOL International, Hamburg

Anti-eNOS, Endothelial Nitric Oxid Synthase, rabbit polyclonal antibody, No. SA-201,  
BIOMOL International, Hamburg

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Vorarbeiten

#### 2.2.1.1 Tierexperimentelle Untersuchungen im Schafmodell

Die immunhistochemischen Untersuchungen dieser Arbeit sind im Rahmen einer Teilstudie der tierexperimentellen Untersuchungen von Reuther über die Qualität des autologen Knochentransplantates und Transplantatlagern in der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie zu sehen.[110] Aus der Arbeit von Reuther stammen auch die untersuchten histologischen Proben, so dass hier nur kurz auf die Versuchsbedingungen eingegangen werden soll.

#### 2.2.1.1.1 Versuchstiere und Methode

Es wurden insgesamt sechzehn erwachsene Schafe mit einem Durchschnittsgewicht von  $73,6 \pm 8,6$  kg, welche unter standardisierten und von der Ethikkommission und Bezirksregierung genehmigten Laborbedingungen gehalten wurden (Antragsnummer 50.203.2 K43, 36/01), eingesetzt. Die Schafe wurden auf vier Gruppen für vier Euthanasiezeitpunkte mit jeweils vier Tieren randomisiert. Die Euthanasie der Tiere erfolgte nach jeweils vier, acht, zwölf und sechzehn Wochen.

#### 2.2.1.1.2 Anästhesie der Versuchstiere

Die Anästhesie wurde mit 2% Propofol per inhalationem begonnen. Nach Intubation wurde die Vollnarkose mit Isofluran, Sauerstoff, Propofol 2% und Midazolam aufrechterhalten. Antibiotisch wurden die Versuchstiere peri- und postoperativ für drei Tage mit Penicillin s.c. behandelt. Die Analgesie erfolgte postoperativ bis zum dritten Tag mit Rimadyl s.c..

Alle operativen Maßnahmen erfolgten unter rein aseptischen Bedingungen.

#### 2.2.1.1.3 Gewinnung von kortikospongiösem Beckenspan

Die Entnahme der bikortikalen Knochenstücke erfolgte mit Hilfe einer oszillierenden Stichsäge unter Wasserkühlung. Die ca.  $5 \text{ cm}^2$  großen Knochenstücke wurden von Periostanteilen befreit und bis zur weiteren Verwendung in einem sterilen mit Kochsalz getränkten Tupfer aufbewahrt. Der Wundverschluss erfolgte vierschichtig mit Vicryl und anschließendem Sprühverband.

#### 2.2.1.1.4 Transplantation des Knochenspans auf den lateralen Unterkiefer

Nach Vorbereitung des Operationsfeldes durch Rasur im Bereich des horizontalen Unterkieferastes und anschließender Desinfektion mit Cutasept® F, erfolgte durch die

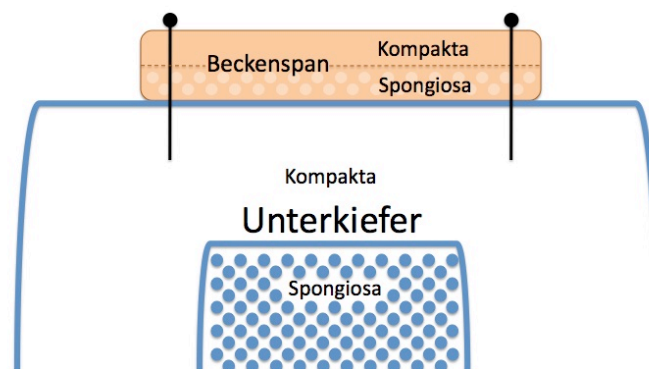
Inzision des gesamten Unterkieferbasalrandes die Darstellung des Unterkiefers von der Eckzahnregion bis kurz vor den M. masseter. Nach Blutstillung und schichtweiser Präparation stellte sich die laterale Fläche des Unterkiefers als Transplantatlager dar. Die zuvor gewonnenen bikortikalen Knochenstücke wurden nun unter Wasserkühlung mit Hilfe der Stichsäge in vier bis sechs gleich große monokortikale Knochenstücke unterteilt. Nach entsprechender Konditionierung des Transplantatlagers wurden die monokortikalen Späne nun mittels zweier Titan-Mikroschrauben (10 mm x 1,5 mm) spongiosaseitig auf der Kortikalis des Unterkiefers befestigt. Der Wundverschluss erfolgte regelgerecht zweischichtig mit Vicryl und anschließendem Sprühverband.

#### 2.2.1.2 Konditionierungen des Transplantatlagers

Zur Konditionierung wurde das Transplantatlager wie folgt vorbehandelt:

##### 2.2.1.2.1 Konditionierung 1: Kortikospongiosa (KS)

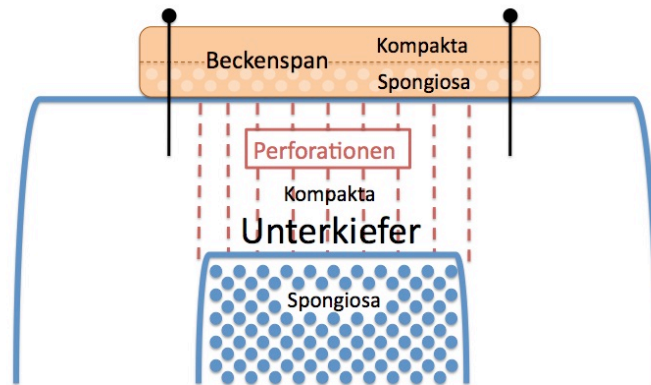
Der monokortikale Knochenspan wurde spongiosaseitig mittels Titan-Mikroschrauben am lateralen Unterkiefer fixiert und diente als Kontrolle. (siehe Abb. 3)



**Abbildung 3: Schema Konditionierung 1  
Kortikospongiosa mit Schraubenfixation**

### 2.2.1.2.2 Konditionierung 2: Perforation des Transplantatlagers (Anfr)

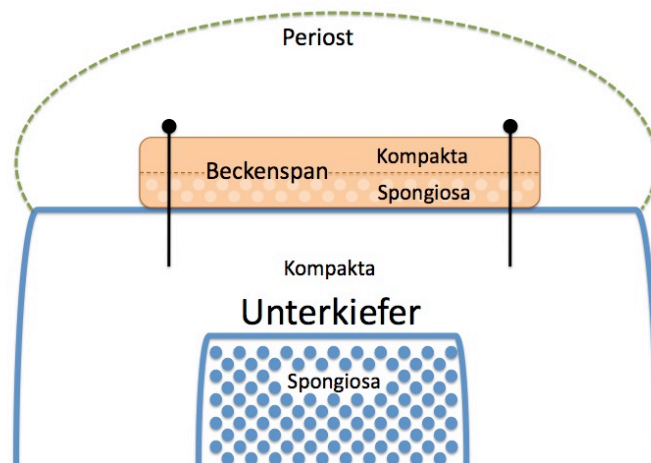
Die Außenkortikalis des Transplantatlagers wurde mit einem Rosenbohrer an etwa acht bis zehn Stellen perforiert und somit die Spongiosaräume des Transplantatbettes eröffnet. Der monokortikale Knochenspan wurde anschließend spongiosaseitig mit zwei Titan-Mikroschrauben fixiert (siehe Abb. 4).



**Abbildung 4: Schema Konditionierung 2**  
Perforation des Transplantatlagers mit Schraubenfixation

### 2.2.1.2.3 Konditionierung 3: Periostexzision (PeriostX)

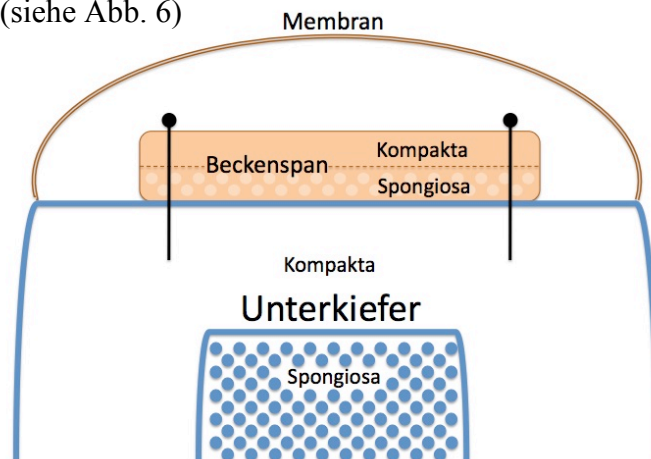
Nach Schraubenfixation des Transplantates wurde das Periost exzidiert. Es erfolgte keine Perforation des Unterkiefers wie in Konditionierung 2. (siehe Abb. 5)



**Abbildung 5: Schema Konditionierung 3**  
Periostexzision mit Schraubenfixation

#### 2.2.1.2.4 Konditionierung 4: Periostverstärkung (Rmem)

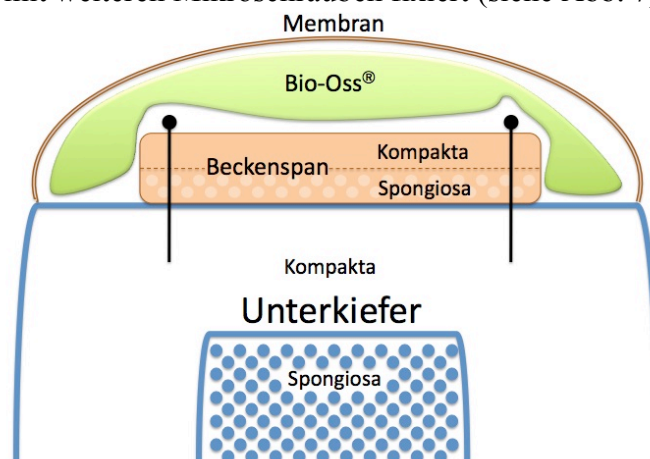
Das Periost wurde belassen und das Knochentransplantat mit einer resorbierbaren Kollagen-Membran (Bio-Gide®) gedeckelt. Die Membran wurde mit weiteren Mikroschrauben fixiert. (siehe Abb. 6)



**Abbildung 6: Schema Konditionierung 4  
Membran mit Schraubenfixation**

#### 2.2.1.2.5 Konditionierung 5: Bio-Oss® (BioOss)

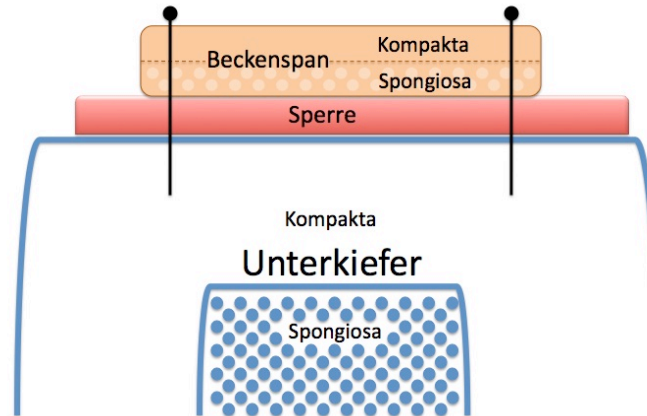
Bei dieser Konditionierung wurde das fixierte Transplantat mit Bio-Oss® Spongiosa Granulat (0,25 – 1,0 mm) und einer resorbierbaren Bio-Gide® Membran abgedeckt. Die Membran wurde mit weiteren Mikroschrauben fixiert (siehe Abb. 7).



**Abbildung 7: Schema Konditionierung 5  
Membran mit Schraubenfixation und Bio-Oss®**

#### 2.2.1.2.6 Konditionierung 6: Silikonmembran (Sperre):

Hier wurde zwischen dem Transplantatbett und dem Beckenspan eine undurchlässige Silikonmembran eingebracht (siehe Abb. 8).



**Abbildung 8: Schema Konditionierung 6  
Silikonmembran mit Schraubenfixation**

Diese sechs Konditionierungen wurden gleichmäßig auf die Versuchstiere verteilt, so dass zu jedem Euthanasiezeitpunkt nach vier, acht, zwölf und sechzehn Wochen für jede Konditionierung eine Probe vorlag und ausgewertet werden konnte. Um Variationen bei der Operationstechnik zu vermeiden, wurden alle Eingriffe vom selben Operateur vorgenommen, anhand des gleichen Protokolls ausgeführt und fotodokumentarisch festgehalten.

### 2.2.1.3 Gewinnung der Proben

#### 2.2.1.3.1 Euthanasie der Versuchstiere

Nach den vorbestimmten Einheitszeiten (vier, acht, zwölf und sechzehn Wochen) wurde bei den Versuchstieren mittels Propofol 2% eine Narkose eingeleitet und die Schafe mit einer Überdosis Narcoren (40 ml) euthanasiert. Zudem wurde den Tieren 7 ml Liquemin® N 25000 (=37.500 I.E.) i.v. im Sinne einer Antikoagulation verabreicht.



### 2.2.1.3.2 Fixation der Präparate

Auf Grund der Größe der gewonnenen Proben und der teilweise sehr dichten Knochenstruktur konnte eine adäquate Fixation nur durch Perfusion und anschließende Immersion erreicht werden.

Unmittelbar nach Tötung der Tiere wurde zu diesem Zweck beidseits ein kleinlumiger Katheter in die A. carotis communis und in die V. jugularis interna eingeführt. Nach Abtrennung des Schädels vom Rumpf wurde dieser solange mit Kochsalzlösung (NaCl 0.9%; 3 Liter) gespült, bis ein klarsichtiger Rückfluss über die V. jugularis interna zu erkennen war. Anschließend erfolgte die Perfusionsfixation des gesamten Schädels mit Paraformaldehyd (pH 7,4; 2 Liter) in 0,1% PBS.

Nach Präparation des Unterkiefers konnten nun die Proben durch Osteotomie unter stetiger Kühlung mit Kochsalzlösung gewonnen werden. Die Proben wurden mittig in zwei gleich große Stücke unterteilt. Die in dieser Arbeit verwendeten Knochenproben wurden daraufhin für zwei Tage in 4%-igem Paraformaldehyd in 0,1% PBS immersionsnachfixiert.

## 2.2.2 Immunhistochemische Untersuchungen

### 2.2.2.1 Entkalkung und histologischer Schnitt

Für die immunhistochemischen Untersuchungen wurden die Formalin-fixierten Proben mit 10% iger Ameisensäure  $\text{CH}_2\text{O}_2$  entkalkt. Je nach Probenvolumen war hierfür ein Zeitraum von vier bis fünf Wochen nötig.

Zur Entwässerung erfolgte anschließend die Immersion in aufsteigender Alkoholreihe (70%, 96%, 100%) für jeweils zwei Minuten und die Immersion in Xylol für weitere fünf Minuten. Nach exakter Ausrichtung der Proben wurden diese in Paraffin eingebettet und mittels Mikrotom (Leica RM 2255) auf Schichtdicken von  $10\mu\text{m}$  geschnitten

und auf gläserne Objektträger aufgezogen.

#### 2.2.2.2. Immunhistochemische Färbungen

Das Entparaffinieren erfolgte für zehn Minuten in Xylol gefolgt von jeweils fünf Minuten in absteigender Alkoholreihe (100%, 96%, 70%). Danach wurden die Schnitte in Aqua dest. oder Tris gepufferter Salzlösung (0,05 mol, pH=7,6) gespült. Bei den Färbungen mit Antikörpern gegen VEGF und seine Rezeptoren wurden die Schnitte in einer Zitrat-Pufferlösung (pH=7) rehydriert und für zwölf Stunden im Pufferlösung im Wasserbad bei 60°C gelagert.

Mit Hilfe eines Pap Pens wurden die Proben auf den Objektträgern umrandet und anschließend drei mal zehn Minuten mit TBS gewaschen. Um die endogene Peroxidase zu hemmen und falsch positive Ergebnisse zu vermeiden, wurden die Proben für 20 Minuten in 200ml Methanol und 50 ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> belassen. Es erfolgte wiederum ein Waschen der Schnitte mit TBS für zweimal zehn Minuten. Im nächsten Schritt wurden durch die zehn minütige Behandlung mit 0,5 M Ammoniumchlorid zum Einen die Aldehydvernetzungen aufgelöst und das Gewebe somit maskiert, sowie durch die Behandlung mit 0,25 % TritonX in TBS die Permeabilität der Zellmembran erhöht. Anschließend wurden die Proben erneut mit TBS gewaschen.

Um die nicht benötigten Antigene zu blockieren, wurden die Proben sechzig Minuten mit 5% igem Rinderserum Antikörper (Bovine Serum Antibody, BSA) inkubiert. Anschließend erfolgte die Behandlung mit dem primären Antikörper in der jeweiligen, vorher experimentell festgelegten Verdünnung. (siehe Tabelle 3)

**Tabelle 3: Übersicht der verwendeten Antikörper**

Antikörper	Spezies	Lagerung	Verdünnung mit TBS	Vorbehandlung mit Citrat-Puffer	Firma
vWF	rabbit	2-8 °C	1:200	Nein	Dako
iNOS	rabbit	-20 °C	1:1000	Nein	Biomol
eNOS	rabbit	-20 °C	1:1500	Nein	Biomol
BMP-2	mouse	-20 °C	1:200	Nein	R & D
VEGF	rabbit	4 °C	1:400	Ja	USBiological
VEGF R1	rabbit	-20 °C	1:400	Ja	Epitomics
VEGF R2	rabbit	4 °C	1:400	Ja	USBiological

Der Antikörper wurde in 0,8% BSA für 24 Stunden bei 4°C mit den Proben inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Schnitte zunächst viermal jeweils zehn Minuten mit TBS gespült und für sechzig Minuten mit dem Sekundärantikörper behandelt.

Nach erneutem, viermalig zehnminütigem Waschen mit TBS wurde ein Streptavidin-biotinierter Meerrettich-Peroxidase Komplex (Streptavidin-biotinylated horseradish peroxidase complex, Amersham Biosciences, Freiburg) in der Verdünnung 1:150 für 60 Minuten hinzugegeben und anschließend wieder mit TBS gewaschen.

Die Entwicklung der Schnitte erfolgte mittels DAB-Lösung:

- 150 µl Diaminobenzidine
- 150 µl Ammoniumchlorid (NH<sub>4</sub>Cl)
- 300 µl Nickelsulfat (NiSO<sub>4</sub>)
- 300 µl 10% Glucose
- 50 µl Glucoseoxidase

auf 15 ml Phosphatpuffer (PB) 0,1 mol [pH=7,4]

- 14,4 g/l Dinatrium-Hydrogenphosphat-Dihydrat (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2H<sub>2</sub>O)
- 2,6 g/l Natrium. Dihydrogenphosphat-Monohydrat (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> x H<sub>2</sub>O)

Die Entwicklung des Reaktionsproduktes wurde unter dem Lichtmikroskop im Vergleich zur Negativkontrolle beobachtet und mit der Zugabe von TBS gestoppt. Die Zeit wurde gestoppt und dokumentiert, um bei Nachfärbungen die Standardisierung zu gewährleisten. (siehe Tabelle 4)

**Tabelle 4: Antikörper und Sekundärantikörper**

<b>Antikörper</b>	<b>Sekundärantikörper</b>	<b>Verdünnung Sekundär AK</b>	<b>Entwicklungszeit</b>
vWF	<b>anti-rabbit</b>	<b>1:400</b>	<b>30 Minuten</b>
eNOS	<b>anti-rabbit</b>	<b>1:400</b>	<b>12 Minuten</b>
iNOS	<b>anti-rabbit</b>	<b>1:400</b>	<b>8 Minuten</b>
BMP-2	<b>anti-mouse</b>	<b>1:400</b>	<b>30 Minuten</b>
VEGF	<b>anti-rabbit</b>	<b>1:400</b>	<b>30 Minuten</b>
VEGF R1	<b>anti-rabbit</b>	<b>1:400</b>	<b>30 Minuten</b>
VEGF R2	<b>anti-rabbit</b>	<b>1:400</b>	<b>30 Minuten</b>

Nach erneutem Waschen mit TBS wurden die Schnitte in aufsteigender Alkohol-Reihe mit 70%, 96% und 100% Alkohol jeweils fünf Minuten entwässert. Abschließend erfolgte noch die zehn-minütige Dehydratation in Xylol und das Eindecken der Objektträger mit Enthelan.

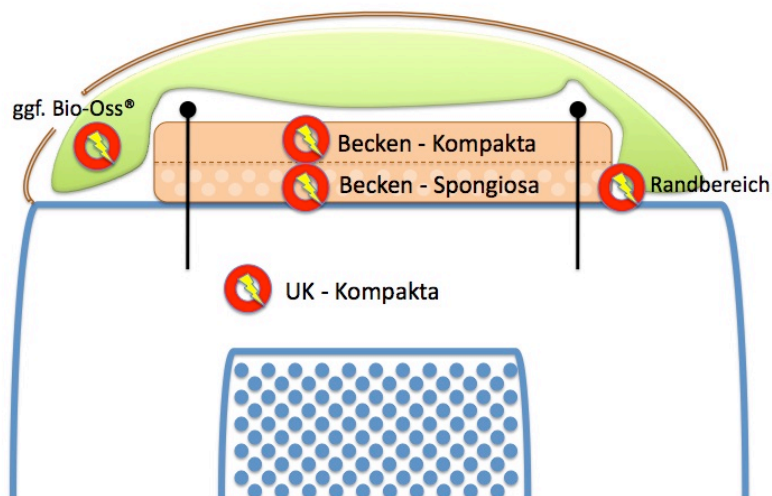
Bei jedem Antikörper wurde eine Kontrollprobe mitgefärbt, die bis auf die Inkubation mit dem primären Antikörper alle anderen Schritte des Protokolls ebenfalls durchlaufen hatte.

## 2.2.3 Auswertung

### 2.2.3.1 Erstellung der Fotografien

Um die Aktivität der einzelnen Antikörper auf den histologischen Schnitten beurteilen zu können, wurden zunächst einzelne *regions of interest* (ROIs) definiert. (siehe Abb. 9) Bei den Konditionierungen mit der Verwendung von Bio-Oss® wird fünf, bei den anderen Konditionierungen 4 ROIs definiert.

Anschließend wurden die ROIs auf den insgesamt 168 Präparate (4 Zeitpunkte x 6 Konditionierungen x 7 Antikörper) mit Hilfe des Leica Durchlichtmikroskopes Leica – Leitz DM RBE/RD und der korrespondierenden Kamera Olympus - Camedia C-4040Zoom abfotografiert und zur Auswertung Fotografien mit hundertfacher Vergrößerung erstellt. Die Einstellung des Mikroskopes und der Kamera wurden während der Bildacquire nicht verändert.



**Abbildung 9: Schema ROIs**

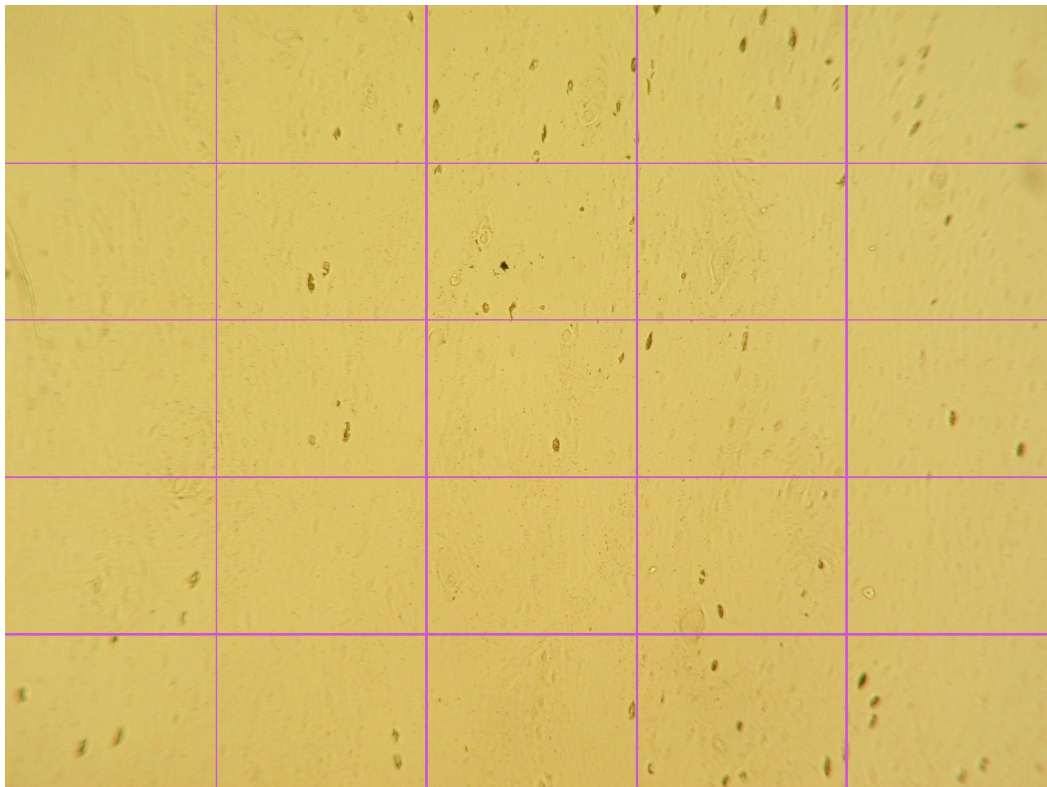
Hierbei wurden die Unterkieferkompakta fotografiert, sowie im Bereich des Transplantates die Beckenkompakta und die Beckenspongiosa, sowie ein Ausschnitt aus dem Randgebiet. Bei der Konditionierung 5, bei der Bio-Oss® Spongiosa Granulat zur Verwendung kam, wurde zusätzlich der Bereich des alloplastischen Materials doku-

mentiert, so dass pro Präparat vier bzw. fünf Bilder ausgewertet werden konnten.

### 2.2.3.2 Auswertung der Fotografien

Die entstandenen Fotografien wurden am Computer mit einem Gitternetz versehen und somit in 25 Einzelfelder unterteilt. (siehe Abb. 10)

Die Auswertung der einzelnen Parzellen des Präparates erfolgte mit Hilfe eines Auswertungsbogens.



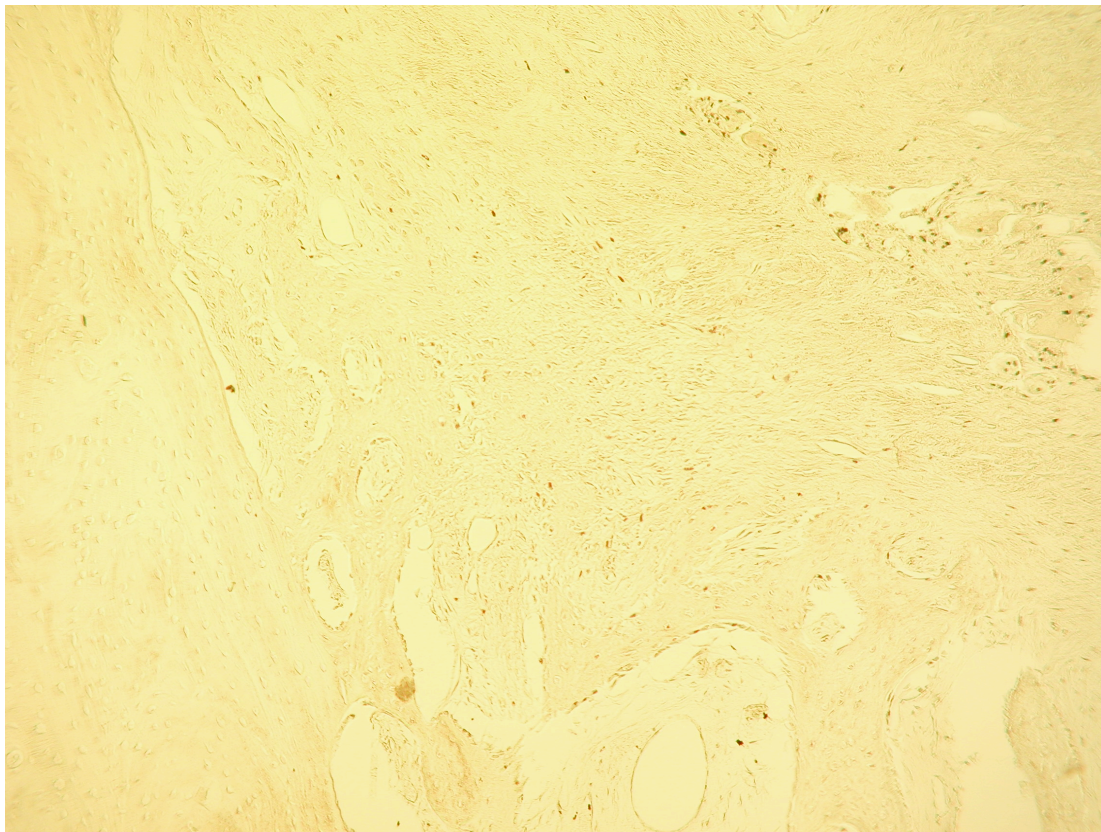
**Abbildung 10: Präparat mit Gitternetz**

Hierbei wurde zum Einen die Positivität der Färbung (POS) in den einzelnen Feldern kategorisiert, sowie die Färbintensität (FI) der gesamten ROI bestimmt. Die Positivität der 25 Gesichtsfelder wurde anschließend für das gesamte Präparat errechnet. Ab-

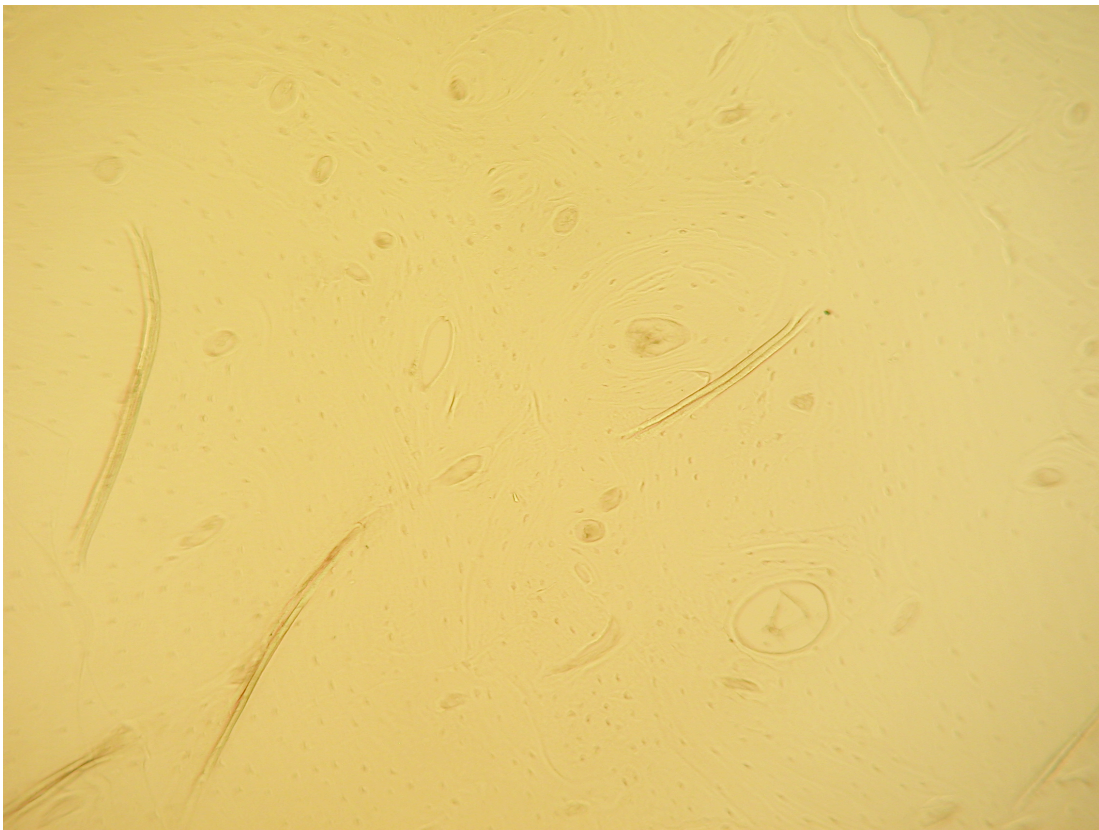
bildungen 10 und 11 verdeutlichen die Zuordnung von Intensitätswerten, Tabelle 5 die Kategorisierung dieses semiquantitativen Verfahrens.

**Tabelle 5: Semiquantitative Auswertung**

<b>Positivität (POS)</b>	<b>Punkte</b>	<b>Färbeintensität (FI)</b>	<b>Punkte</b>
0 – 5 %	0	Keine	0
> 5 – 20 %	1	Schwach	1
> 20 – 50 %	2	Mittel	2
> 50 – 100 %	3	Stark	3



**Abbildung 11: Beispiel für eine starke Positivität und Intensität in der immunhistochemischen Färbung für iNOS (Einheitszeit 4 Wochen, Konditionierung KS, ROI Übergangsbereich)**



**Abbildung 12: Beispiel für eine schwache Positivität und Intensität der immunhistochemischen Färbung auf iNOS (Einheitszeit 16 Wochen, Konditionierung Sperre, ROI Beckenspongiosa)**

Bei der Auswertung wurden nur die Gesichtsfelder miteinbezogen, in denen eindeutig ossäre Strukturen zu erkennen waren. Alle anderen Felder wurden als nicht auswertbar und nicht etwa als nicht gefärbt klassifiziert und somit auch in der Zusammenschau der Einzelwerte nicht berücksichtigt.

Die insgesamt 700 Fotografien wurden zunächst vom Verfasser anhand der oben genannten Kriterien quantitativ ausgewertet. Eine zusätzliche quantitative Auswertung erfolgte von einem weiteren geschulten Auswerter. Darüber hinaus wurden in einem zweiten Schritt im Rahmen der qualitativen Auswertung die unterschiedlichen Zellstrukturen und ihre Färbung beurteilt.



#### 2.2.4 Auswertung und Statistik

Die gewonnenen Daten wurden zunächst tabellarisch zusammengefasst und aufbereitet. Die von den zwei Auswertern für die Positivität (POS) des gesamten Präparates gewonnenen Werte wurden multipliziert, und der Mittelwert wurde gebildet.

Gleiches erfolgte mit den Werten für die Färbeintensität (FI). Aus beiden Mittelwerten wurde anschließend durch Multiplikation der Immunoreaktive Score (IRS) errechnet.

$$\text{IRS} = [ ( \text{FI}_{\text{Auswerter1}} + \text{FI}_{\text{Auswerter2}} ) / 2 ] \quad \times \quad [ ( \text{POS}_{\text{Auswerter1}} + \text{POS}_{\text{Auswerter2}} ) / 2 ]$$

IRS [ Minimum = 0 ; Maximum = 9 ]

Die Näherung der Daten erfolgte auf zwei Kommastellen.

Der verwendete IRS ist eine für diese Daten adäquate Modifikation des Scores nach Remmele und Stenger, der ursprünglich für den immunhistochemischen Östrogenrezeptornachweis (ER-ICR) im Mammakarzinomgewebe entwickelt wurde.[109]

Die Daten wurden mit der Software SPSS für Mac (Version 17.0) ausgewertet.

Durch die klinische Auswertung der unterschiedlichen Konditionierungsverfahren konnte bereits gezeigt werden, dass Konditionierung 5, die Modifikation mit der resorbierbaren Bio-Gide® Membran sowie dem Bio-Oss® Spongiosa Granulat, die geringsten atrophischen Veränderungen zeigte.[110]

Konditionierung 6 (undurchlässige Silikonmembran) diene lediglich als Negativkontrolle und kommt beim Patienten nicht zum Einsatz. Sie wurde in die statistische Auswertung nicht miteinbezogen.

Auf Grund der Datenmenge und um den klinischen Aspekt zu berücksichtigen, wurde demnach der klinische Erfolg der Konditionierung 5 den Werten der Konditionierungen eins bis vier, also den Modifikationen, die klinisch die größte Atrophie zeigten, gegenübergestellt (siehe hierzu Tabelle 6).

**Tabelle 6: Zusammenfassung Konditionierungen**

<b>Konditionierung</b>	<b>Gruppe</b>
Konditionierung 1	Klin. Atrophie
Konditionierung 2	Klin. Atrophie
Konditionierung 3	Klin. Atrophie
Konditionierung 4	Klin. Atrophie
Konditionierung 5	Keine klin. Atrophie
Konditionierung 6	Kontrolle

Des Weiteren wurden die ROIs, wie in Tabelle 7 dargestellt, zu den drei Bereichen Transplantat (T), Transplantatlager (TL) und die Übergangszone (Ü) zusammengefasst. Tabelle 8 zeigt die Bündelung der Daten bezüglich der verschiedenen Einheitszeitpunkte in vivo zu einem frühen (Zeitpunkt 1) und einem späten (Zeitpunkt 2) Einheitszeitpunkt.

**Tabelle 7: Zusammenfassung ROIs**

<b>ROI</b>	<b>Gruppe</b>
Becken Kompakta	Transplantat
Becken Spongiosa	Transplantat
UK Kompakta	Transplantatlager
Übergangsbereich	Übergangsbereich

**Tabelle 8: Zusammenfassung Einheitszeitpunkte**

<b>Zeitpunkt 1</b>	<b>Zeitpunkt 2</b>
4 Wochen	12 Wochen
8 Wochen	16 Wochen

Die Gruppen „klinische Atrophie“ und „keine klinische Atrophie“ wurden einzeln für jeden der sieben verwendeten Antikörper bezüglich der Einheitszeitpunkte sowie der ROI ausgewertet.

Im Rahmen der statistischen Auswertung wurden zunächst neben dem Mittelwert die Standardabweichungen errechnet und Signifikanztests durchgeführt. Bei normalverteilten Daten wurde hierfür der t-Test und bei nicht normalverteilten Daten der Mann-

Whitney-Test herangezogen.

Der Levene-Test der Varianzgleichheit wurde im Vorfeld der t-Tests angewandt. Ist die Signifikanz des Levene-Tests größer als 0,05 das vorher festgelegte  $\alpha = 0,05$  sind die Varianzen gleich. Nicht gleich sind die Varianzen, wenn der Wert kleiner als  $\alpha$  ist. Auf Grund der großen Anzahl an Signifikanztests, sog. multiples Testen, wurde zudem das Signifikanzniveau angepasst. Dabei wurde das Signifikanzniveau durch die Anzahl der Tests pro Färbung dividiert. Der Signifikanzwert wurde anschließend mit dem korrigierten Wert angegeben.

Im Allgemeinen sind die statistischen Ergebnisse durch die teilweise sehr geringen Fallzahlen der Gruppe „keine klinische Atrophie“ unter Vorbehalt zu interpretieren.

### 3 Ergebnisse

Die Grundlage der immunhistochemischen Untersuchungen waren die tierexperimentell erhobenen Daten und Proben im Schafmodell.[110]

Bei der Auswertung dieser Daten zeigte die Konditionierung mit der Kombination der resorbierbaren Bio-Gide<sup>®</sup>-Membran und des Knochenersatzmaterials Bio-Oss<sup>®</sup> mit einem kortikospongiösen Knochentransplantat entsprechend in Kapitel 2.2.1.2.5 und Abbildung 7 dargestellt, die geringste klinische Atrophie und stellte somit die beste der untersuchten Methoden dar.[110; 1; 2]

Hier konnten bereits nach vier Wochen an den Bio-Oss<sup>®</sup>-Partikeln osteoblastäre Zellen und nach 12 Wochen neu gebildeter, trabekulärer Knochen in und um die Bio-Oss<sup>®</sup>-Partikel nachgewiesen werden. Die Vorteile der Kombination des Knochenersatzmaterials Bio-Oss<sup>®</sup> mit einer Bio-Gide<sup>®</sup> Membran, die im Sinne einer Guided Bone Regeneration (GBR) schnell wachsende nicht osteogene Gewebe von einer Invasion in den Knochendefekt abhält und somit einen mechanischen Schutz des Transplantates und des umgebenden Knochenersatzmaterials (KEM) gewährleistet, waren Grund für die Reduktion der Knochenresorption.[110]

Die Kombination von Bio-Oss<sup>®</sup> mit einer resorbierbaren Membran im Sinne der GBR ist bereits aus anderen Voruntersuchungen als Erfolg versprechende Methode bekannt.[3; 84]

Zur Auswertung der durch die immunhistochemischen Untersuchungen erhobenen Daten, wurden nun die Gruppe mit klinischer Atrophie, entsprechend der Konditionierungen eins bis vier und die Gruppe ohne bzw. mit wenig atrophischen Veränderungen in den klinischen Studien, entsprechend der oben dargestellten Konditionierung an Hand der unterschiedlichen Färbungen verglichen. Konditionierung 6, die der Negativkontrolle entsprach, wurde im Rahmen dieser Auswertung auf Grund der fehlenden klinischen Relevanz nicht mit berücksichtigt. Diese Bündelung der erhobenen Daten veranschaulicht Kapitel 2.2.4 und die Tabellen 6, 7 und 8. Die einzelnen Konditionierungen sind im Kapitel 2.2.1.2 näher dargestellt.

Die Ergebnisse werden im Rahmen dieses Kapitels anhand der Expression der untersuchten Wachstumsfaktoren in den immunhistochemischen Untersuchungen einzeln für jeden verwendeten Antikörper dargestellt und statistisch bewertet.

### 3.1 Bone Morphogenetic Protein-2 (BMP-2)

Die Expression von BMP-2 zeigte in der Gruppe „klinische Atrophie“ bezüglich der unterschiedlichen Einheitszeitpunkte keine deutlichen Unterschiede. Insgesamt wurde hier BMP-2 etwas mehr im Transplantatlager als in den zwei anderen ROIs exprimiert. Die Expression war in dieser Gruppe mit Mittelwerten des Immunoreaktiven Scores von 5,75 im Transplantatlager, 3,55 im Transplantat und 3,81 im Übergangsbereich auf hohem Niveau.

Auffallend bei der Anfärbung auf BMP-2 war jedoch die vermehrte Expression von BMP-2 in der Gruppe „keine klinische Atrophie“ im zweiten untersuchten Einheitszeitpunkt, sowie die vermehrte Expression vor allem in der ROI „Transplantat“. Dies wurde sowohl in den Daten bezüglich der Positivität als auch in nach der Farbeintensität untersuchten Daten deutlich und ließ sich im errechneten Immunoreaktiven Score am deutlichsten nachvollziehen.

Die vermehrte Expression im „Transplantat“ war statistisch als signifikant zu bezeichnen:

IRS:  $t(46) = 2,281, p = 0,027, \alpha = 0,05$ . (Tabellen 55 und 56, Anhang 7.1.1)

Dies zeigte sich auch bei der Betrachtung der Mittelwerte der ROI „Transplantat“ über beide Zeitpunkte bei gleichen Varianzen. Hier fand sich eine annähernd signifikant vermehrte Expression der Konditionierung „keine klinische Atrophie“:

IRS:  $t(18) = 2,003, p = 0,061, \alpha = 0,05$ . (Tabellen 57 und 58, Anhang 7.1.1)

Statistisch nicht signifikant waren die Mittelwerte der ROI „Transplantat“ zum zweiten Einheitszeitpunkt bei der Analyse auf die Gruppenvariable Konditionierung:

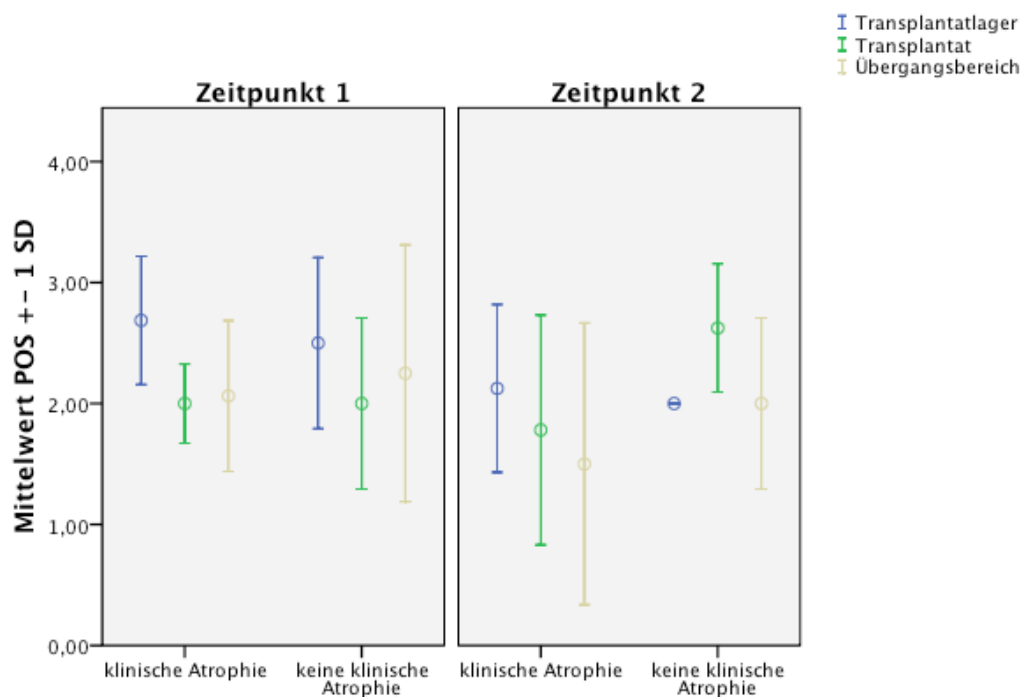
IRS  $MW_{\text{klinische Atrophie}} = 3,7512$ ; IRS  $MW_{\text{keine klinische Atrophie}} = 3,6900$

IRS:  $t(8) = 1,349, p = 0,214, \alpha = 0,05$ . (Tabellen 59 und 60, Anhang 7.1.1)

Tabellen 9, 10 und Abbildung 12 verdeutlichen die deskriptive Statistik bezüglich der Positivität. Die Färbeintensität lässt sich aus Tabellen 11 und 12 sowie aus Abbildung 13 erkennen. Zusammenfassend zeigen Tabellen 13, 14 und Abbildung 14 den Immunoreaktiven Score nach Anfärbung auf BMP-2.

Die Untersuchungen zur Signifikanz finden sich im Anhang, Kapitel 7.1.1.

### 3.1.1 Deskriptive Statistik zur Positivität



**Abbildung 13: Graphische Darstellung der Positivität des Transplantats, Transplantatlagers und Übergangsbereich nach Anfärbung von BMP-2 in Abhängigkeit des klinischen Erscheinungsbildes und des Einzelzeitpunktes**

**Tabelle 9: Zeitpunkt 1. Deskriptive Statistik: Standardabweichung und Mittelwerte des Transplantats, Transplantatlagers und Übergangsbereichs nach Anfärbung von BMP-2 bezüglich der Positivität der Färbung**

		Positivität		
		N	Mittelwert	Standardabweichung
Transplantatlager	klinische Atrophie	8	2,68750	0,530330
	keine klinische Atrophie	2	2,50000	0,707107
	Kontrolle	2	3,00000	0,000000
Transplantat	klinische Atrophie	8	2,00000	0,327327
	keine klinische Atrophie	2	2,00000	0,707107
	Kontrolle	2	1,75000	0,707107
Übergangsbereich	klinische Atrophie	8	2,06250	0,623212
	keine klinische Atrophie	2	2,25000	1,060660
	Kontrolle	2	2,50000	0,000000

**Tabelle 10: Zeitpunkt 2. Deskriptive Statistik: Standardabweichung und Mittelwerte des Transplantats, Transplantatlagers und Übergangsbereichs nach Anfärbung von BMP-2 bezüglich der Positivität der Färbung**

		Positivität		
		N	Mittelwert	Standardabweichung
Transplantatlager	klinische Atrophie	8	2,12500	0,694365
	keine klinische Atrophie	2	2,00000	0,000000
	Kontrolle	2	1,75000	0,353553
Transplantat	klinische Atrophie	8	1,78125	0,949036
	keine klinische Atrophie	2	2,62500	0,530330
	Kontrolle	2	0,87500	0,883883
Übergangsbereich	klinische Atrophie	8	1,50000	1,164965
	keine klinische Atrophie	2	2,00000	0,707107
	Kontrolle	2	0,75000	0,353553

3.1.2 Deskriptive Statistik zur Färbeintensität

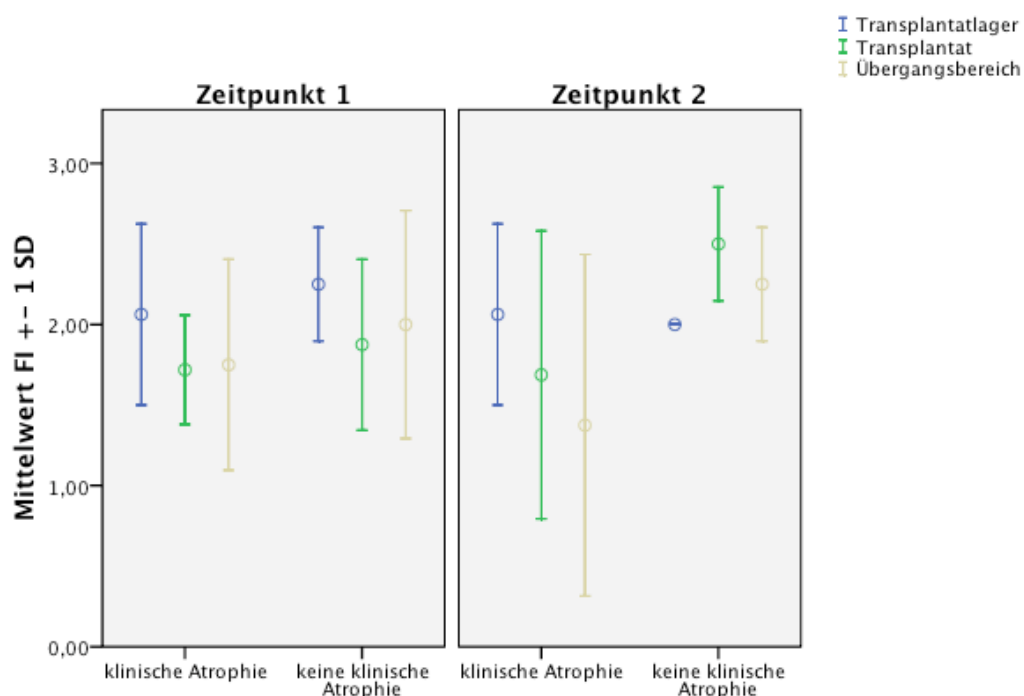


Abbildung 14: Graphische Darstellung der Färbeintensität des Transplantats, Transplantatlagers und Übergangsbereich nach Anfärbung von BMP-2 in Abhängigkeit des klinischen Erscheinungsbildes und des Einheitszeitpunktes

Tabelle 11: Zeitpunkt 1. Deskriptive Statistik: Standardabweichung und Mittelwerte des Transplantats, Transplantatlagers und Übergangsbereichs nach Anfärbung von BMP-2 bezüglich der Färbeintensität der Färbung

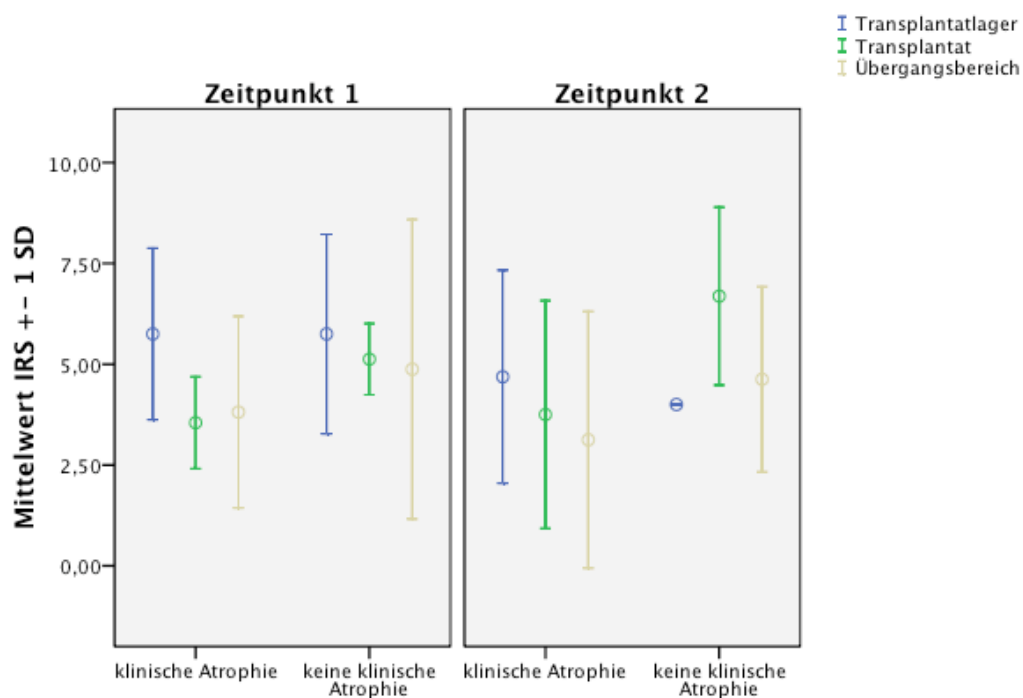
		Färbeintensität		
		N	Mittelwert	Standardabweichung
Transplantatlager	klinische Atrophie	8	2,06250	0,562996
	keine klinische Atrophie	2	2,25000	0,353553
	Kontrolle	2	3,00000	0,000000
Transplantat	klinische Atrophie	8	1,71875	0,339051
	keine klinische Atrophie	2	1,87500	0,530330
	Kontrolle	2	1,75000	0,707107
Übergangsbereich	klinische Atrophie	8	1,75000	0,654654
	keine klinische Atrophie	2	2,00000	0,707107
	Kontrolle	2	2,50000	0,000000



**Tabelle 12: Zeitpunkt 2. Deskriptive Statistik: Standardabweichung und Mittelwerte des Transplantats, Transplantatlagers und Übergangsbereichs nach Anfärbung von BMP-2 bezüglich der Färbeintensität der Färbung**

		Färbeintensität		
		N	Mittelwert	Standardabweichung
Transplantatlager	klinische Atrophie	8	2,06250	0,562996
	keine klinische Atrophie	2	2,00000	0,000000
	Kontrolle	2	1,75000	0,353553
Transplantat	klinische Atrophie	8	1,68750	0,893928
	keine klinische Atrophie	2	2,50000	0,353553
	Kontrolle	2	0,62500	0,530330
Übergangsbereich	klinische Atrophie	8	1,37500	1,060660
	keine klinische Atrophie	2	2,25000	0,353553
	Kontrolle	2	0,75000	0,353553

### 3.1.3 Deskriptive Statistik zum Immunreaktiven Score



**Abbildung 15: Graphische Darstellung des Immunreaktiven Scores des Transplantats, Transplantatlagers und Übergangsbereichs nach Anfärbung von BMP-2 in Abhängigkeit des klinischen Erscheinungsbildes und des Einzelzeitpunktes**

**Tabelle 13: Zeitpunkt 1. Deskriptive Statistik: Standardabweichung und Mittelwerte des Transplantats, Transplantatlagers und Übergangsbereichs nach Anfärbung von BMP-2 bezüglich des Immunreaktiven Scores der Färbung**

		IRS		
		N	Mittelwert	Standardabweichung
Transplantatlager	klinische Atrophie	8	5,75000	2,125525
	keine klinische Atrophie	2	5,75000	2,474874
	Kontrolle	2	9,00000	0,000000
Transplantat	klinische Atrophie	8	3,54875	1,139028
	keine klinische Atrophie	2	5,12500	0,883883
	Kontrolle	2	3,38000	2,474874
Übergangsbereich	klinische Atrophie	8	3,81250	2,374530
	keine klinische Atrophie	2	4,87500	3,712311
	Kontrolle	2	6,25000	0,000000

**Tabelle 14: Zeitpunkt 2. Deskriptive Statistik: Standardabweichung und Mittelwerte des Transplantats, Transplantatlagers und Übergangsbereichs nach Anfärbung von BMP-2 bezüglich des Immunreaktiven Scores der Färbung**

		IRS		
		N	Mittelwert	Standardabweichung
Transplantatlager	klinische Atrophie	8	4,68750	2,641530
	keine klinische Atrophie	2	4,00000	0,000000
	Kontrolle	2	3,12500	1,237437
Transplantat	klinische Atrophie	8	3,75125	2,824669
	keine klinische Atrophie	2	6,69000	2,206173
	Kontrolle	2	0,81500	0,968736
Übergangsbereich	klinische Atrophie	8	3,12500	3,181981
	keine klinische Atrophie	2	4,62500	2,298097
	Kontrolle	2	0,62500	0,530330

### 3.2 Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)

Die Daten bezüglich der Positivität nach Färbung auf VEGF zeigten nach Einheitszeitpunkt 1 keinen Unterschied zwischen der Gruppe „klinische Atrophie“ und der Gruppe „keine klinische Atrophie“. Analog hierzu verhielten sich die Daten, die bezüglich der Färbeintensität erhoben wurden. Dementsprechend verdeutlicht der errechnete Immunoreaktive Score ebenfalls die Tatsache, dass die Expression von VEGF auf einem mittleren Niveau bei Mittelwerten der Gruppe „keine klinische Atrophie“ von 3,25 im Transplantatlager, 3,1 im Transplantat und 2,5 in der Übergangszone klinisch der Gruppe „keine klinische Atrophie“ entspricht.

Betrachtet man die Daten am späteren Einheitszeitpunkt, also nach 12 und 16 Wochen so zeigte sich jedoch eine vermehrte Expression von VEGF in der Gruppe „keine klinische Atrophie“. Sowohl die auf die Positivität bezogenen Daten, als auch die Untersuchungen zur Färbeintensität zeigte die vermehrte Expression von VEGF im Verlauf der Einheitszeit. Die vermehrte Expression in der Gruppe „keine klinische Atrophie“ beruhte hierbei vor allem auf der gesunkenen Expression in der Kontrollgruppe bei in etwa gleich bleibenden Werten der Gruppe „keine klinische Atrophie“.

Insgesamt war die Expression von VEGF zum zweiten Einheitszeitpunkt über alle Konditionierungen und ROIs signifikant gegenüber dem ersten Zeitpunkt vermehrt: IRS:  $t(70) = 3,236$ ,  $p = 0,002$ ,  $\alpha = 0,05$ . (Tabellen 63 und 64, Anhang 7.1.2)

Bezüglich der ROIs fand sich diese vermehrte Expression über die Zeit vor allem im Bereich des Transplantates. Diesen Unterschied kann der Vergleich der Mittelwerte bei gleichen Varianzen nicht als statistisch signifikant darlegen:

IRS:  $t(46) = 1,348$ ,  $p = 0,184$ ,  $\alpha = 0,05$ . (Tabellen 65 und 66, Anhang 7.1.2)

Auch die Analyse der ROI „Transplantat“ zum zweiten Einheitszeitpunkt anhand der Gruppenvariable Konditionierung, lieferte in der Gruppenstatistik deutlich unterschiedliche Mittelwerte:

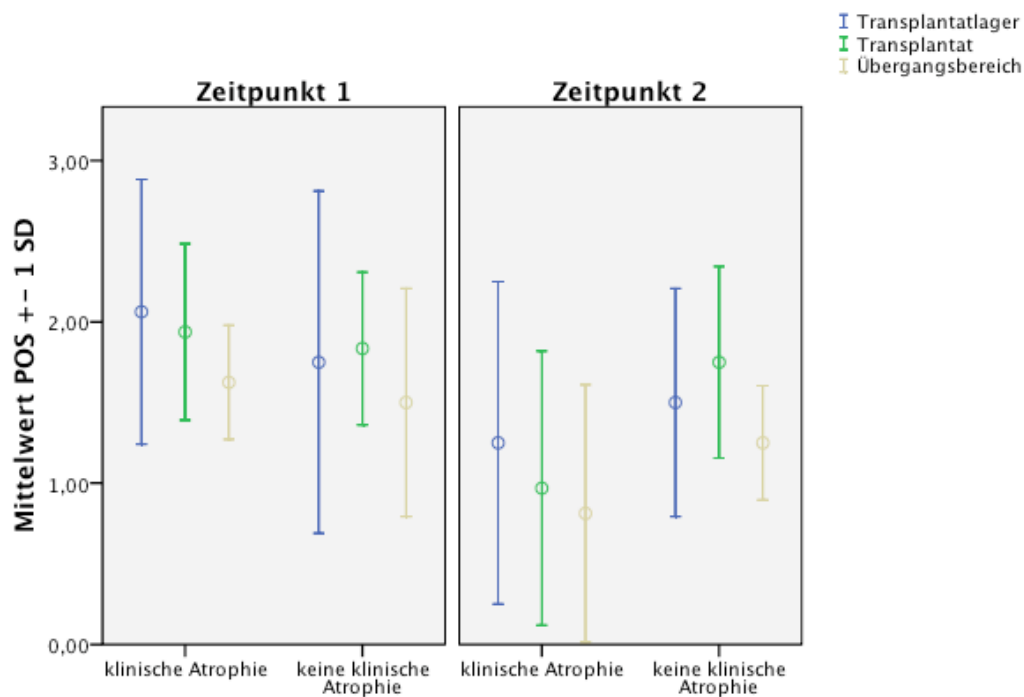
IRS  $MW_{\text{klinische Atrophie}} = 1,5338$ ; IRS  $MW_{\text{keine klinische Atrophie}} = 3,2500$ ;  
jedoch zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied:

IRS:  $t(8) = 1,059$ ,  $p = 0,320$ ,  $\alpha = 0,05$ . (Tabellen 67 und 68 Anhang 7.1.2)

Tabellen 15, 16 und Abbildung 15 verdeutlichen die deskriptive Statistik bezüglich der Positivität. Die Färbeintensität lässt sich aus Tabellen 17 und 18 sowie aus Abbildung 16 erkennen. Zusammenfassend zeigen Tabellen 19, 20 und Abbildung 17 den Immunoreaktiven Score nach Anfärbung auf VEGF.

Die statistische Auswertung findet sich im Anhang, Kapitel 7.1.2.

### 3.2.1 Deskriptive Statistik zur Positivität



**Abbildung 16: Graphische Darstellung der Positivität des Transplantats, Transplantatlagers und Übergangsbereich nach Anfärbung von VEGF in Abhängigkeit des klinischen Erscheinungsbildes und des Einheitszeitpunktes**

**Tabelle 15: Zeitpunkt 1. Deskriptive Statistik: Standardabweichung und Mittelwerte des Transplantats, Transplantatlagers und Übergangsbereichs nach Anfärbung von VEGF bezüglich der Positivität der Färbung**

		Positivität		
		N	Mittelwert	Standardabweichung
Transplantatlager	klinische Atrophie	8	2,06250	0,821040
	keine klinische Atrophie	2	1,75000	1,060660
	Kontrolle	2	2,00000	0,707107
Transplantat	klinische Atrophie	8	1,93750	0,546907
	keine klinische Atrophie	2	1,83500	0,473762
	Kontrolle	2	0,87500	0,176777
Übergangsbereich	klinische Atrophie	8	1,62500	0,353553
	keine klinische Atrophie	2	1,50000	0,707107
	Kontrolle	2	1,75000	0,353553

**Tabelle 16: Zeitpunkt 2. Woche. Deskriptive Statistik: Standardabweichung und Mittelwerte des Transplantats, Transplantatlagers und Übergangsbereichs nach Anfärbung von VEGF bezüglich der Positivität der Färbung**

		Positivität		
		N	Mittelwert	Standardabweichung
Transplantatlager	klinische Atrophie	8	1,25000	1,000000
	keine klinische Atrophie	2	1,50000	0,707107
	Kontrolle	2	1,00000	1,414214
Transplantat	klinische Atrophie	8	0,96875	0,849764
	keine klinische Atrophie	2	1,75000	0,593970
	Kontrolle	2	0,62500	0,883883
Übergangsbereich	klinische Atrophie	8	0,81250	0,798995
	keine klinische Atrophie	2	1,25000	0,353553
	Kontrolle	2	0,25000	0,353553

3.2.2 Deskriptive Statistik zur Färbeintensität

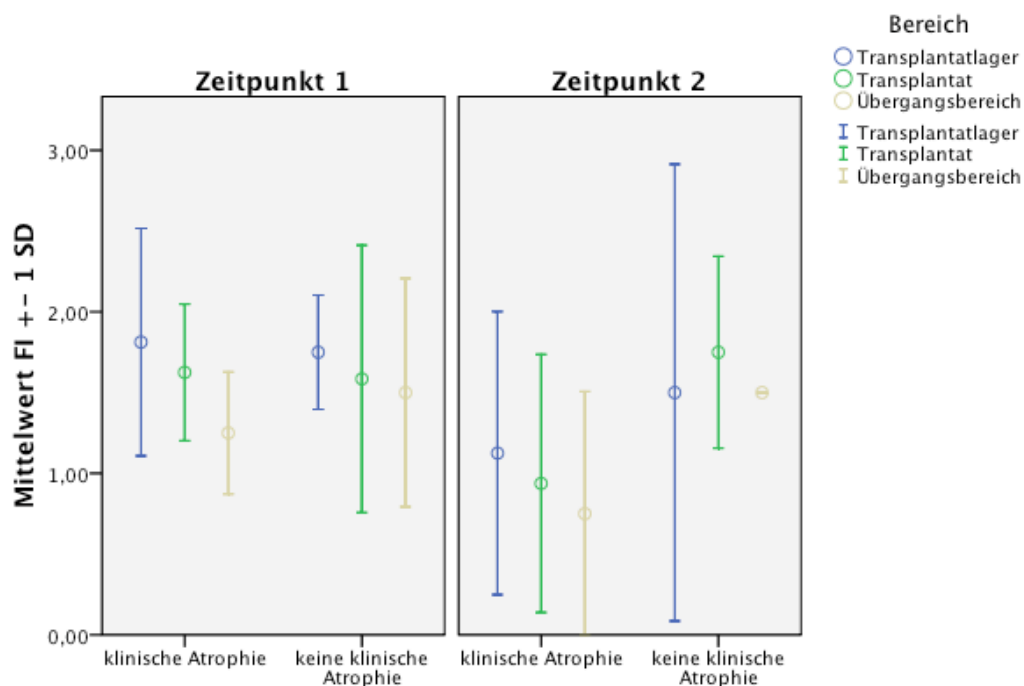


Abbildung 17: Graphische Darstellung der Färbeintensität des Transplantats, Transplantatlagers und Übergangsbereich nach Anfärbung von VEGF in Abhängigkeit des klinischen Erscheinungsbildes und des Einheitszeitpunktes

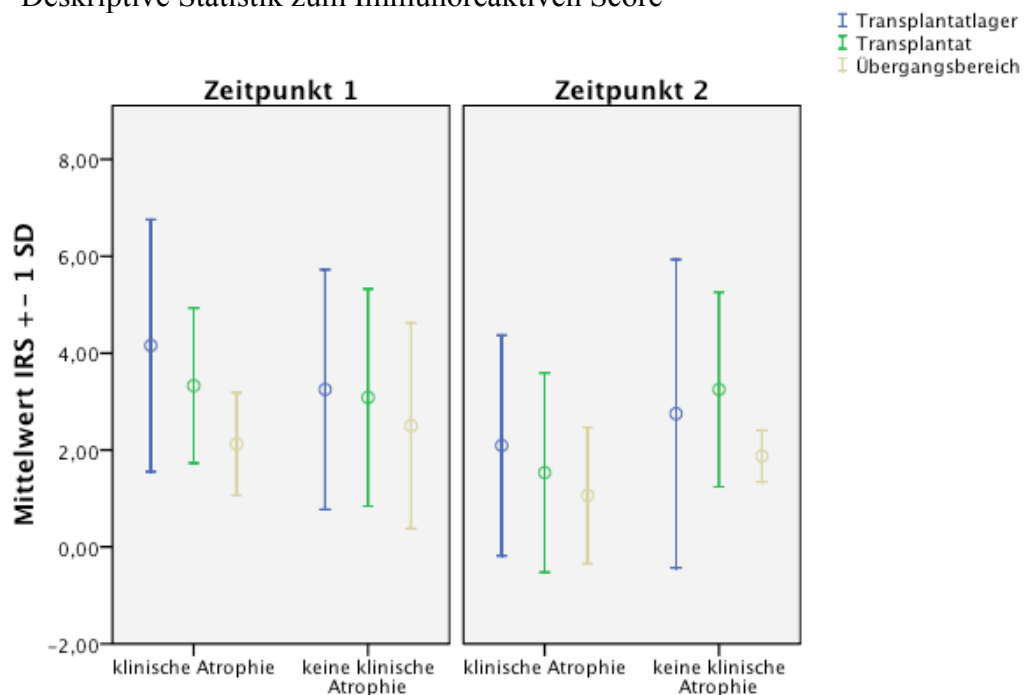
Tabelle 17: Zeitpunkt 1. Deskriptive Statistik: Standardabweichung und Mittelwerte des Transplantats, Transplantatlagers und Übergangsbereichs nach Anfärbung von VEGF bezüglich der Färbeintensität der Färbung

		Färbeintensität		
		N	Mittelwert	Standardabweichung
Transplantatlager	klinische Atrophie	8	1,81250	0,703943
	keine klinische Atrophie	2	1,75000	0,353553
	Kontrolle	2	2,25000	0,353553
Transplantat	klinische Atrophie	8	1,62500	0,422577
	keine klinische Atrophie	2	1,58500	0,827315
	Kontrolle	2	1,00000	0,000000
Übergangsbereich	klinische Atrophie	8	1,25000	0,377964
	keine klinische Atrophie	2	1,50000	0,707107
	Kontrolle	2	1,50000	0,000000

**Tabelle 18: Zeitpunkt 2. Deskriptive Statistik: Standardabweichung und Mittelwerte des Transplantats, Transplantatlagers und Übergangsbereichs nach Anfärbung von VEGF bezüglich der Färbeintensität der Färbung**

		Färbeintensität		
		N	Mittelwert	Standardabweichung
Transplantatlager	klinische Atrophie	8	1,12500	0,876275
	keine klinische Atrophie	2	1,50000	1,414214
	Kontrolle	2	1,00000	1,414214
Transplantat	klinische Atrophie	8	0,93750	0,798995
	keine klinische Atrophie	2	1,75000	0,593970
	Kontrolle	2	0,62500	0,883883
Übergangsbereich	klinische Atrophie	8	0,75000	0,755929
	keine klinische Atrophie	2	1,50000	0,000000
	Kontrolle	2	0,25000	0,353553

3.2.3 Deskriptive Statistik zum Immunreaktiven Score



**Abbildung 18: Graphische Darstellung des Immunreaktiven Scores des Transplantats, Transplantatlagers und Übergangsbereichs nach Anfärbung von VEGF in Abhängigkeit des klinischen Erscheinungsbildes und des Einheitszeitpunktes**

**Tabelle 19: Zeitpunkt 1. Deskriptive Statistik: Standardabweichung und Mittelwerte des Transplantats, Transplantatlagers und Übergangsbereichs nach Anfärbung von VEGF bezüglich des Immunoreaktiven Scores der Färbung**

IRS

		N	Mittelwert	Standardabweichung
Transplantatlager	klinische Atrophie	8	4,15625	2,601296
	keine klinische Atrophie	2	3,25000	2,474874
	Kontrolle	2	4,62500	2,298097
Transplantat	klinische Atrophie	8	3,32875	1,599432
	keine klinische Atrophie	2	3,08500	2,241528
	Kontrolle	2	0,87500	0,176777
Übergangsbereich	klinische Atrophie	8	2,12500	1,060660
	keine klinische Atrophie	2	2,50000	2,121320
	Kontrolle	2	2,62500	0,530330

**Tabelle 20: Zeitpunkt 2. Deskriptive Statistik: Standardabweichung und Mittelwerte des Transplantats, Transplantatlagers und Übergangsbereichs nach Anfärbung von VEGF bezüglich des Immunoreaktiven Scores der Färbung**

IRS

		N	Mittelwert	Standardabweichung
Transplantatlager	klinische Atrophie	8	2,09375	2,275402
	keine klinische Atrophie	2	2,75000	3,181981
	Kontrolle	2	2,00000	2,828427
Transplantat	klinische Atrophie	8	1,53375	2,054820
	keine klinische Atrophie	2	3,25000	2,008183
	Kontrolle	2	0,75000	1,060660
Übergangsbereich	klinische Atrophie	8	1,06250	1,406300
	keine klinische Atrophie	2	1,87500	0,530330
	Kontrolle	2	0,12500	0,176777



### 3.3 Vascular Endothelial Growth Factor Rezeptor (VEGFR)

Die Daten zur Expression des Vascular Endothelial Growth Factor Rezeptor sind in den Kapiteln 3.3.1 und 3.3.2 anhand der zwei untersuchten Isoformen zusammengefasst.

#### 3.3.1 Vascular Endothelial Growth Factor Rezeptor-1 (VEGFR-1)

Die Analyse der Daten nach Färbung von VEGFR-1 zeigte im Bezug auf die Positivität, Färbeintensität und folglich auch dem Immunreaktiven Score zu beiden Einheilzeitpunkten eine vermehrte Expression in der Gruppe „keine klinische Atrophie“. In der statistischen Analyse Gruppenvariable Konditionierung über alle Zeitpunkte und ROIs stellte sich dieser Unterschied bei deutlich unterschiedlichen Mittelwerten als annähernd signifikant dar:

IRS  $MW_{\text{klinische Atrophie}} = 3,4560$ , IRS  $MW_{\text{keine klinische Atrophie}} = 4,8125$   
 IRS:  $t(58) = 1,685$ ,  $p = 0,097$ ,  $\alpha = 0,05$ . (Tabellen 69 und 70 Anhang 7.1.3.1)

Betrachtet man alle Konditionierungen und ROIs, so fand sich eine vermehrte Expression in allen untersuchten Parametern nach 4 bzw. 8 Wochen also am Einheilzeitpunkt 1 im Gegensatz zum später beobachteten Zeitpunkt. Dies war auch auf Grund der statistischen Auswertung der Daten als signifikant zu bezeichnen:

IRS:  $t(70) = 5,088$ ,  $p = 0,000$ ,  $\alpha = 0,05$ . (Tabellen 71 und 72 Anhang 7.1.3.1)

Statistisch relevante Unterschiede in der Analyse der Mittelwerte bei gleichen Varianzen fanden sich ebenfalls bei der Gruppenvariable Konditionierung zum zweiten Einheilzeitpunkt in der Gruppe „keine klinische Atrophie“:

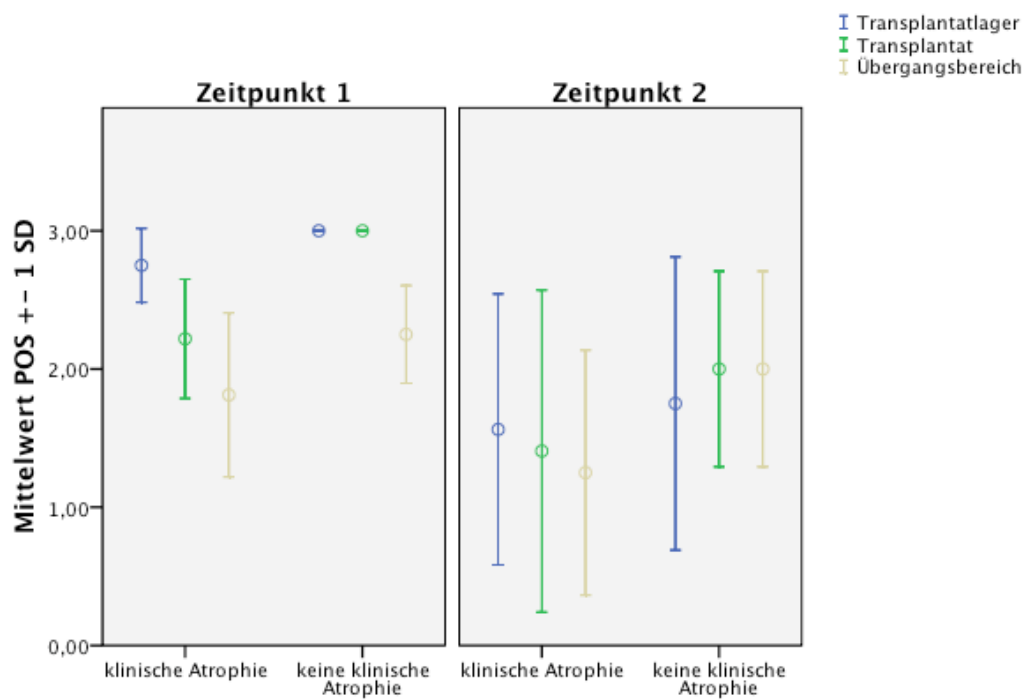
IRS:  $t(28) = 2,516$ ,  $p = 0,018$ ,  $\alpha = 0,05$ . (Tabellen 75 und 76 Anhang 7.1.3.1)

Die ROIs unterschieden sich nicht signifikant. Insgesamt lag die Expression von VEGFR-1 auf einem hohen Niveau. So waren die IRS Mittelwerte zum Zeitpunkt 1 beispielsweise im Transplantatlager bei 8,25, im Bereich des Transplantates bei 7,12 und in der Übergangszone bei 4,5.

Die Tabellen 21, 22 und Abbildung 18 verdeutlichen die deskriptive Statistik bezüglich der Positivität. Die Färbeintensität lässt sich aus den Tabellen 23 und 24 sowie aus der Abbildung 19 erkennen. Zusammenfassend zeigen Tabellen 25, 26 und Abbildung 20 den Immunoreaktiven Score nach Anfärbung auf VEGFR-1.

Die Analyse der Daten bezüglich der Signifikanz finden sich im Anhang, Kapitel 7.1.3.1.

### 3.3.1.1 Deskriptive Statistik zur Positivität



**Abbildung 19: Graphische Darstellung der Positivität des Transplantats, Transplantatlagers und Übergangsbereich nach Anfärbung von VEGFR-1 in Abhängigkeit des klinischen Erscheinungsbildes und des Einheitszeitpunktes**

**Tabelle 21: Zeitpunkt 1. Deskriptive Statistik: Standardabweichung und Mittelwerte des Transplantats, Transplantatlagers und Übergangsbereichs nach Anfärbung von VEGFR-1 bezüglich der Positivität der Färbung**

		Positivität		
		N	Mittelwert	Standardabweichung
Transplantatlager	klinische Atrophie	8	2,75000	0,267261
	keine klinische Atrophie	2	3,00000	0,000000
	Kontrolle	2	2,50000	0,000000
Transplantat	klinische Atrophie	8	2,21875	0,431722
	keine klinische Atrophie	2	3,00000	0,000000
	Kontrolle	2	2,00000	0,707107
Übergangsbereich	klinische Atrophie	8	1,81250	0,593867
	keine klinische Atrophie	2	2,25000	0,353553
	Kontrolle	2	2,00000	0,000000

**Tabelle 22: Zeitpunkt 2. Deskriptive Statistik: Standardabweichung und Mittelwerte des Transplantats, Transplantatlagers und Übergangsbereichs nach Anfärbung von VEGFR-1 bezüglich der Positivität der Färbung**

		Positivität		
		N	Mittelwert	Standardabweichung
Transplantatlager	klinische Atrophie	8	1,56250	0,979705
	keine klinische Atrophie	2	1,75000	1,060660
	Kontrolle	2	1,25000	0,353553
Transplantat	klinische Atrophie	8	1,40625	1,164486
	keine klinische Atrophie	2	2,00000	0,707107
	Kontrolle	2	0,25000	0,353553
Übergangsbereich	klinische Atrophie	8	1,25000	0,886405
	keine klinische Atrophie	2	2,00000	0,707107
	Kontrolle	2	0,00000	0,000000

3.3.1.2 Deskriptive Statistik zur Färbeintensität

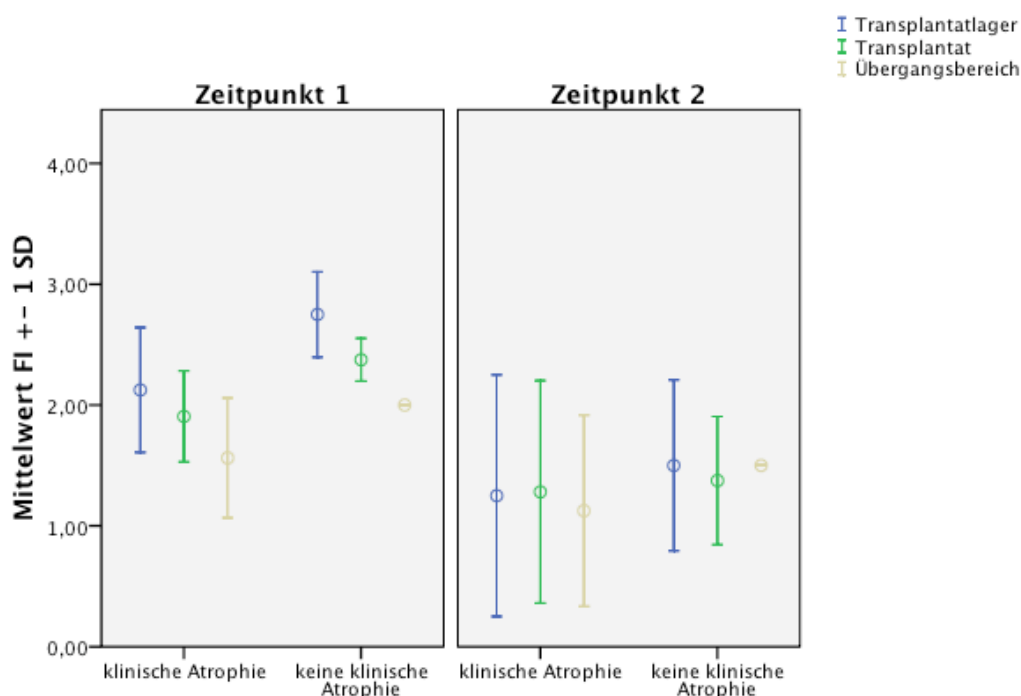


Abbildung 20: Graphische Darstellung der Färbeintensität des Transplantats, Transplantatlagers und Übergangsbereich nach Anfärbung von VEGFR-1 in Abhängigkeit des klinischen Erscheinungsbildes und des Einheitszeitpunktes

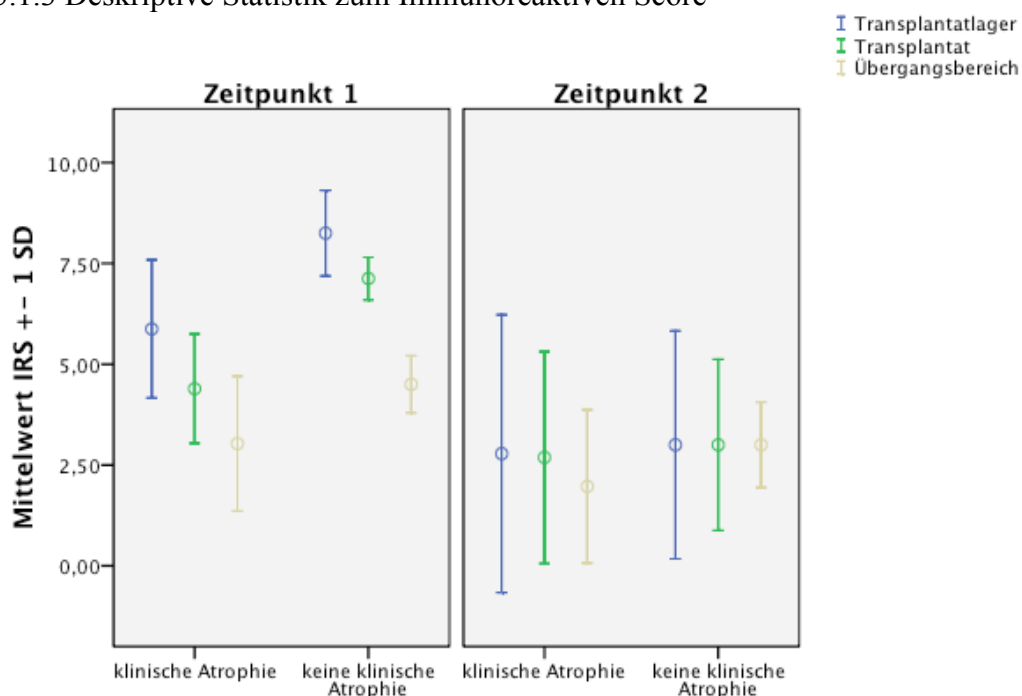
Tabelle 23: Zeitpunkt 1. Deskriptive Statistik: Standardabweichung und Mittelwerte des Transplantats, Transplantatlagers und Übergangsbereichs nach Anfärbung von VEGFR-1 bezüglich der Färbeintensität der Färbung

		Färbeintensität		
		N	Mittelwert	Standardabweichung
Transplantatlager	klinische Atrophie	8	2,12500	0,517549
	keine klinische Atrophie	2	2,75000	0,353553
	Kontrolle	2	2,75000	0,353553
Transplantat	klinische Atrophie	8	1,90625	0,376485
	keine klinische Atrophie	2	2,37500	0,176777
	Kontrolle	2	1,87500	0,176777
Übergangsbereich	klinische Atrophie	8	1,56250	0,495516
	keine klinische Atrophie	2	2,00000	0,000000
	Kontrolle	2	2,00000	0,000000

**Tabelle 24: Zeitpunkt 2. Deskriptive Statistik: Standardabweichung und Mittelwerte des Transplantats, Transplantatlagers und Übergangsbereichs nach Anfärbung von VEGFR-1 bezüglich der Färbeintensität der Färbung**

		Färbeintensität		
		N	Mittelwert	Standardabweichung
Transplantatlager	klinische Atrophie	8	1,25000	1,000000
	keine klinische Atrophie	2	1,50000	0,707107
	Kontrolle	2	1,00000	0,000000
Transplantat	klinische Atrophie	8	1,28125	0,920379
	keine klinische Atrophie	2	1,37500	0,530330
	Kontrolle	2	0,50000	0,707107
Übergangsbereich	klinische Atrophie	8	1,12500	0,790569
	keine klinische Atrophie	2	1,50000	0,000000
	Kontrolle	2	0,00000	0,000000

3.3.1.3 Deskriptive Statistik zum Immunreaktiven Score



**Abbildung 21: Graphische Darstellung des Immunreaktiven Scores des Transplantats, Transplantatlagers und Übergangsbereichs nach Anfärbung von VEGFR-1 in Abhängigkeit des klinischen Erscheinungsbildes und des Einheitszeitpunkte**

**Tabelle 25: Zeitpunkt 1. Deskriptive Statistik: Standardabweichung und Mittelwerte des Transplantats, Transplantatlagers und Übergangsbereichs nach Anfärbung von VEGFR-1 bezüglich des Immunoreaktiven Scores der Färbung**

		IRS		
		N	Mittelwert	Standardabweichung
Transplantatlager	klinische Atrophie	8	5,87500	1,711307
	keine klinische Atrophie	2	8,25000	1,060660
	Kontrolle	2	6,87500	0,883883
Transplantat	klinische Atrophie	8	4,39250	1,356505
	keine klinische Atrophie	2	7,12500	0,530330
	Kontrolle	2	3,81500	1,675843
Übergangsbereich	klinische Atrophie	8	3,03125	1,671385
	keine klinische Atrophie	2	4,50000	0,707107
	Kontrolle	2	4,00000	0,000000

**Tabelle 26: Zeitpunkt 2. Deskriptive Statistik: Standardabweichung und Mittelwerte des Transplantats, Transplantatlagers und Übergangsbereichs nach Anfärbung von VEGFR-1 bezüglich des Immunoreaktiven Scores der Färbung**

		IRS		
		N	Mittelwert	Standardabweichung
Transplantatlager	klinische Atrophie	8	2,78125	3,447146
	keine klinische Atrophie	2	3,00000	2,828427
	Kontrolle	2	1,25000	0,353553
Transplantat	klinische Atrophie	8	2,68750	2,627975
	keine klinische Atrophie	2	3,00000	2,121320
	Kontrolle	2	0,25000	0,353553
Übergangsbereich	klinische Atrophie	8	1,96875	1,901304
	keine klinische Atrophie	2	3,00000	1,060660
	Kontrolle	2	0,00000	0,000000

### 3.3.2 Vascular Endothelial Growth Factor Rezeptor-2 (VEGFR-2)

Die Expression des VEGFR-2 zeigte insgesamt im Zeitverlauf der zwei untersuchten Einheilzeitpunkte eine abnehmende Positivität sowie eine abnehmende Färbeintensität.

Betrachtet man die Positivität der Färbungen gesondert, so fällt im Zeitverlauf eine vermehrte Expression von VEGFR-2 zum zweiten Einheilzeitpunkt in der Gruppe „keine klinische Atrophie“ auf. Die Mittelwerte der Positivität lagen bei 1,55 in der Gruppe „klinische Atrophie“ gegenüber 2,29 in der Gruppe „keine klinische Atrophie“. Der t-Test bei gleichen Varianzen konnte einen statistisch verlässlichen Unterschied zwischen den Mittelwerten jedoch nicht nachweisen:

$t(28) = 1,77, p = 0,087, \alpha = 0,05$ . (Tabellen 83 und 84, Anhang 7.1.3.2)

Annähernd signifikant war jedoch der Unterschied der Mittelwerte der Konditionierungen über alle Zeitpunkte und ROIs bzgl. der Positivität:

POS:  $t(58) = 1,992, p = 0,051, \alpha = 0,05$ . (Tabellen 77 und 78 Anhang 7.1.3.2)

Dieser Unterschied ließ sich bei den Untersuchungen zur Färbeintensität nicht nachweisen. Die Expression von VEGFR-2 befand sich aber bei allen Untersuchungen mit Werten im oberen Drittel auf hohem Niveau, zumindest wenn man den Zeitpunkt eins gesondert betrachtet.

Die Expression zum ersten Einheilzeitpunkt über alle Konditionierungen und ROIs war in allen drei untersuchten Parametern signifikant höher als die Expression von VEGFR-2 zum zweiten beobachteten Zeitpunkt:

IRS:  $t(70) = 4,181, p = 0,000, \alpha = 0,05$ . (Tabellen 79 und 80 Anhang 7.1.3.2)

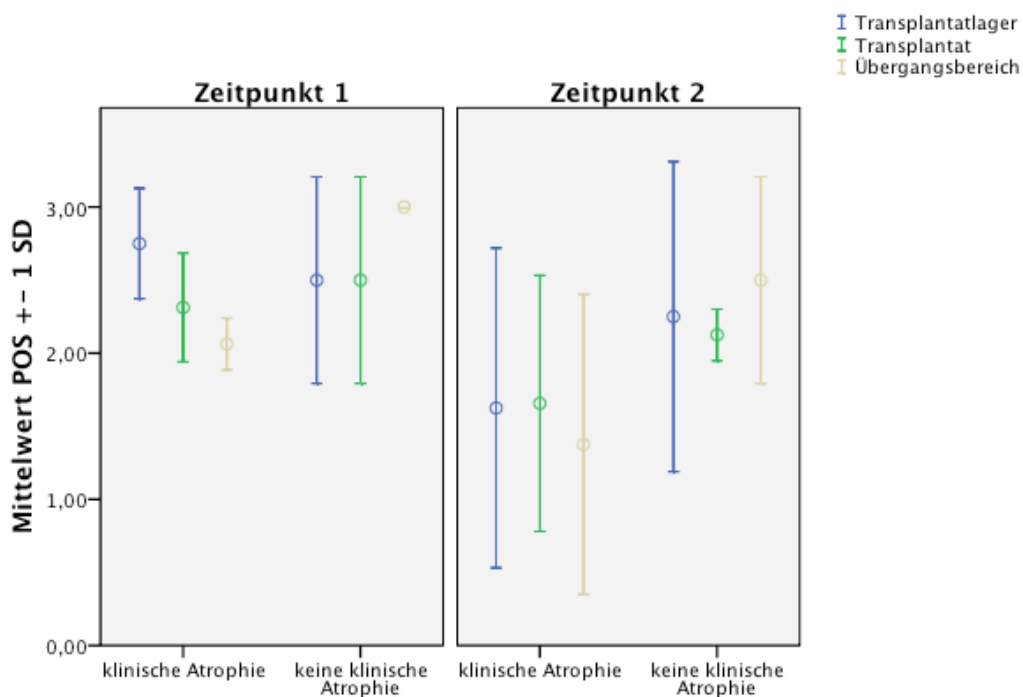
Der Immunoreaktive Score spiegelt die gewonnenen Daten der zwei untersuchten Parameter wieder und zeigte eine vermehrte Expression zum Zeitpunkt zwei in der Gruppe „keine klinische Atrophie“. Werte des IRS in der Gruppe „keine klinische Atrophie“ von 6,00 in der ROI „Transplantatlager“, 5,75 im Bereich „Transplantat“ und 6,00 im „Übergangsbereich“ zu ersten Einheilzeitpunkt, zeigten die deutliche

Expression zu Beginn, lassen aber keine Unterschiede zwischen den einzelnen Bereichen des Präparates erkennen.

Die Tabellen 27, 28 und die Abbildung 21 verdeutlichen die deskriptive Statistik bezüglich der Positivität. Die Färbeintensität lässt sich aus den Tabellen 29 und 30 sowie aus der Abbildung 22 erkennen. Zusammenfassend zeigen die Tabellen 31, 32 und die Abbildung 23 den Immunreaktiven Score nach Anfärbung von VEGFR-2.

Die Analyse der statistischen Daten finden sich im Anhang, Kapitel 7.1.3.2

### 3.3.2.1 Deskriptive Statistik zur Positivität



**Abbildung 22: Graphische Darstellung der Positivität des Transplantats, Transplantatlagers und Übergangsbereich nach Anfärbung von VEGFR-2 in Abhängigkeit des klinischen Erscheinungsbildes und des Einheilzeitpunktes**



**Tabelle 27: Zeitpunkt 1. Deskriptive Statistik: Standardabweichung und Mittelwerte des Transplantats, Transplantatlagers und Übergangsbereichs nach Anfärbung von VEGFR-2 bezüglich der Positivität der Färbung**

		Positivität		
		N	Mittelwert	Standardabweichung
Transplantatlager	klinische Atrophie	8	2,75000	0,377964
	keine klinische Atrophie	2	2,50000	0,707107
	Kontrolle	2	3,00000	0,000000
Transplantat	klinische Atrophie	8	2,31250	0,372012
	keine klinische Atrophie	2	2,50000	0,707107
	Kontrolle	2	1,50000	0,707107
Übergangsbereich	klinische Atrophie	8	2,06250	0,176777
	keine klinische Atrophie	2	3,00000	0,000000
	Kontrolle	2	2,25000	1,060660

**Tabelle 28: Zeitpunkt 2. Deskriptive Statistik: Standardabweichung und Mittelwerte des Transplantats, Transplantatlagers und Übergangsbereichs nach Anfärbung von VEGFR-2 bezüglich der Positivität der Färbung**

		Positivität		
		N	Mittelwert	Standardabweichung
Transplantatlager	klinische Atrophie	8	1,62500	1,093814
	keine klinische Atrophie	2	2,25000	1,060660
	Kontrolle	2	0,00000	0,000000
Transplantat	klinische Atrophie	8	1,65625	0,875638
	keine klinische Atrophie	2	2,12500	0,176777
	Kontrolle	2	0,25000	0,000000
Übergangsbereich	klinische Atrophie	8	1,37500	1,026436
	keine klinische Atrophie	2	2,50000	0,707107
	Kontrolle	2	0,50000	0,707107

3.3.2.2 Deskriptive Statistik zur Färbeintensität

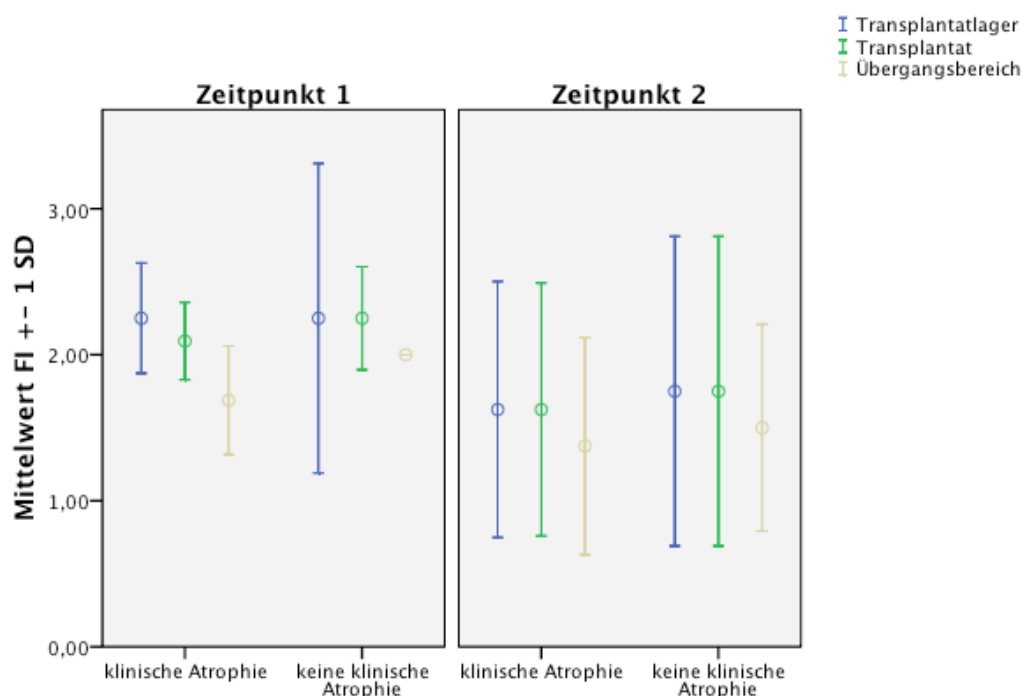


Abbildung 23: Graphische Darstellung der Färbeintensität des Transplantats, Transplantatlagers und Übergangsbereich nach Anfärbung von VEGFR-2 in Abhängigkeit des klinischen Erscheinungsbildes und des Einheitszeitpunktes

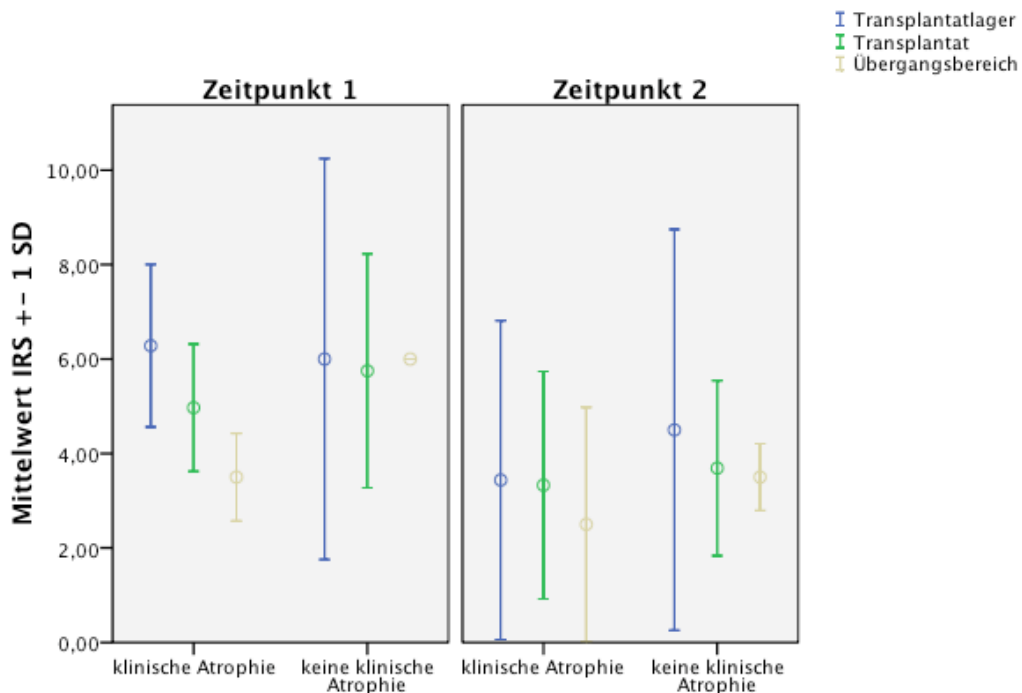
Tabelle 29: Zeitpunkt 1. Deskriptive Statistik: Standardabweichung und Mittelwerte des Transplantats, Transplantatlagers und Übergangsbereichs nach Anfärbung von VEGFR-2 bezüglich der Färbeintensität der Färbung

		Färbeintensität		
		N	Mittelwert	Standardabweichung
Transplantatlager	klinische Atrophie	8	2,25000	0,377964
	keine klinische Atrophie	2	2,25000	1,060660
	Kontrolle	2	2,50000	0,000000
Transplantat	klinische Atrophie	8	2,09375	0,265165
	keine klinische Atrophie	2	2,25000	0,353553
	Kontrolle	2	1,37500	0,176777
Übergangsbereich	klinische Atrophie	8	1,68750	0,372012
	keine klinische Atrophie	2	2,00000	0,000000
	Kontrolle	2	1,75000	1,060660

**Tabelle 30: Zeitpunkt 2. Deskriptive Statistik: Standardabweichung und Mittelwerte des Transplantats, Transplantatlagers und Übergangsbereichs nach Anfärbung von VEGFR-2 bezüglich der Färbeintensität der Färbung**

		Färbeintensität		
		N	Mittelwert	Standardabweichung
Transplantatlager	klinische Atrophie	8	1,62500	0,876275
	keine klinische Atrophie	2	1,75000	1,060660
	Kontrolle	2	0,75000	0,353553
Transplantat	klinische Atrophie	8	1,62500	0,866025
	keine klinische Atrophie	2	1,75000	1,060660
	Kontrolle	2	0,37500	0,176777
Übergangsbereich	klinische Atrophie	8	1,37500	0,744024
	keine klinische Atrophie	2	1,50000	0,707107
	Kontrolle	2	0,50000	0,707107

3.3.2.3 Deskriptive Statistik zur Färbeintensität



**Abbildung 24: Graphische Darstellung des Immunoreaktiven Scores des Transplantats, Transplantatlagers und Übergangsbereichs nach Anfärbung von VEGFR-2 in Abhängigkeit des klinischen Erscheinungsbildes und des Einheitszeitpunktes**

**Tabelle 31: Zeitpunkt 1. Deskriptive Statistik: Standardabweichung und Mittelwerte des Transplantats, Transplantatlagers und Übergangsbereichs nach Anfärbung von VEGFR-2 bezüglich des Immunoreaktiven Scores der Färbung**

		IRS		
		N	Mittelwert	Standardabweichung
Transplantatlager	klinische Atrophie	8	6,28125	1,718791
	keine klinische Atrophie	2	6,00000	4,242641
	Kontrolle	2	7,50000	0,000000
Transplantat	klinische Atrophie	8	4,97000	1,345978
	keine klinische Atrophie	2	5,75000	2,474874
	Kontrolle	2	2,37500	1,590990
Übergangsbereich	klinische Atrophie	8	3,50000	0,925820
	keine klinische Atrophie	2	6,00000	0,000000
	Kontrolle	2	4,50000	4,242641

**Tabelle 32: Zeitpunkt 2. Deskriptive Statistik: Standardabweichung und Mittelwerte des Transplantats, Transplantatlagers und Übergangsbereichs nach Anfärbung von VEGFR-2 bezüglich des Immunoreaktiven Scores der Färbung**

		IRS		
		N	Mittelwert	Standardabweichung
Transplantatlager	klinische Atrophie	8	3,43750	3,374669
	keine klinische Atrophie	2	4,50000	4,242641
	Kontrolle	2	0,00000	0,000000
Transplantat	klinische Atrophie	8	3,32875	2,410017
	keine klinische Atrophie	2	3,69000	1,852620
	Kontrolle	2	0,13000	0,000000
Übergangsbereich	klinische Atrophie	8	2,50000	2,478479
	keine klinische Atrophie	2	3,50000	0,707107
	Kontrolle	2	0,50000	0,707107

### 3.4 von-Willebrand-Faktor (vWF)

Die Expression von vWF stagniert insgesamt in den untersuchten Parametern „Positivität“ und „Färbeintensität“ auf geringem Niveau, etwa im unteren Drittel der Werte.

Mit IRS Werten der Gruppe „keine klinische Atrophie“ zum ersten untersuchten Zeitpunkt von 3,5 in der ROI „Transplantatlager“, 2,88 im Bereich „Transplantat“ und 2,50 in der „Übergangszone“, zeigt sich die relative geringe Expression auch im errechneten Parameter IRS.

Die vermehrte Expression im untersuchten ROI „Transplantatlager“ lässt sich sowohl zu beiden Zeitpunkten als auch in den Gruppen „klinische Atrophie“ und „keine klinische Atrophie“ erkennen. Der Unterschied ist zumindest im Parameter „Positivität“ mit gleichen Varianzen mit  $t(46) = 2,00$ ,  $p = 0,051$ ,  $\alpha = 0,05$  als annähernd signifikant zu bezeichnen. (Tabellen 89 und 90, Anhang 7.1.4)

Die Expression von vWF ist zum ersten Einheitszeitpunkt bei gleichen Varianzen signifikant mehr als zum zweiten untersuchten Zeitpunkt:

$t(70) = 2,043$ ,  $p = 0,045$ ,  $\alpha = 0,05$ . (Tabellen 87 und 88, Anhang 7.1.4)

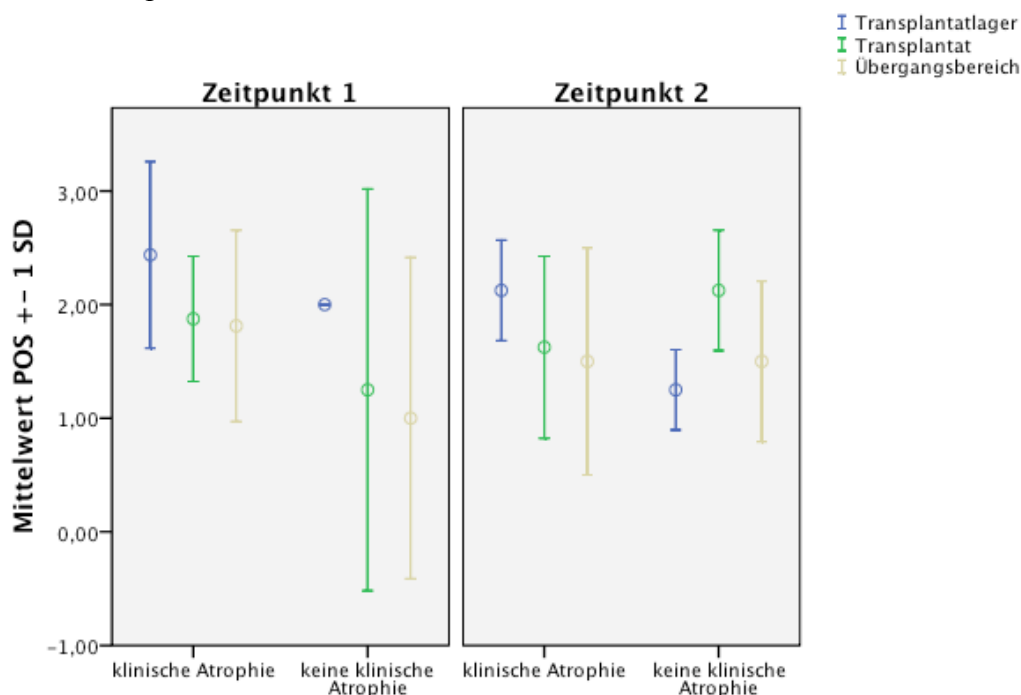
Die Analyse der Daten zeigt darüber hinaus einen statistisch nicht signifikanten Unterschied zwischen den Mittelwerten der Gruppen „klinische Atrophie“ ( $MW_{IRS} = 3,67$ ) und „keine klinische Atrophie“ ( $MW_{IRS} = 2,74$ ). Die Expression ist in der Gruppe „klinische Atrophie“ etwas höher:

$t(58) = 1,241$ ,  $p = 0,219$ ,  $\alpha = 0,05$ . (Tabellen 85 und 86, Anhang 7.1.4)

Die Tabellen 33, 34 und die Abbildung 24 verdeutlichen die deskriptive Statistik bezüglich der Positivität. Die Färbeintensität lässt sich aus den Tabellen 35 und 36 sowie aus der Abbildung 25 erkennen. Zusammenfassend zeigen die Tabellen 37, 38 und die Abbildung 26 den Immunoreaktiven Score nach Anfärbung auf vWF.

Die statistischen Auswertungen finden sich im Anhang, Kapitel 7.1.4.

3.4.1 Deskriptive Statistik zur Positivität



**Abbildung 25:** Graphische Darstellung der Positivität des Transplantats, Transplantatlagers und Übergangsbereich nach Anfärbung von vWF in Abhängigkeit des klinischen Erscheinungsbildes und des Einheitszeitpunkte

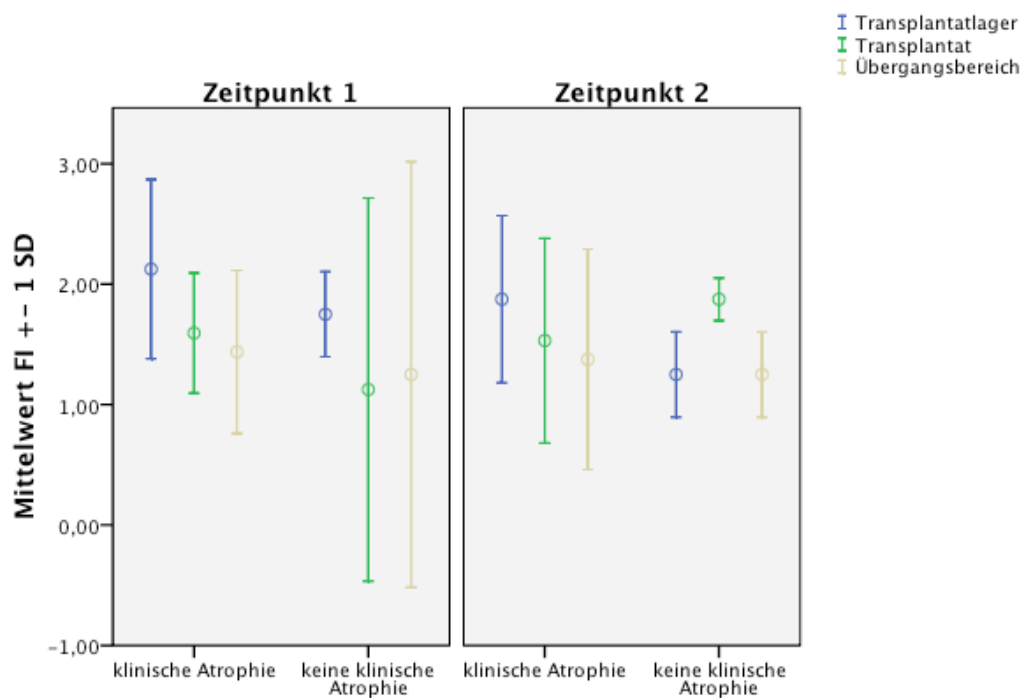
**Tabelle 33:** Zeitpunkt 1. Deskriptive Statistik: Standardabweichung und Mittelwerte des Transplantats, Transplantatlagers und Übergangsbereichs nach Anfärbung von vWF bezüglich der Positivität der Färbung

		Positivität		
		N	Mittelwert	Standardabweichung
Transplantatlager	klinische Atrophie	8	2,43750	0,821040
	keine klinische Atrophie	2	2,00000	0,000000
	Kontrolle	2	2,75000	0,353553
Transplantat	klinische Atrophie	8	1,87500	0,550973
	keine klinische Atrophie	2	1,25000	1,767767
	Kontrolle	2	2,00000	0,000000
Übergangsbereich	klinische Atrophie	8	1,81250	0,842509
	keine klinische Atrophie	2	1,00000	1,414214
	Kontrolle	2	2,00000	0,707107

**Tabelle 34: Zeitpunkt 2. Deskriptive Statistik: Standardabweichung und Mittelwerte des Transplantats, Transplantatlagers und Übergangsbereichs nach Anfärbung von vWF bezüglich der Positivität der Färbung**

		Positivität		
		N	Mittelwert	Standardabweichung
Transplantatlager	klinische Atrophie	8	2,12500	0,443203
	keine klinische Atrophie	2	1,25000	0,353553
	Kontrolle	2	1,00000	0,000000
Transplantat	klinische Atrophie	8	1,62500	0,801784
	keine klinische Atrophie	2	2,12500	0,530330
	Kontrolle	2	0,75000	0,353553
Übergangsbereich	klinische Atrophie	8	1,50000	1,000000
	keine klinische Atrophie	2	1,50000	0,707107
	Kontrolle	2	1,25000	0,353553

3.4.2 Deskriptive Statistik zur Färbeintensität



**Abbildung 26: Graphische Darstellung der Färbeintensität des Transplantats, Transplantatlagers und Übergangsbereichs nach Anfärbung von vWF in Abhängigkeit des klinischen Erscheinungsbildes und des Einheitszeitpunktes**

**Tabelle 35: Zeitpunkt 1. Deskriptive Statistik: Standardabweichung und Mittelwerte des Transplantats, Transplantatlagers und Übergangsbereichs nach Anfärbung von vWF bezüglich der Färbeintensität der Färbung**

		Färbeintensität		
		N	Mittelwert	Standardabweichung
Transplantatlager	klinische Atrophie	8	2,12500	0,744024
	keine klinische Atrophie	2	1,75000	0,353553
	Kontrolle	2	2,25000	0,353553
Transplantat	klinische Atrophie	8	1,59375	0,498883
	keine klinische Atrophie	2	1,12500	1,590990
	Kontrolle	2	1,87500	0,530330
Übergangsbereich	klinische Atrophie	8	1,43750	0,678101
	keine klinische Atrophie	2	1,25000	1,767767
	Kontrolle	2	2,00000	0,707107

**Tabelle 36: Zeitpunkt 2. Deskriptive Statistik: Standardabweichung und Mittelwerte des Transplantats, Transplantatlagers und Übergangsbereichs nach Anfärbung von vWF bezüglich der Färbeintensität der Färbung**

		Färbeintensität		
		N	Mittelwert	Standardabweichung
Transplantatlager	klinische Atrophie	8	1,87500	0,694365
	keine klinische Atrophie	2	1,25000	0,353553
	Kontrolle	2	1,25000	0,353553
Transplantat	klinische Atrophie	8	1,53125	0,849764
	keine klinische Atrophie	2	1,87500	0,176777
	Kontrolle	2	0,75000	0,353553
Übergangsbereich	klinische Atrophie	8	1,37500	0,916125
	keine klinische Atrophie	2	1,25000	0,353553
	Kontrolle	2	1,00000	0,000000



3.4.3 Deskriptive Statistik zum Immunreaktiven Score

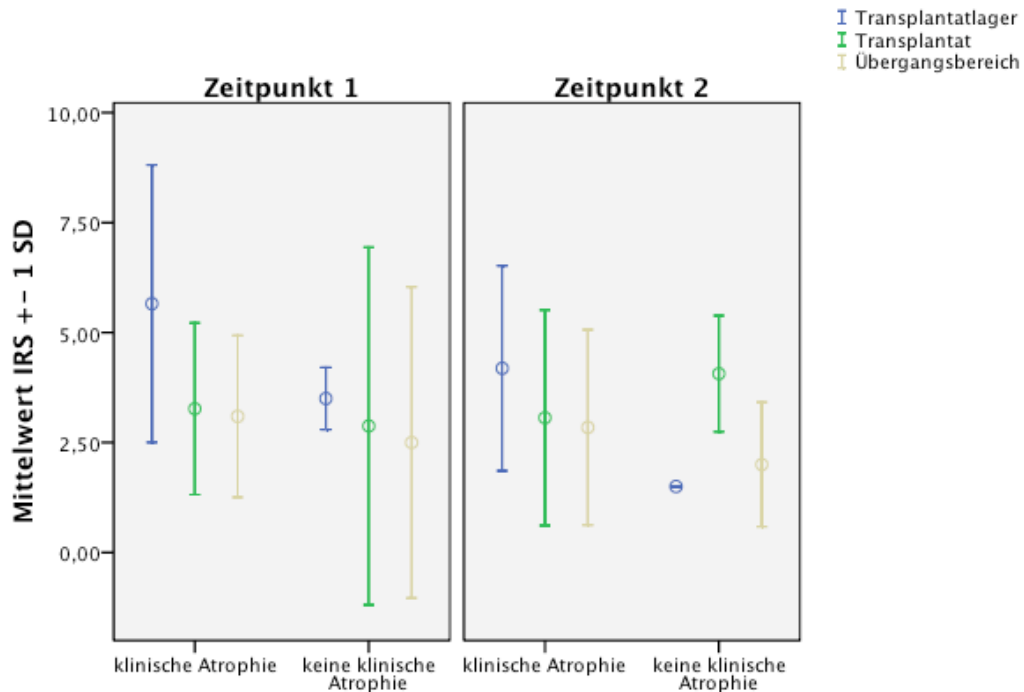


Abbildung 27 Graphische Darstellung des Immunreaktiven Scores des Transplantats, Transplantatlagers und Übergangsbereich nach Anfärbung von vWF in Abhängigkeit des klinischen Erscheinungsbildes und des Einheitszeitpunktes

Tabelle 37: Zeitpunkt 1. Deskriptive Statistik: Standardabweichung und Mittelwerte des Transplantats, Transplantatlagers und Übergangsbereichs nach Anfärbung von vWF bezüglich des Immunreaktiven Scores der Färbung

		IRS		
		N	Mittelwert	Standardabweichung
Transplantatlager	klinische Atrophie	8	5,65625	3,153619
	keine klinische Atrophie	2	3,50000	0,707107
	Kontrolle	2	6,25000	1,767767
Transplantat	klinische Atrophie	8	3,26750	1,953047
	keine klinische Atrophie	2	2,87500	4,065864
	Kontrolle	2	3,75000	1,060660
Übergangsbereich	klinische Atrophie	8	3,09375	1,841668
	keine klinische Atrophie	2	2,50000	3,535534
	Kontrolle	2	4,25000	2,828427

**Tabelle 38: Zeitpunkt 2. Deskriptive Statistik: Standardabweichung und Mittelwerte des Transplantats, Transplantatlagers und Übergangsbereichs nach Anfärbung von vWF bezüglich des Immunreaktiven Scores der Färbung**

		IRS		
		N	Mittelwert	Standardabweichung
Transplantatlager	klinische Atrophie	8	4,18750	2,328971
	keine klinische Atrophie	2	1,50000	0,000000
	Kontrolle	2	1,25000	0,353553
Transplantat	klinische Atrophie	8	3,06250	2,448578
	keine klinische Atrophie	2	4,06500	1,322290
	Kontrolle	2	0,75000	0,353553
Übergangsbereich	klinische Atrophie	8	2,84375	2,219787
	keine klinische Atrophie	2	2,00000	1,414214
	Kontrolle	2	1,25000	0,353553

### 3.5 Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS)

Die Daten zur Expression der Stickstoffmonoxid-Synthase sind in den Kapiteln 3.5.1 und 3.5.2 anhand der zwei untersuchten Isoformen zusammengefasst.

#### 3.5.1 Endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS)

Die Expression von eNOS zeigt den untersuchten Parametern „Positivität“ wie auch „Färbeintensität“ einen ähnlichen Verlauf. Die durch die hohen Werte ausgedrückte starke Expression von eNOS ist vor allem zum ersten Einheitszeitpunkt in allen ROIs zu finden. Der Unterschied der Mittelwerte bei gleichen Varianzen kann zumindest bzgl. des Parameters „Positivität“ als statistisch signifikant bezeichnet werden:

$MW_{POS}$  zum 1. ZP = 2,22,  $MW_{POS}$  zum 2. ZP = 1,84,  $t(70) = 2,305$ ,  $p = 0,024$ ,  $\alpha = 0,05$ . (Tabellen 93 und 94, Anhang 7.1.5.1)

Des Weiteren fällt in der Analyse der Daten eine vermehrte Expression im Bereich „Transplantatlager“ gegenüber den anderen zwei ROIs „Transplantat“ und „Übergangsbereich“ auf. Dieser Unterschied ist in allen drei untersuchten Parameter

ebenfalls als signifikant zu bezeichnen:

$p_{\text{IRS}} = 0,004$ ,  $p_{\text{POS}} = 0,019$  und  $p_{\text{FI}} = 0,019$ . (Tabellen 95 und 96, Anhang 7.1.5.1)

Des Weiteren zeigen sich höhere Werte in der Gruppe „keine klinische Atrophie“. Die Mittelwerte zeigen hier auch signifikante Unterschiede, wenn der erste Zeitpunkt gesondert betrachtet wird:

$p_{\text{IRS}} = 0,026$  und  $p_{\text{FI}} = 0,026$ . (Tabellen 97 und 98, Anhang 7.1.5.1)

Insgesamt befinden sich die gefundenen Werte auf hohem Niveau. Der IRS zum ersten Einheilzeitpunkt liegt in der Gruppe „keine klinische Atrophie“ im Transplantatlager bei 7,5, im Transplantat bei 4,58 und im Übergangsbereich bei 5,5.

Die Tabellen 39, 40 und die Abbildung 27 verdeutlichen die deskriptive Statistik bezüglich der Positivität. Die Färbintensität lässt sich aus den Tabellen 41 und 42 sowie aus der Abbildung 28 erkennen. Zusammenfassend zeigen die Tabellen 43, 44 und die Abbildung 29 den Immunoreaktiven Score nach Anfärbung auf eNOS.

Die statistischen Auswertungen bezüglich der Signifikanz finden sich im Anhang, Kapitel 7.1.5.1.

3.5.1.1 Deskriptive Statistik zur Positivität

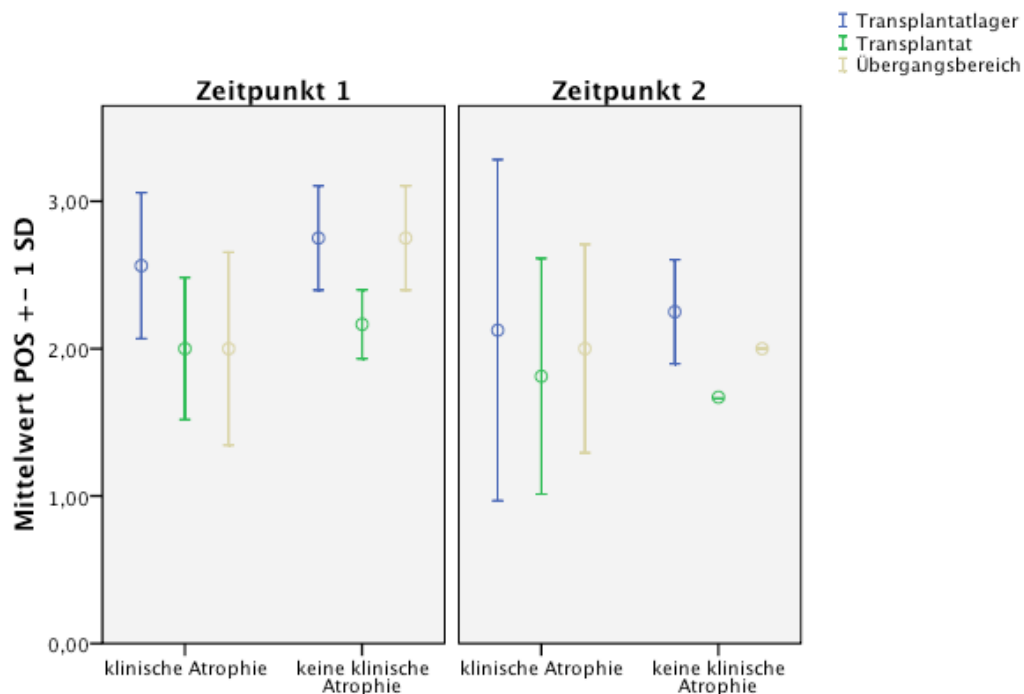


Abbildung 28 Graphische Darstellung der Positivität des Transplantats, Transplantatlagers und Übergangsbereich nach Anfärbung von eNOS in Abhängigkeit des klinischen Erscheinungsbildes und des Einheitszeitpunktes

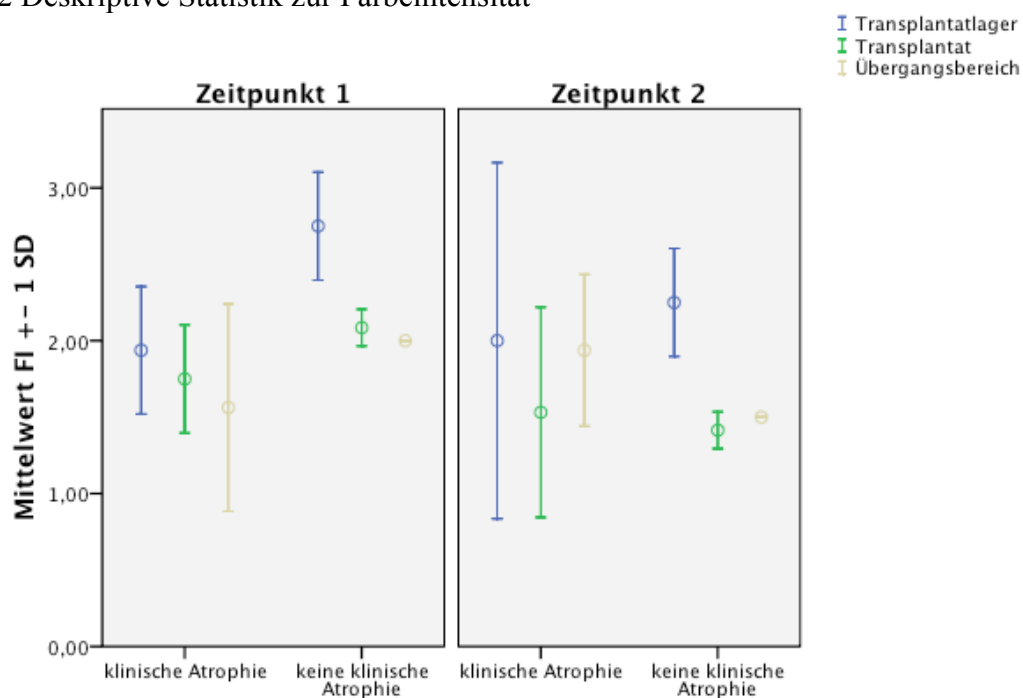
Tabelle 39: Zeitpunkt 1. Deskriptive Statistik: Standardabweichung und Mittelwerte des Transplantats, Transplantatlagers und Übergangsbereichs nach Anfärbung von eNOS bezüglich der Positivität der Färbung

		Positivität		
		N	Mittelwert	Standardabweichung
Transplantatlager	klinische Atrophie	8	2,56250	0,495516
	keine klinische Atrophie	2	2,75000	0,353553
	Kontrolle	2	2,50000	0,707107
Transplantat	klinische Atrophie	8	2,00000	0,481812
	keine klinische Atrophie	2	2,16500	0,233345
	Kontrolle	2	1,62500	0,530330
Übergangsbereich	klinische Atrophie	8	2,00000	0,654654
	keine klinische Atrophie	2	2,75000	0,353553
	Kontrolle	2	2,00000	0,000000

**Tabelle 40: Zeitpunkt 2. Deskriptive Statistik: Standardabweichung und Mittelwerte des Transplantats, Transplantatlagers und Übergangsbereichs nach Anfärbung von eNOS bezüglich der Positivität der Färbung**

		Positivität		
		N	Mittelwert	Standardabweichung
Transplantatlager	klinische Atrophie	8	2,12500	1,157275
	keine klinische Atrophie	2	2,25000	0,353553
	Kontrolle	2	1,50000	0,707107
Transplantat	klinische Atrophie	8	1,81250	0,798995
	keine klinische Atrophie	2	1,67000	0,000000
	Kontrolle	2	1,00000	0,707107
Übergangsbereich	klinische Atrophie	8	2,00000	0,707107
	keine klinische Atrophie	2	2,00000	0,000000
	Kontrolle	2	1,00000	0,707107

3.5.1.2 Deskriptive Statistik zur Färbeintensität



**Abbildung 29 Graphische Darstellung der Färbeintensität des Transplantats, Transplantatlagers und Übergangsbereich nach Anfärbung von eNOS in Abhängigkeit des klinischen Erscheinungsbildes und des Einheitszeitpunktes**

**Tabelle 41: Zeitpunkt 1. Deskriptive Statistik: Standardabweichung und Mittelwerte des Transplantats, Transplantatlagers und Übergangsbereichs nach Anfärbung von eNOS bezüglich der Färbeintensität der Färbung**

		Färbeintensität		
		N	Mittelwert	Standardabweichung
Transplantatlager	klinische Atrophie	8	1,93750	0,417261
	keine klinische Atrophie	2	2,75000	0,353553
	Kontrolle	2	2,25000	1,060660
Transplantat	klinische Atrophie	8	1,75000	0,353553
	keine klinische Atrophie	2	2,08500	0,120208
	Kontrolle	2	1,62500	0,530330
Übergangsbereich	klinische Atrophie	8	1,56250	0,678101
	keine klinische Atrophie	2	2,00000	0,000000
	Kontrolle	2	2,00000	0,707107

**Tabelle 42: Zeitpunkt 2. Deskriptive Statistik: Standardabweichung und Mittelwerte des Transplantats, Transplantatlagers und Übergangsbereichs nach Anfärbung von eNOS bezüglich der Färbeintensität der Färbung**

		Färbeintensität		
		N	Mittelwert	Standardabweichung
Transplantatlager	klinische Atrophie	8	2,00000	1,164965
	keine klinische Atrophie	2	2,25000	0,353553
	Kontrolle	2	1,75000	1,060660
Transplantat	klinische Atrophie	8	1,53125	0,687094
	keine klinische Atrophie	2	1,41500	0,120208
	Kontrolle	2	0,75000	0,353553
Übergangsbereich	klinische Atrophie	8	1,93750	0,495516
	keine klinische Atrophie	2	1,50000	0,000000
	Kontrolle	2	1,25000	1,060660

3.5.1.3 Deskriptive Statistik zum Immunreaktiven Score

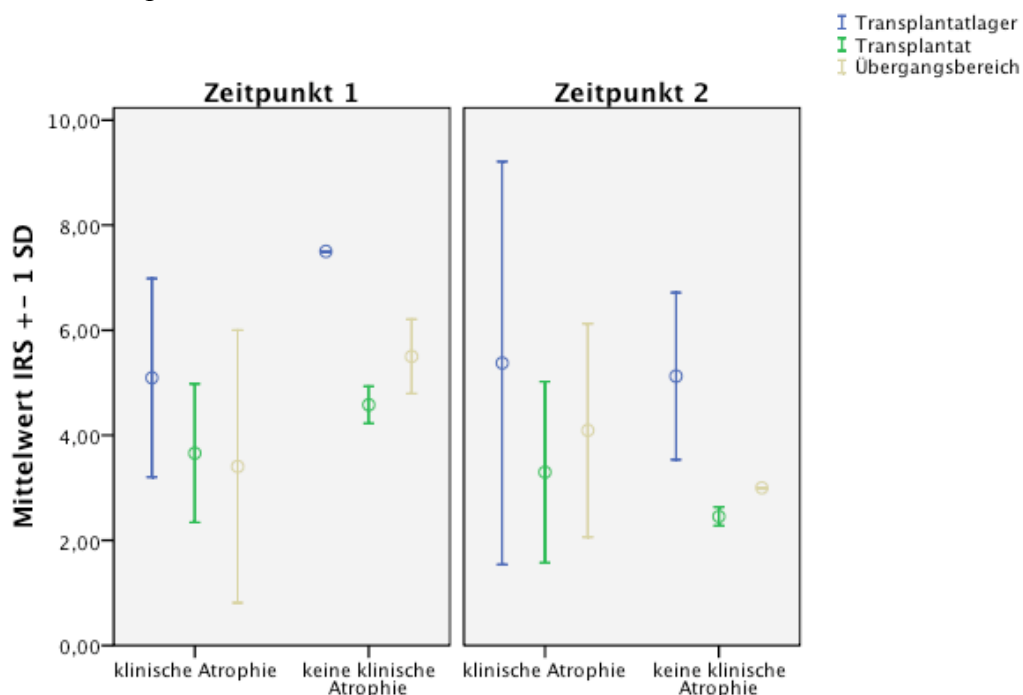


Abbildung 30: Graphische Darstellung des Immunreaktiven Scores des Transplantats, Transplantatlagers und Übergangsbereich nach Anfärbung von eNOS in Abhängigkeit des klinischen Erscheinungsbildes und des Einzelzeitpunktes

Tabelle 43: Zeitpunkt 1. Deskriptive Statistik: Standardabweichung und Mittelwerte des Transplantats, Transplantatlagers und Übergangsbereichs nach Anfärbung von eNOS bezüglich des Immunreaktiven Scores der Färbung

		IRS		
		N	Mittelwert	Standardabweichung
Transplantatlager	klinische Atrophie	8	5,09375	1,889527
	keine klinische Atrophie	2	7,50000	0,000000
	Kontrolle	2	6,00000	4,242641
Transplantat	klinische Atrophie	8	3,65875	1,317925
	keine klinische Atrophie	2	4,58000	0,353553
	Kontrolle	2	3,50000	0,707107
Übergangsbereich	klinische Atrophie	8	3,40625	2,594422
	keine klinische Atrophie	2	5,50000	0,707107
	Kontrolle	2	4,00000	1,414214

**Tabelle 44: Zeitpunkt 2. Deskriptive Statistik: Standardabweichung und Mittelwerte des Transplantats, Transplantatlagers und Übergangsbereichs nach Anfärbung von eNOS bezüglich des Immunreaktiven Scores der Färbung**

		IRS		
		N	Mittelwert	Standardabweichung
Transplantatlager	klinische Atrophie	8	5,37500	3,833592
	keine klinische Atrophie	2	5,12500	1,590990
	Kontrolle	2	3,00000	2,828427
Transplantat	klinische Atrophie	8	3,29750	1,721351
	keine klinische Atrophie	2	2,45500	0,176777
	Kontrolle	2	1,00000	0,707107
Übergangsbereich	klinische Atrophie	8	4,09375	2,030735
	keine klinische Atrophie	2	3,00000	0,000000
	Kontrolle	2	1,62500	1,944544

### 3.5.2 Induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS)

Die Expression von iNOS in den untersuchten Präparaten zeigt den zwei Gruppen „klinische Atrophie“ und „keine klinische Atrophie“ eine Abschwächung der Werte im Zeitverlauf der zwei Einheilzeitpunkte. Von einem hohen Niveau am Zeitpunkt eins ausgehend, wird die Expression von iNOS bezüglich Positivität und Färbeintensität geringer. Dieser Unterschied lässt sich als statistisch signifikant bezeichnen; bei gleichen Varianzen zeigen die Mittelwerte in allen drei untersuchten Parametern „Positivität“ (POS), „Färbeintensität“ (FI) und dem „Immunreaktiven Score“ (IRS) statistisch hoch signifikante Unterschiede:

IRS:  $t(70) = 4,301$ ,  $p = 0,000$ ,  $\alpha = 0,05$ . (Tabellen 101 und 102, Anhang 7.1.5.2)

Analog zur untersuchten Isoform eNOS zeigt auch bei der Färbung auf iNOS die ROI „Transplantatlager“ mehr Expression. Auch hier zeigt der Vergleich der Mittelwerte bei gleichen Varianzen einen signifikanten Unterschied:

IRS:  $t(46) = 2,832$ ,  $p = 0,007$ ,  $\alpha = 0,05$ . (Tabellen 103 und 104, Anhang 7.1.5.2)



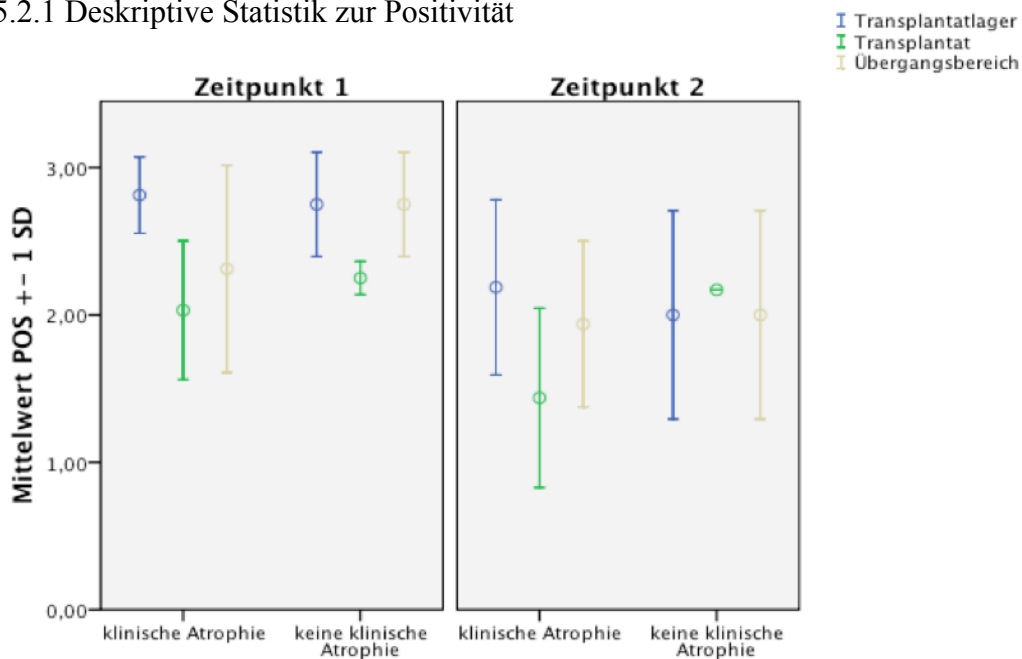
Dies ist vor allem am ersten Einheitszeitpunkt zu beobachten.

Der Unterschied zwischen den Gruppen „keine klinische Atrophie“ und „klinische Atrophie“ ist gering zu Gunsten einer vermehrten Expression in der Gruppe „keine klinische Atrophie“ verschoben, jedoch ohne statistisch relevante Unterschiede (Tabellen 99 und 100, Anhang 7.1.5.2)

Die IRS Werten dieser Gruppe zum ersten untersuchten Zeitpunkt von 7,00 in der ROI „Transplantatlager“, 5,04 im „Transplantat“ und 5,75 im „Übergangsbereich“ zeigen das starke Expression zu Beginn. Im weiteren Verlauf nehmen alle Werte in allen ROIs beider Gruppen kontinuierlich ab.

Die Tabellen 45, 46 und die Abbildung 30 verdeutlichen die deskriptive Statistik bezüglich der Positivität. Die Farbeintensität lässt sich aus den Tabellen 47 und 48 sowie aus der Abbildung 31 erkennen. Zusammenfassend zeigen die Tabellen 49, 50 und die Abbildung 32 den Immunoreaktiven Score nach Anfärbung auf iNOS. Die statistische Auswertung findet sich im Anhang, Kapitel 7.1.5.2.

3.5.2.1 Deskriptive Statistik zur Positivität



**Abbildung 31: Graphische Darstellung der Positivität des Transplantats, Transplantatlagers und Übergangsbereich nach Anfärbung von iNOS in Abhängigkeit des klinischen Erscheinungsbildes und des Einheitszeitpunktes**

**Tabelle 45: Zeitpunkt 1. Deskriptive Statistik: Standardabweichung und Mittelwerte des Transplantats, Transplantatlagers und Übergangsbereichs nach Anfärbung von iNOS bezüglich der Positivität der Färbung**

		Positivität		
		N	Mittelwert	Standardabweichung
Transplantatlager	klinische Atrophie	8	2,81250	0,258775
	keine klinische Atrophie	2	2,75000	0,353553
	Kontrolle	2	2,75000	0,353553
Transplantat	klinische Atrophie	8	2,03125	0,471273
	keine klinische Atrophie	2	2,25000	0,113137
	Kontrolle	2	1,25000	0,353553
Übergangsbereich	klinische Atrophie	8	2,31250	0,703943
	keine klinische Atrophie	2	2,75000	0,353553
	Kontrolle	2	1,25000	0,353553

**Tabelle 46: Zeitpunkt 2. Deskriptive Statistik: Standardabweichung und Mittelwerte des Transplantats, Transplantatlagers und Übergangsbereichs nach Anfärbung von iNOS bezüglich der Positivität der Färbung**

		Positivität		
		N	Mittelwert	Standardabweichung
Transplantatlager	klinische Atrophie	8	2,18750	0,593867
	keine klinische Atrophie	2	2,00000	0,707107
	Kontrolle	2	1,00000	0,707107
Transplantat	klinische Atrophie	8	1,43750	0,608716
	keine klinische Atrophie	2	2,17000	0,000000
	Kontrolle	2	0,87500	0,883883
Übergangsbereich	klinische Atrophie	8	1,93750	0,562996
	keine klinische Atrophie	2	2,00000	0,707107
	Kontrolle	2	0,75000	1,060660

3.5.2.2 Deskriptive Statistik zur Färbeintensität

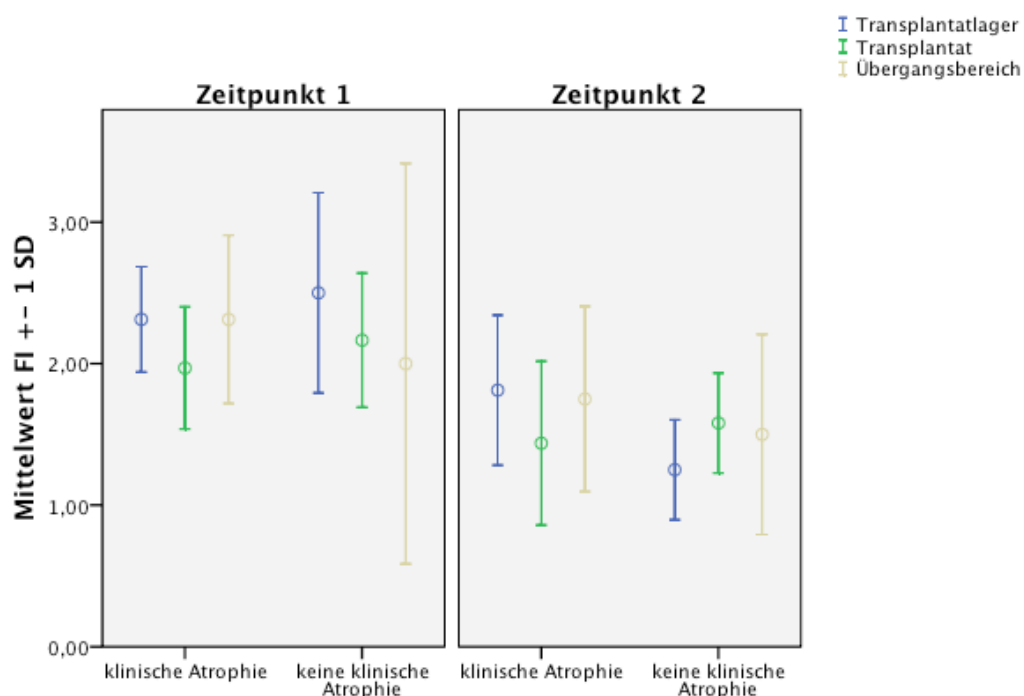


Abbildung 32: Graphische Darstellung der Färbeintensität des Transplantats, Transplantatlagers und Übergangsbereich nach Anfärbung von iNOS in Abhängigkeit des klinischen Erscheinungsbildes und des Einheilzeitpunktes

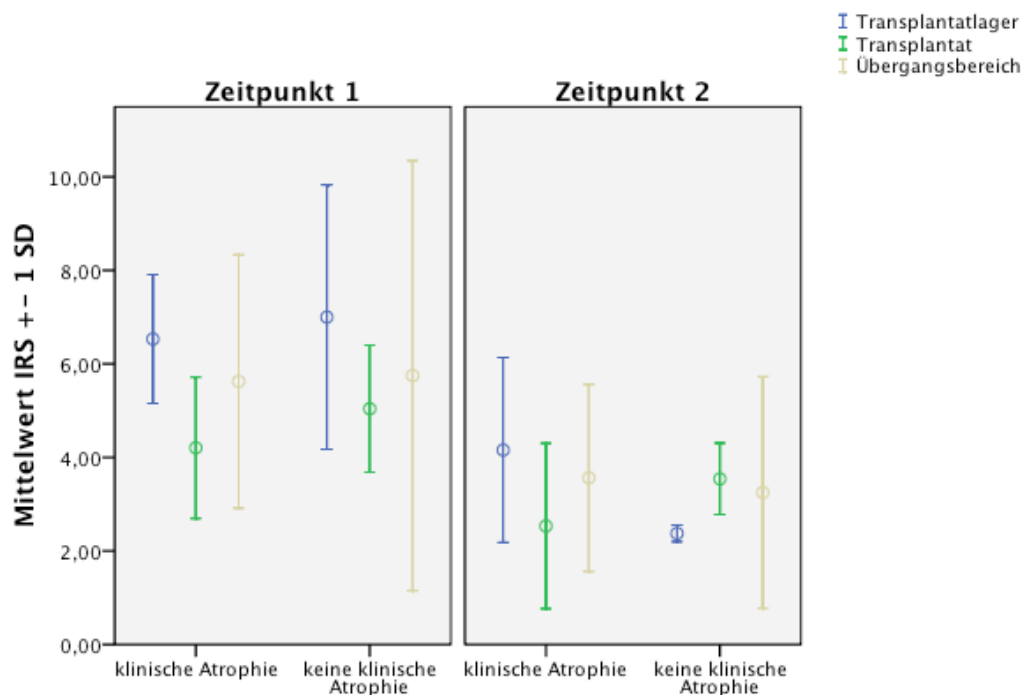
Tabelle 47: Zeitpunkt 1. Deskriptive Statistik: Standardabweichung und Mittelwerte des Transplantats, Transplantatlagers und Übergangsbereichs nach Anfärbung von iNOS bezüglich der Färbeintensität der Färbung

		Färbeintensität		
		N	Mittelwert	Standardabweichung
Transplantatlager	klinische Atrophie	8	2,31250	0,372012
	keine klinische Atrophie	2	2,50000	0,707107
	Kontrolle	2	2,25000	0,353553
Transplantat	klinische Atrophie	8	1,96875	0,431722
	keine klinische Atrophie	2	2,16500	0,473762
	Kontrolle	2	1,50000	0,707107
Übergangsbereich	klinische Atrophie	8	2,31250	0,593867
	keine klinische Atrophie	2	2,00000	1,414214
	Kontrolle	2	1,75000	0,353553

**Tabelle 48: Zeitpunkt 2. Deskriptive Statistik: Standardabweichung und Mittelwerte des Transplantats, Transplantatlagers und Übergangsbereichs nach Anfärbung von iNOS bezüglich der Färbeintensität der Färbung**

		Färbeintensität		
		N	Mittelwert	Standardabweichung
Transplantatlager	klinische Atrophie	8	1,81250	0,530330
	keine klinische Atrophie	2	1,25000	0,353553
	Kontrolle	2	1,50000	1,414214
Transplantat	klinische Atrophie	8	1,43750	0,578638
	keine klinische Atrophie	2	1,58000	0,353553
	Kontrolle	2	1,50000	1,414214
Übergangsbereich	klinische Atrophie	8	1,75000	0,654654
	keine klinische Atrophie	2	1,50000	0,707107
	Kontrolle	2	1,00000	1,414214

3.5.2.3 Deskriptive Statistik zum Immunreaktiven Score



**Abbildung 33: Graphische Darstellung des Immunreaktiven Scores des Transplantats, Transplantatlagers und Übergangsbereichs nach Anfärbung von iNOS in Abhängigkeit des klinischen Erscheinungsbildes und des Einheitszeitpunktes**

**Tabelle 49: Zeitpunkt 1. Deskriptive Statistik: Standardabweichung und Mittelwerte des Transplantats, Transplantatlagers und Übergangsbereichs nach Anfärbung von iNOS bezüglich des Immunreaktiven Scores der Färbung**

		IRS		
		N	Mittelwert	Standardabweichung
Transplantatlager	klinische Atrophie	8	6,53125	1,378648
	keine klinische Atrophie	2	7,00000	2,828427
	Kontrolle	2	6,25000	1,767767
Transplantat	klinische Atrophie	8	4,20500	1,509352
	keine klinische Atrophie	2	5,04000	1,357645
	Kontrolle	2	2,50000	2,121320
Übergangsbereich	klinische Atrophie	8	5,62500	2,709112
	keine klinische Atrophie	2	5,75000	4,596194
	Kontrolle	2	2,12500	0,176777

**Tabelle 50: Zeitpunkt 2. Deskriptive Statistik: Standardabweichung und Mittelwerte des Transplantats, Transplantatlagers und Übergangsbereichs nach Anfärbung von iNOS bezüglich des Immunreaktiven Scores der Färbung**

		IRS		
		N	Mittelwert	Standardabweichung
Transplantatlager	klinische Atrophie	8	4,15625	1,977270
	keine klinische Atrophie	2	2,37500	0,176777
	Kontrolle	2	2,00000	2,474874
Transplantat	klinische Atrophie	8	2,53250	1,767983
	keine klinische Atrophie	2	3,54000	0,763675
	Kontrolle	2	1,94000	2,559727
Übergangsbereich	klinische Atrophie	8	3,56250	1,998884
	keine klinische Atrophie	2	3,25000	2,474874
	Kontrolle	2	1,50000	2,121320

## 4 Diskussion

In der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie stellt die Transplantation von autologem Knochen nach wie vor den Goldstandard bei der Rekonstruktion knöcherner Defekte dar. Lediglich das autologe Knochenransplantat erfüllt die drei Prinzipien der Knochenneubildung; Osteogenität, Osteoinduktion und Osteokonduktion.[134; 21; 22; 33]

Unter Osteogenität versteht man die Synthese neuen Knochengewebes durch differenzierte Osteoblasten oder Osteoprogenitorzellen in Abwesenheit undifferenzierter Stammzellen. Osteoinduktion bezeichnet die Proliferation und Differenzierung mesenchymaler Stammzellen zu Chondroblasten und Osteoblasten, die nachfolgend neuen Knochen bilden. Die Leitschienenfunktion, die die Proliferation von Osteoblasten entlang der eingebrachten Materialien beschreibt, wird als osteokonduktive Eigenschaft eines Materials bezeichnet.

Die als Remodelling bezeichneten Umbauvorgänge innerhalb des Knochengewebes, bei dem bereits vorhandener Geflechtknochen durch funktionell höherwertigen Lamellenknochen ersetzt wird und die damit einhergehenden angiogenen Fähigkeiten, die eine rasche Revitalisierung des Transplantates aus der Umgebung gewährleisten, sind vor allem beim autologen Knochenransplantat gegeben.[116]

Diese Prozesse werden durch eine Vielzahl an Wachstumsfaktoren und osteoinduktiven Proteinen wie den Bone Morphogenetic Proteins (BMPs) gesteuert. Die kapilläre Gefäßbildung, die Proliferation und Differenzierung mesenchymaler Stammzellen und Osteoprogenitorzellen sowie die Aktivierung von Makrophagen spielen in der Regulation dieser Vorgänge ebenfalls eine entscheidende Rolle.[6; 88]

Der autologe Knochen erfüllt diese Bedingungen von allen Knochenransplantaten am besten und gilt auf Grund der guten Prognostizierbarkeit als etablierte Methode in der rekonstruktiven Chirurgie.

In der vorliegenden Arbeit wurden unterschiedliche Konditionierungen des Transplantatlagers und deren klinischer Erfolg miteinander verglichen. Auf Grundlage dieser Ergebnisse konnte die Expression von Wachstums- und Differenzierungsfaktoren

sowie Marker der Revaskularisierung im Transplantatlager und im Transplantat und deren Einfluss auf den Grad der klinischen Atrophie näher untersucht werden.

#### 4.1 Tierexperimentelle Untersuchungen als Grundlage

Die dieser Arbeit zu Grunde liegenden Proben der tierexperimentellen Untersuchungen am Schafmodell wurden von Reuther im Rahmen der Arbeit über die Qualität des autologen Knochentransplantates und Transplantatlagers in der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie gewonnen.[110]

Das eingesetzte Schafmodell zeigt sich im Bezug auf Anatomie, Größe und Körpergewicht als Versuchstier gut geeignet. Auch die quantitativen Schwankungen der Hormonprofile im Zeitverlauf ähneln denen des Menschen.[56]

Die in dieser Studie untersuchten Knochenstrukturen weisen ebenfalls eine große Gemeinsamkeit zwischen dem Mensch und dem Versuchstier Schaf auf.[103; 131]

Auch der Knochenstoffwechsel sowie die Knochenregenerationsraten sind vergleichbar.[132; 57; 44]

Des Weiteren spricht die umfangreiche Datenlage und die Etablierung des Schafmodells für die Eignung, die Fragestellungen zur Modifikation des Transplantatlagers bei Unterkieferaugmentationsplastiken zu beantworten.

Die beste Methode stellt die Kombination der resorbierbaren Membran Bio-Gide® und des Knochenersatzmaterials Bio-Oss® mit einem kortikospongiösen Knochentransplantat entsprechend der in Kapitel 2.2.1.2.5 und Abbildung 7 dargestellten Methode dar.[110; 1; 2]

Hier konnten bereits nach vier Wochen an den Bio-Oss®-Partikeln osteoblastäre Zellen und nach 12 Wochen neu gebildeter, trabekulärer Knochen in und um die Bio-Oss®-Partikel nachgewiesen werden. Die Vorteile der Kombination des Knochenersatzmaterials Bio-Oss® mit einer Bio-Gide® Membran, die im Sinne einer Guided Bone Regeneration (GBR) schnell wachsende nicht osteogene Gewebe von einer Invasion in den Knochendefekt abhält und somit einen mechanischen Schutz des Transplantates und des umgebenden KEM gewährleistet, scheinen der Grund für die Reduktion der Knochenresorption zu sein.[110]

Die Kombination von Bio-Oss® mit einer resorbierbaren Membran im Sinne der GBR ist bereits aus anderen Voruntersuchungen als Erfolg versprechende Methode bekannt.[3; 85]

Auch wenn Voruntersuchungen bereits die Biokompatibilität von Bio-Oss® ohne endzündliche Veränderungen des Empfängerbettes zeigen konnten, traten die einzigen Infektionen in der vorliegenden Studie in den Transplantaten der Konditionierung mit Bio-Oss® auf.[139; 110]

Die Tatsache, dass Bio-Oss® als xenogenes Transplantat auch nach Deproteinierung noch immer kleine Mengen an potentiell antigenen Proteinen enthält und die durch die langsame Resorption verlängerte Immunantwort durch Bio-Oss® verbunden mit einer Fremdkörperreaktion scheinen als Erklärung für die aufgetretenen Infektionen denkbar.[110]

Die mit Bio-Oss® und der Bio-Gide® Membran konditionierten Präparate wurden auf Grund der geringeren Resorption als Gruppe „keine klinische Atrophie“ allen anderen Konditionierungen, die als Gruppe „klinische Atrophie“ zusammengefasst wurde, gegenüber gestellt. Die hohe Rate an Resorptionen innerhalb dieser Gruppe deckt sich mit den Angaben aus der Literatur über die Resorption von Beckenkammtransplantaten.[53; 3; 43; 41; 42; 36; 68]

## 4.2 Immunhistochemische Untersuchungen

In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression verschiedener Wachstumsfaktoren, osteoinduktiver Faktoren und Marker des Endothels und der Revaskularisierung in drei ROIs des Präparates, dem „Transplantat“, „Transplantatlager“ und dem „Übergangsbereich“ zu einem frühen und einem späten Einheilzeitpunkt untersucht. Hier sollen die in Kap. 3 dargestellten Ergebnisse gesondert für jeden untersuchten Antikörper hinsichtlich ihrer Bedeutung bewertet und untersucht werden.



#### 4.2.1 Bone Morphogenetic Protein-2 (BMP-2)

Die starke Expression von BMP-2 in der Gruppe „keine klinische Atrophie“ und die dort auffallende Expression vor allem zum zweiten Einheilzeitpunkt in der ROI „Transplantat“, lässt auf die Bedeutung von BMP-2 für die Ossifikation schließen. BMP-2, kann als osteoinduktiver Faktor Stammzellen rekrutieren und in osteoblastäre und chondrozytäre Zellen differenzieren. Weiterhin führt BMP-2 zur Proliferation von Osteoblasten und zur Synthese von Kollagen und Osteocalcin und besitzt damit eine entscheidende Rolle für den Knochenstoffwechsel wie bereits in mehreren Arbeiten gezeigt werden konnte.[14; 17; 52; 12; 13]

Auch der klinische Einsatz von BMP-2 als Katalysator ossärer Remodelling- und Integrationsprozesse wurde untersucht und bewies sich speziell im Bezug auf Augmentationsverfahren im mund-, kiefer- und gesichtschirurgischen Bereich als vorteilhaft.[17; 16; 63]

Signifikant mehr Expression fand sich in der ROI „Transplantat“ und deutlich mehr BMP-2 wurde in der Bio-Oss® Ummantellung im Gegensatz zu den Konditionierungen ohne Verwendung von Knochenersatzmaterialien exprimiert. (siehe hierzu Ergebnisteil, Kapitel 3.1)

Die Tatsache, dass BMP-2 vor allem in der Spätphase von Ossifikationsprozessen verstärkt exprimiert wird, wie auch in dieser Studie festgestellt werden konnte, deckt sich mit den Berichten aus der Literatur.[14]

Die Tatsache, dass gerade in der Gruppe „keine klinische Atrophie“, in der nach der kompletten Einheilzeit die meiste Knochensubstanz vorhanden war, am stärksten BMP-2 exprimiert wurde, lässt sich ebenfalls mit der osteoinduktiven Potenz und der Fähigkeit zur Proliferation von ossären Zellen und damit der Synthese von Knochengewebe erklären. In dieser Gruppe wurde mit Abstand am meisten neues Knochengewebe gebildet und somit war auch hier die gemessene Expression von BMP-2 am größten.

Die starke Expression von BMP-2 in der ROI „Transplantat“ spricht für eine gute

Vaskularisierung des Transplantates und Zugangsmöglichkeit im Rahmen der therapeutischen Nutzung von BMP-2 .

Die klinische Anwendung von BMP-2 als osteoinduktiver Faktor in Zusammenhang mit der hier vorgestellten Konditionierung des Transplantatlagers entsprechend der Gruppe „keine klinische Atrophie“, wäre in weiteren Studien auf ihre Wirksamkeit und ihren Nutzen hin zu untersuchen. Dies scheint auf Grund der signifikant stärkeren Expression von BMP-2 in den immunhistochemischen Untersuchungen und die fehlende bzw. geringe Atrophie des Transplantates in der klinischen Bewertung, ein vielversprechender Ansatz zu sein.

#### 4.2.2 Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)

Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) ist ein die Angiogenese induzierendes Zytokin. VEGF regt die Proliferation von Endothelzellen an und wirkt darüber hinaus vasodilatativ.[143; 50]

Die Bedeutung von VEGF im Rahmen von Ossifikationsprozessen besteht in der chemotaktischen Migration von humanen Osteozyten, der Maturation von neu entstandenem Kallus und in der Eigenschaft als Wachstumsfaktor der Angiogenese, den Knochenersatz und Knochenumsatz insgesamt zu fördern.[89]

Die Expression von VEGF in der vorliegenden Studie zeigt zum frühen Einheilzeitpunkt keinen Unterschied zwischen den Gruppen „keine klinische Atrophie“ und „klinische Atrophie“. Bei den Färbungen zum späteren Einheilzeitpunkt ergab sich jedoch eine signifikant vermehrte Expression von VEGF in der Gruppe „keine klinische Atrophie“, hier vor allem in der ROI „Transplantat“. Diese Beobachtung fußt vor allem auf der gesunkenen Expression in der Kontrollgruppe bei in etwa gleich bleibenden Werten in der Gruppe „keine klinische Atrophie“. Insgesamt bewegt sich die Expression von VEGF in der vorliegenden Untersuchung auf mittlerem Niveau. Siehe hierzu die Ausführungen im Ergebnisteil, Kapitel 3.2.

Die Tatsache, dass VEGF vor allem in den frühen Stadien der Knochenbildung und –heilung exprimiert wird, deckt sich mit Berichten aus der Literatur.[124; 101] Die gleichbleibend hohe Expression in der Gruppe „kein klinische Atrophie“, also der Modifikation mit Bio-Oss® und Bio-Gide®, im Gegensatz zur sinkenden Expression in der Kontrollgruppe ließe sich durch die verspätete Einwanderung von angiogenetischen Faktoren vom Transplantatlager in das Transplantat erklären. In der ROI „Transplantat“ zeigt sich eine signifikant vermehrte Expression von VEGF im Gegensatz zur untersuchten ROI „Transplantatlager“.

Diese unterschiedliche Expression in den untersuchten ROIs sowie die Tatsache, dass die Expression in der Kontrollgruppe im Zeitverlauf sinkt, während sie in der Gruppe „keine klinische Atrophie“ gleichbleibend hoch ist, ließe sich mit den Beobachtungen von Adeyemo et al. erklären.[1; 2]

In Adeyemos Arbeit ist die durch Bio-Gide® und Bio-Oss® kreierte Barriere für die verspätete Revaskularisierung verantwortlich.

Dies könnte die anhaltend hohe Expression in der Gruppe „keine klinische Atrophie“ im Vergleich zur Kontrollgruppe und die signifikant vermehrte Expression im Bereich des Transplantates im Gegensatz zum Transplantatlager erklären.

Die vermehrte Expression von VEGF als obligatorischer Faktor der Knochenheilung in der Modifikation, die mit deutlich weniger Atrophie in den klinischen Voruntersuchungen einherging, spricht für die Bedeutung von VEGF für die Revaskularisation im Rahmen der Ossifikationsprozesse im Transplantat.

#### 4.2.3 Vascular Endothelial Growth Factor Rezeptor (VEGFR)

Die Bedeutung der gewonnenen Ergebnisse der beiden untersuchten Isoformen werden in den Kapiteln 4.2.3.1 und 4.2.3.2 dargestellt.

#### 4.2.3.1 Vascular Endothelial Growth Factor Rezeptor-1 (VEGFR-1)

VEGFR-1 wird vor allem auf Endothelzellen exprimiert und kommt im Rahmen der Knochenbildung und -heilung auch auf Osteoprogenitorzellen und Osteoblasten vor.[37; 38; 132]

In den vorliegenden Daten zeigt sich eine signifikant vermehrte Expression von VEGFR-1 zum frühen Einheilzeitpunkt gegenüber dem späteren Einheilzeitpunkt. Die Konditionierung des Transplantatlagers mit Bio-Gide® und Bio-Oss® als Gruppe „keine klinische Atrophie“ exprimiert ebenfalls signifikant mehr VEGFR-1 als die Kontrollgruppe zum zweiten Einheilzeitpunkt. Siehe hierzu die Ausführungen im Ergebnisteil, Kapitel 3.3.1.

Dies deckt sich mit den Berichten aus der Literatur, die ebenfalls die vermehrte Expression von VEGF und damit auch seinem Rezeptor VEGFR-1 gerade in den frühen Phasen der Ossifikation beschreiben.[124; 101]

VEGR-1 als eine Isoform der Rezeptoren von VEGF und ebenfalls Marker der Revaskularisation zeigt eine ähnliche Expression wie VEGF in den untersuchten Präparaten und unterstreicht die Bedeutung von VEGF für die Revaskularisierung im Rahmen der Ossifikationsprozesse. Insbesondere in der Konditionierung, die auch mit einem mehr an neu gebildetem Knochen einherging.

#### 4.2.3.2 Vascular Endothelial Growth Factor Rezeptor-2 (VEGFR-2)

Die zweite untersuchte Isoform der VEGF Rezeptoren, der VEGFR-2 ist wie VEGFR-1 ein Indikator für die Revaskularisation. VEGFR-2 wird vor allem auf Endothelzellen exprimiert und scheint darüber hinaus die Endothelzellenproliferation zu induzieren.[129; 77]

Die Expression von VEGFR-2 in den vorliegenden Untersuchungen zeigt sich wie auch in der Analyse der Daten zum VEGF und dessen Rezeptor VEGFR-1 eine signifikant vermehrte Expression zum ersten Einheilzeitpunkt gegenüber dem zweiten Zeitpunkt.

Signifikant mehr VEGFR-2 wird in der Konditionierung des Transplantatlagers mit Bio-Gide® und Bio-Oss® als Gruppe „keine klinische Atrophie“ gefunden. Weitere Einzelheiten hierzu finden sich im Ergebnisteil, Kapitel 3.3.2.

Die Analogie der Expression von VEGFR-2 zu der untersuchten Isoform VEGFR-1 sowie zum Liganden der zwei Rezeptoren VEGF sollte zusammenfassend als Spiegel der Revaskularisierung betrachtet werden.

Zum einen stützt die Tatsache, dass sich eine vermehrte Expression aller drei VEGF assoziierten untersuchten Antikörpern zum ersten Einheitszeitpunkt fand, die Daten aus der Literatur, dass VEGF vor allem in den frühen Stadien der Knochenbildung und –heilung von herausragender Bedeutung ist.[124; 101]

Darüber hinaus ist die vermehrte Expression in der mit Bio-Gide® und Bio-Oss® modifizierten Konditionierung und die damit verbundene vermehrte Revaskularisation für die verringerte klinische Atrophie und die Stabilität des neu gebildeten Knochens im Rahmen dieser Untersuchung als immanent wichtig zu erachten.

#### 4.2.4 von-Willebrand-Factor (vWF)

Die insgesamt relative geringe Expression von vWF in den untersuchten Präparaten geht mit einer signifikant vermehrten Expression zum ersten Einheitszeitpunkt einher, auch wenn sich diese absolut gesehen auf geringem Niveau bewegt. Kapitel 3.4 dieser Arbeit geht näher auf die Ergebnisse der Färbungen auf vWF ein.

Die Tatsache, dass in den vorliegenden Untersuchungen in der Kontrollgruppe „klinische Atrophie“ mehr vWF als in der mit Bio-Gide® und Bio-Oss® konditionierten Gruppe „keine klinische Atrophie“ exprimiert wird, ließe sich dadurch erklären, dass vWF in der Literatur neben der Markerfunktion für die Identifikation von Endothel ebenfalls als Marker der endothelialen Dysfunktion beschrieben wird. [82; 85; 27]

Die gestörten Revaskularisierungsprozesse in der Kontrollgruppe und die damit einhergehende Atrophie des Knochentransplantates könnten Ausdruck der gestörten endothelialen Funktion sein. Somit wäre auch die vermehrte Expression des vWF in der

Gruppe „klinische Atrophie“ als Ausdruck dieser Dysfunktion erklärbar.

#### 4.2.5 Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS)

Stickstoffmonoxid (NO) zeichnet sich im Rahmen des Knochenstoffwechsel durch die Inhibition von Osteoklasten und die Stimulation der Osteogenese aus.[24]

Darüber hinaus kann NO seine Wirkung neben dem NO / cGMP-Weg auch direkt oder nach Reaktion mit reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und Bildung von Peroxynitrit entfalten. ROS sind in die Regulation von Osteoklasten und Osteoblasten einbezogen.[60; 108]

##### 4.2.5.1 Endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS)

Die Expression von eNOS ist im Allgemeinen vor allem in den kortikalen Blutgefäßen, den Osteozyten und Osteoklasten in den frühen Phasen der Frakturheilung zu beobachten.[30; 79]

Dies ist auch in der vorliegenden Arbeit nachzuvollziehen. (siehe Ergebnisteil, Kapitel 3.5.1) Auch hier findet sich zum ersten Einheitszeitpunkt eine signifikant vermehrte Expression. Die ebenfalls signifikant gesteigerte Expression von eNOS in der ROI „Transplantatlager“ ließe sich durch die dort gesteigerte Revaskularisierung sowie vermehrt auftretende Osteozyten und Osteoklasten erklären. Die Analyse der Daten hinsichtlich der Konditionierungen des Transplantatlagers zeigt eine signifikant vermehrte Expression in der Gruppe „keine klinische Atrophie“. Der Zusammenhang zwischen der geringeren klinischen Atrophie des Transplantates und der signifikant vermehrten Expression der endothelialen Stickstoffmonoxid-Synthase in der entsprechenden Gruppe unterstreicht die Bedeutung von eNOS für Ossifikationsprozesse.

Als Marker der kortikalen Blutgefäße spiegelt die vermehrte Expression von eNOS die gesteigerte vaskuläre Einsprossung in das Transplantatlager, vor allem in der Konditionierung mit den geringsten atrophischen Veränderungen wieder.

#### 4.2.5.2 Induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS)

Entgegen den Untersuchungen von Corbett et al. konnte in der Analyse der vorliegenden Daten analog zu den Ergebnissen der Färbungen auf eNOS eine Abschwächung der Werte zum zweiten Einheitszeitpunkt festgestellt werden. Corbett et al. beschreiben eine vermehrte Expression von iNOS vor allem in der späteren Phase der Frakturheilung.[30]

Ebenfalls analog zu den unter 4.2.5.1 bewerteten Ergebnissen der Färbungen für eNOS, zeigte sich bei der Analyse der ROIs eine signifikant vermehrte Expression im „Transplantatlager“ gegenüber der „Transplantat“ – Gruppe. Des Weiteren war die Expression in der Gruppe „keine klinische Atrophie“, die mit Bio-Gide® und Bio-Oss® modifiziert wurde gegenüber der Gruppe „klinische Atrophie“ signifikant vermehrt.

Die Zusammenschau der Ergebnisse der beiden NOS Isoformen und vor allem die Tatsache, dass die Expression in der Gruppe „keine klinische Atrophie“ signifikant vermehrt war, spricht für die Bedeutung von NO für die Frakturheilung und hier vor im vaskularisierten Transplantatlager.

Vor allem die Inhibition der Osteoklasten sowie die Stimulation der Osteogenese durch NOS scheinen in diesem Zusammenhang für die klinisch verminderte Atrophie in den Gruppen, in denen auch eine signifikant vermehrte Expression nachweisbar war, verantwortlich zu sein. [24]

## 5 Zusammenfassung

### **Immunhistochemische Untersuchungen zur Expression von Wachstumsfaktoren im Rahmen der Vaskularisation knöcherner Kieferkammaugmentate im Schafmodell**

In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression unterschiedlicher Marker für die Vaskularisation in verschiedenen Modifikationen zur Unterkieferaugmentation mit autologem kortikospongiösen Beckenkammtransplantaten in-vivo am Schafmodell untersucht.

Wie schon aus Voruntersuchungen bekannt, zeigte vor allem die Modifikation des Transplantatlagers in der Kombination einer resorbierbaren Bio-Gide® Membran mit dem Knochenersatzmaterial Bio-Oss® und einem kortikospongiösen Transplantat die geringsten Resorptionsraten. Dieser Konditionierung wurden verschiedene andere Modifikationen des Transplantatlagers gegenübergestellt und jeweils die Expression der Vaskularisationsmarker untersucht und verglichen.

Sowohl die Untersuchungen zur Expression von Bone Morphogenetic Protein-2 (BMP-2), Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) und seinen Rezeptor-Isoformen VEGF-Rezeptor 1 und VEGF-Rezeptor 2, sowie den NOS-Isoformen eNOS und iNOS zeigen alle eine signifikant vermehrte Expression in der Konditionierung mit Bio-Oss® als KEM und einer resorbierbaren Bio-Gide® Membran. Lediglich die Expression des von-Willebrand-Faktors (vWF) als Marker des Endothels zeigte keine signifikant vermehrte Expression in der mit Bio-Oss® und Bio-Gide® modifizierten Gruppe. Hier wäre die Tatsache, dass der vWF auch als Marker der endothelialen Dysfunktion beschrieben wird und in den klinisch stärker atrophierten Modifikation vermehrt exprimiert wird, eine Erklärungsmöglichkeit.

Die Untersuchungen zur Expression der Vaskularisationsmarker hinsichtlich der Regionen im Augmentat zeigen sowohl bei BMP-2 wie auch bei VEGF und seinen Rezeptorisoformen VEGF-R1 und VEGF-R2 eine signifikant vermehrte Expression im Bereich des Transplantates in der Bio-Oss® Modifikation. Diese Ergebnisse stützen den klinischen Aspekt der guten Vaskularisierung des Transplantates und unterstreichen die Bedeutung der Wachstumsfaktoren für die Vaskularisierung im Transplantat. Bei den



Färbungen auf NOS findet sich eine signifikant vermehrte Expression im Transplantatlager. Diese Ergebnisse stellen die Bedeutung von NOS für die Regulation der Osteogenese und die direkten Wirkungen auf Osteoblasten und Osteoklasten.

Die Tatsache, dass gerade in der Bio-Oss<sup>®</sup> Modifikation, in der klinisch die geringste Resorption zu beobachten war, signifikant mehr Vaskularisationsmarker exprimiert wurden, ist Nachweis der besseren Vaskularisation dieser Konditionierung und unterstreicht sowohl den Nutzen von KEM wie Bio-Oss<sup>®</sup> bei Transplantationen autologen Knochens, wie auch die Möglichkeiten der therapeutischen Verwendung einzelner Wachstumsfaktoren wie z. B. BMP-2.

---

**6 Literaturverzeichnis**

1. Adeyemo, W. L., T. Reuther, W. Bloch, Y. Korkmaz, J. H. Fischer, J. E. Zöller and A. C. Kübler (2008). "Healing of onlay mandibular bone grafts covered with collagen membrane or bovine bone substitutes: A microscopical and immunohistochemical study in the sheep." Int J Oral Maxillofac Surg **37**(7): 651-659.
2. Adeyemo, W. L., T. Reuther, W. Bloch, Y. Korkmaz, J. H. Fischer, J. E. Zöller and A. C. Kübler (2008). "Influence of host periosteum and recipient bed perforation on the healing of onlay mandibular bone grafts: an experimental pilot study in the sheep." Oral Maxillofac Surg **12**: 19-28.
3. Araujo, M. G., M. Sonohara, R. Hayacibara, G. Cardaropoli and J. Lindhe (2002). "Lateral ridge augmentation by the use of grafts comprised of autologous bone or biomaterials. An experiment in the dog." J Clin Periodontol **29**: 1122-1131.
4. Armour, K. E., T. H. R. J. Van, P. S. Grabowski, D. M. Reid and S. H. Ralston (1999). "Evidence for a pathogenic role of nitric oxide in inflammation-induced osteoporosis." J Bone Miner Res **14**: 2137-2142.
5. Arnold, W. P., R. Aldred and F. Murad (1977). "Cigarette smoke activates guanylate cyclase and increases guanosine 3,5-monophosphate in tissue." Science **198**: 934-936.
6. Arzt, T., J. Maschotowski, F. Wimmer and K. Schmidh (1996). "Sinuselevation durch Osteogenese mittels eines osteoinduktiven Proteinkomplexes." Z Zahnärztl Implantol **12**(3).
7. Axhausen, G. (1908). "Histologische Untersuchungen über Knochentransplantationen am Menschen " Dtsch Z Chir **388**.
8. Barleon, B., S. Sozzani, D. Zhou, H. A. Weich, A. Mantovani and D. Marme (1996). "Migration of human monocytes in response to vascular endothelial growth factor (VEGF) is mediated via the VEGF receptor flt-1." Blood **87**: 3336-3343.
9. Bauer, T. W. and M. D. Muschler (2000). "Bone Graft Materials." Clin Orthop Rel Res **371**: 10-27.
10. Baylink, D. J., R. D. Finkelmann and S. Mohan (1993). "Growth factors to stimulate bone formation." J Bone Miner Res **8**(Suppl 2): 565-572.
11. Blann, A. (1993). "Von willebrand factor and the endothelium in vascular disease." Br J Biomed Sci **50**: 125-134.

12. Boden, S. D., G. J. Martin, M. A. Morone, J. L. Ugbo and P. A. Moskovitz (1999). "Posterolateral lumbar intertransverse process spine athrodesis with recombinant human bone morphogenetic protein 2/hydroxyapatite-tricalcium phosphate after laminectomy in the nonhuman primate." Spine **24**: 1179-1185.
13. Boden, S. D., T. A. Zdeblick, H. S. Sandhu and S. E. Heim (2000). "The use of rhBMP-2 in interbody fusion cages. Definitive evidence of osteoinduction in humans: a preliminary report." Spine **25**: 376-381.
14. Bostrom, M. P. G., J. M. Lane, W. S. Berberian, A. A. E. Missri, E. Tomin, A. Weiland, S. B. Doty, D. Glaser and V. M. Rosen (1995). "Immunolocalization and Expression of Bone Morphogenetic Proteins 2 and 4 in Fracture Healing." J Orthop Res **13**(3): 357-367.
15. Boyne, P. J. (1969). "Restoration of osseous defects in maxillofacial casualties." J Am Dent Assoc **78**(4): 767-776.
16. Boyne, P. J. (2001). "Application of bone morphogenetic proteins in the treatment of clinical oral and maxillofacial osseous defects." J Bone Joint Surg **83-A**(Supplement 1, Part 2): 146-150.
17. Boyne, P. J., R. E. Marx, M. Nevins, G. Triplett, E. Lazaro, L. C. Lilly, M. Alder and P. Nummikowski (1997). "A feasible study evaluating rhBMP-2/absorbable collagen sponge for maxillary sinus floor augmentation." Int J Periodontics Restorative Dent **17**: 11-25.
18. Boyne, P. J. and T. E. Mikels (1968). "Restoration of alveolar ridges by intramandibular transposition osseous grafting." J Oral Surg **26**(9): 569-576.
19. Bredt, D. S. and S. H. Snyder (1994). "Nitric oxide: a physiologic messenger molecule." Annu Rev Biochem **63**: 175-195.
20. Buckwalter, J. A., M. J. Glimcher, R. R. Cooper and R. Recker (1995). "Bone Biology." J Bone Joint Surg Am **77**(1276-1289).
21. Burchardt, H. (1983). "The biology of bone graft repair." Clin Orthop Rel Res **174**: 28-42.
22. Burchardt, H. (1987). "Biology of bone transplantation." Orthop Clin North Am **18**(2): 187-196.
23. Buser, D., K. Dula, H. P. Hirt and R. K. Schenk (1996). "Lateral ridge augmentation using autografts and barrier membranes. A clinical study in 40 partially edentulous patients." J Oral Maxillofac Surg **54**: 420-432.

24. Caballero-Alias, A. M., N. Loveridge, A. Lyon, V. Das-Gupta, A. Pitsillides and J. Reeve (2004). "NOS isoforms in adult human osteocytes: multiple pathways of NO regulation?" Calcif Tissue Int **75**(1): 78-84.
25. Carmeliet, P., V. Ferreira, G. Breier, S. Pollefeyt, L. Kieckens, M. Gertsenstein, M. Fahrig, A. Vandenhoeck, K. Harpla, C. Eberhardt, C. Declercq, J. Pawling, L. Moons, D. Collen, W. Risau and A. Nagy (1996). "Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele." Nature **380**: 435-439.
26. Cattell, V. and K. Mosley (1998). "Immunohistochemical Localization of NOS Isoforms." Methods in Molecular Biology **100**: 181-190.
27. Cella, G., F. Bellotto, F. Tona, A. Sbarai, G. Mazzaro, G. Motta and J. Fareed (2001). "Plasma markers of endothelial dysfunction in pulmonary hypertension." Chest **120**: 1226-1230.
28. Charnock-Jones, D. S., A. M. Sharkey, C. A. Boocock, A. Ahmed, R. Pelvin, N. Ferrara and S. K. Smith (1994). "Vascular endothelial growth factor receptor localization and activation in human trophoblast and choriocarcinoma cells." Biol Reprod **51**: 524-530.
29. Clementschitsch, F. (1950). "Über die Wiederherstellung der Prothesenfähigkeit des Oberkiefers." Österr Z Stomatol: 11-21.
30. Corbett, S. A., M. Hukkanen, J. Batten, D. McCarthy, J. M. Polak and S. P. F. Hughes (1999). "Nitric oxide in fracture repair." J Bone Joint Surg Br. **81-B**(3): 531-537.
31. Dahlin, C., P. Alberius and A. Linde (1991). "Osteopromotion for cranioplasty. An experimental study in rats using a membrane technique " J Neurosurg **74**(3): 487-491.
32. Dahlin, C., J. Gottlow, A. Linde and S. Nyman (1990). "Healing of maxillary and mandibular bone defects using a membrane technique. An experimental study in monkeys." Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg **24**(1): 13-19.
33. Davies, J. E. (1998). "Mechanisms of endosseous integration." Int J Prosthodont **11**(5): 391-401.
34. Davis, W. H., R. I. Delo, W. B. Ward, B. Terry and B. Patakas (1975). "Long term ridge augmentation with rib graft." J Maxillofac Surg **3**: 103-106.
35. Davis, W. H., R. I. Delo, J. R. Weiner and B. Terry (1970). "Transoral bone graft for atrophy of the manible." J Oral Surg **28**: 760-765.

36. De Marco, A. C., M. A. Jardini and L. A. Lima (2005). "Revascularization of autogenous block grafts with or without an e-PTFE membrane." Int J Oral Maxillofac Implants **20**: 867-874.
37. De Vries, C., J. A. Escobedo, H. Ueno, K. Houck, N. Ferrara and L. T. Williams (1992). "The fms-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor." Science **255**: 989-991.
38. Deckers, M. M., M. Karperien, C. van der Bent, T. Yamashita, S. E. Papapoulos and C. W. Lowik (2000). "Expression of vascular endothelial growth factors and their receptors during osteoblast differentiation." Endocrinology **141**: 1667-1674.
39. Denis, C. V. (2002). "Molecular and cellular biology of von willebrand factor." Int J Hematol **75**: 3-8.
40. Diwan, A. D., M. X. Wang, D. Jang, W. Zhu and G. A. C. Murrel (2000). "Nitricoxide modulates fracture healing." J Bone Miner Res **15**: 342-351.
41. Donos, N., L. Kostopoulos and T. Karring (2002). "Alveolar ridge augmentation by combining autogenous mandible bone grafts and non-resorbable membrane-like barriers. An experimental study in the rat." Clin Oral Implants Res **13**: 185-191.
42. Donos, N., L. Kostopoulos and T. Karring (2002). "Alveolar ridge augmentation using a resorbable co-polymer membrane and autogenous bone grafts. An experimental study in the rat." Clin Oral Implants Res **13**: 203-213.
43. Donos, N., L. Kostopoulos and T. Karring (2002). "Augmentation of the rat jaw with autogenic cortico-cancellous bone grafts and guided tissue regeneration." Clin Oral Implants Res **13**: 192-202.
44. Egermann, M., C. A. Lill, K. Griesbeck, C. H. Evans, P. D. Robbins, E. Schneider and A. W. Baltzer (2006). "Effect of BMP-2 gene transfer on bone healing in sheep." Gene Ther **13**(17): 1290-1299.
45. Einhorn, T. (1998). "The Cell and Molecular Biology of Fracture Healing." Clin Orthop Rel Res **355**: 7-21.
46. Enneking, W. F., H. Burchardt, J. J. Puhl and G. Piotrowski (1975). "Physical and biological aspects of repair in dog cortical-bone transplants." J Bone Joint Surg Am **57**: 237-252.
47. Eyre, D. R. (1996). Biochemical basis of collagen metabolites as bone turnover makers. Principles of bone biology. J. P. Bilezikian, L. G. Raisz and G. A. Rodan. San Diego, Academic Press: 143-153.

48. Fazili, M., G. R. v. Overvest-Eerdmans, A. M. Vernooy, W. J. Visser and M. A. J. v. Waas (1978). "Follow-up investigation of reconstruction of the alveolar process in the atrophic mandible." Int J Oral Surg **7**: 400-404.
49. Ferrara, N., K. Carvermoore, H. Chen, M. Dowd, L. Lu, K. S. O'Shea, L. Powell-Braxton, K. J. Hillan and M. W. Moore (1996). "Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene." Nature **380**: 439-442.
50. Ferrara, N. and T. Davis-Smyth (1997). "The biology of vascular endothelial growth factor." Endocr Rev **18**(1): 4-25.
51. Ferrara, N., H. P. Gerber and J. LeCouter (2003). "The biology of VEGF and its receptors." Nature Medicine **9**(6): 669-676.
52. Ferrara, N. and W. J. Henzel (1989). "Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells." Biochem Biophys Res Commun **161**: 851-858.
53. Fischgrund, J. S., S. B. James, M. C. Chabot, R. Hankin, H. N. Herkowitz, J. M. Wozney and A. Shirkhoda (1997). "Augmentation of autograft using rhBMP-2 and different carrier media in the canine spinal fusion model." J Spinal Disord **10**: 467-472.
54. Fonseca, R. J., P. J. Clark, E. J. Burkes and R. D. Baker (1980). "Revascularization and healing of onlay particulate autogenous grafts in primates." J Oral Surg **38**: 572-577.
55. Fournier, E., D. Virnbaum and J. P. Borg (1997). "Receptors for factors of the VEGF family." Bull Cancer **84**: 397-403.
56. Furchgott, R. F., P. D. Cherry, J. V. Zawadzki and D. Jothianandan (1984). "Endothelial cells as mediators of vasodilation of arteries." J Cardiovasc Pharmacol: S 336-343.
57. Gerlach, U. V. (2002). Induktion von Osteoporose beim Schaf - Tierexperimentelles Modell zur Untersuchung der Frakturbehandlung beim osteoporotischen Knochen. Giessen, Dissertation, Klinik und Poliklinik für Unfallchirurgie.
58. Gitay-Goren, H., R. Halaban and G. Neufeld (1993). "Human melanoma cells but not normal melanocytes express vascular endothelial growth factor receptors." Biochem Biophys Res Commun **190**: 702-709.

59. Govender, S., C. Csimma, H. K. Genant and A. Valentin-Opran (2002). "Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-2 for Treatment of Open Tibial Fractures." J Bone Joint Surg **84-A**(12): 2123-2134.
60. Guzik, T. J., R. Korbut and T. Adamek-Guzik (2003). "Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation." J Physiol Pharmacol **54**(4): 469-487.
61. Hall, B. K. and T. Miyake (2000). "All for one and one for all: condensations and the initiation of skeletal development." BioEssays **22**.
62. Hardwick, R., B. K. Hayes and C. Flynn (1995). "Devices for dentoalveolar regeneration: an up-to-date literature review." J Periodontol **66**(6): 495-505.
63. Hjorting-Hansen, E. (2002). "Bone grafting to the jaws with special reference to reconstructive preprosthetic surgery." Mund Kiefer Gesichtschir **6**(1): 6-14.
64. Huang, Y. H., G. Polimeni, M. Qahash and U. M. E. Wikesjö (2008). "Bone morphogenetic proteins and osseointegration: current knowledge - future possibilities." Periodontol 2000 **47**: 206-223.
65. Ibelgaufts, H. (2010). "COPE - Cytokines Online Pathfinder Encyclopedia." Version 24.7.04. from <http://www.copewithcytokines.de>.
66. Ignarro, L. J., R. E. Byrns, G. M. Buga, K. S. Woods and G. Chaudhuri (1988). "Pharmacological evidence that endothelium-derived relaxing factor is nitric oxide: use of pyrogallol and superoxide dismutase to study endothelium-dependent and nitric oxide-elicited vascular smooth muscle relaxation." J Pharmacol Exp Ther **244**: 181-189.
67. Iizuka, T., W. Smolka, W. Hallermann and R. Mericske-Stern (2004). "Extensive augmentation of the alveolar ridge using autogenous calvarial split bone grafts for dental rehabilitation." Clin Oral Implants Res **15**: 607-615.
68. Jakse, N., F. J. Seibert, M. Lorenzoni, A. Eskici and C. Pertl (2001). "A modified technique of harvesting tibial cancellous bone and its use for sinus grafting." Clin Oral Implants Res **12**(5): 488-494.
69. Jardini, M. A., A. C. De Marco and L. A. Lima (2005). "Early healing pattern of autogenous bone grafts with and without e-PTFE membranes: a histomorphometric study in rats." Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod **100**: 666-673.
70. Jensen, S. S., M. Aaboe, E. M. Pinholt, E. Hjorting-Hansen, F. Melsen and E. Ruyter (1996). "Tissue reaction and material characteristics of four bone substitutes." Int J Oral Maxillofac Implants **11**(1): 55-66.

71. Johner, R. (1972). "Dependence of bone healing on defect size." Helv Chir Acta **39**(1): 409-411.
72. Jussila, L., R. Valtola, T. A. Partanen, P. Salven, P. Heikkilae, M. T. Matikainen, R. Renkonen, A. Kaipainen, M. Detmar, E. Tschachler, R. Alitalo and K. Alitali (1998). "Lymphatic endothelium and Kaposi's Sarkoma spindle cells detected by antibodies against the vascular endothelial growth factor receptor-3." Cancer Res **58**: 1599-1604.
73. Karring, T., S. Nyman, J. Gottlow and L. Laurell (1993). "Development of the biological concept of guided tissue regeneration-animal and human studies." Periodontol 2000 **1**(1): 26-35.
74. Katoh, O., H. Tauchi, K. Kawaishi, A. Kimura and Y. Satow (1995). "Expression of the vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor gene, KDR, in hematopoietic cells and inhibitory effect of VEGF in apoptotic cell death caused by ionizing radiation." Cancer Res **55**: 5687-5692.
75. Katthagen, B. D. (1986). "Knochenregeneration und Knochenersatzmaterialien." Hefte Unfallheilkd **178**.
76. Keene, D. R., L. Y. Sakal and R. E. Burgeson (1991). "Human bone contains type III collagen, type VI collagen and fibrillin: type III collagen is present on specific fibers that may mediate attachment of tendons ligaments and periosteum to calcified bone cortex." J Histochem Cytochem **39**: 59-69.
77. Keyt, B. A., H. V. Nguyen, E. E. Berleau, C. M. Duarte, J. Park, H. Chen and N. Ferrara (1996). "Identification of vascular endothelial growth factor determinants for binding KDR and FLT-1 receptors - generation of receptor selective VEGF variants by site directed mutagenesis." J Biol Chem **271**: 5638-5646.
78. Khan, S. N., F. P. Cammisa, H. S. Sandhu, A. D. Diwan, F. P. Girardi and J. M. Lane (2005). "The Biology of Bone Grafting." J AM Acad Orthop Surg **13**(1): 77-86.
79. Korkmaz, Y., M. A. Baumann, H. Schröder, S. Behrends, K. Addicks, W. H. M. Raab and W. Bloch (2004). "Localization of the NO-cGMP Signaling Pathway Molecules, NOS III-Phosphorylation Sites, ERK1/2, and Akt/PKB in Osteoclasts." J Periodontol **75**(8): 1119-1125.
80. Kübler, N., J. Reuther, T. Kirchner, B. Priessnitz and W. Sebald (1993). "Osteoinductive, Morphologic, and Biomechanical Properties of Autolyzed, Antigen-Extracted, Allogenic Human Bone." J Oral Maxillofac Surg **51**: 1346-1357.



81. Leung, D. W., G. Cachianes, W. J. Kuang, D. V. Goeddel and N. Ferrara (1989). "Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen." Science **246**: 1306-1309.
82. Lexer, E. (1924). Verwendungsbereich der freien Knochentransplantation. Die Freien Transplantationen. E. Lexer. Stuttgart, Enke: 120.
83. Lip, G. Y. H. and A. Blann (1997). "Von willebrand factor: a marker of endothelial dysfunction in vascular disorders?" Cardiovasc Res **34**: 255-265.
84. Logothetis, C. J. and S. H. Lin (2005). "Osteoblasts in Prostate Cancer Metastasis to Bone." Nat Rev Cancer **5**(1): 21-28.
85. Maiorana, C., M. Beretta, S. Salina and F. Santoro (2005). "Reduction of Autogenous Bone Graft Resorption by Means of Bio-Oss Coverage: A Prospective Study." Int J Periodontics Restorative Dent **25**(1): 19-25.
86. Mannucci, P. M. (1998). "Von Willebrand factor: A marker of endothelial damage?" Arterioscler Thromb Vasc Biol **18**: 1359-1362.
87. Marks, S. C. and D. C. Hermey (1996). The structure and development of bone. Principles of bone biology. J. P. Bilezikian, L. G. Raisz and G. A. Rodan. San Diego, Academic Press: 3-14.
88. Marletta, M. A., P. S. Yoon, R. Iyengar, C. D. Leaf and J. S. Wishnok (1988). "Macrophage oxidation of L-arginine to nitric and nitrate: nitric oxide is an intermediate." Biochemistry **27**: 8706-8711.
89. Marx, R. E., E. R. Carlson, R. M. Eichstaedt, S. R. Schimmele, J. E. Strauss and K. R. Georgeff (1998). "Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts." Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod **85**(6): 638-646.
90. Mayr-Wohlfahrt, U., J. Waltenberger, H. Hausser, S. Kessler, K. P. Günther, C. Dehio, W. Puhl and R. E. Brenner (2002). "Vascular endothelial growth factor stimulates chemotactic migration of primary human osteoblasts." Bone **30**(3): 472-477.
91. Meekeren, J. v. (1668). Heel-en genees-konstige aanmerkingen. Amsterdam, Commelijin.
92. Meyer, D., G. Pietu, E. Fressinaud and J. P. Girma (1991). "Von Willebrand factor: Structure and function." Mayo Clin Proc **66**: 516-523.

93. Moncada, S. and A. Higgs (1993). "The L-arginine-nitric oxide pathway." N Engl J Med **329**: 2002-2012.
94. Neugebauer, J. and A. C. Kübler (2003). "Aktueller Stand der Knochenersatzmaterialien." Dent Implantol **7**: 491-500.
95. Neukam, F. W. and D. Buser (1996). Implantate bei unzureichendem Knochenangebot. Implantologie. B. W. Koeck, W. München, Urban & Schwarzenberg: 179-211.
96. Nilsson, O. S. and M. R. Urist (1991). "Immune inhibition of repair of canine skull trephine defects implanted with partially purified bovine morphogenetic protein." Int Orthop **15**(3): 257-263.
97. Nkenke, E., M. Radespiel-Troger, J. Wiltfang, S. Schultze-Mosgau, G. Winkler and F. W. Neukam (2002). "Morbidity of harvesting of retromolar bone grafts: a prospective study." Clin Oral Implants Res **13**(5): 514-521.
98. Nkenke, E., S. Schultze-Mosgau, M. Radespiel-Troger, F. Kloss and F. W. Neukam (2001). "Morbidity of harvesting of chin grafts: a prospective study." Clin Oral Implants Res **12**(5): 495-502.
99. Nkenke, E., V. Weisbach, E. Winckler and e. al. (2004). "Morbidity of harvesting of bone grafts from the iliac crest for preprosthetic augmentation procedures: a prospective study." Int J Oral Maxillofac Surg **33**(2): 157-163.
100. Ogunsalu, C. (2005). "A new surgical management for oro-antral communication: the resorbable guided tissue regeneration membrane-bone substitute sandwich technique." West Indian Med J **54**(4): 261-263.
101. Ohtsubo, S., M. Matsuda and M. Takekawa (2003). "Angiogenesis after sintered bone implantation in rat parietal bone." Histol Histopathol **18**: 153-163.
102. Palmer, R. M., A. G. Ferrige and S. Moncada (1987). "Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor." Nature **327**: 524-526.
103. Parfitt, A. M. (1990). The physiologic and clinical significance of bone histomorphometric data. Bone histomorphometry: Techniques and interpretation. R. R. Recker. Boca Raton, CRC Press: 143-223.
104. Pastoureau, P., P. J. Meunier and P. D. Delmas (1991). "Serum osteocalcin (bone Gla-protein), an index of bone growth in lambs. Comparison with age-related histomorphometric changes." Bone **12**(3): 143-149.

105. Phillips, J. H. and B. A. Rahn (1988). "Fixation effects on membranous and enchondral onlay bone-graft resorption." Plast Reconstr Surg **82**: 872-877.
106. Reddi, A. H. (1994). "Bone and cartilage differentiation." Curr Opin Genet Dev **4**(5).
107. Reddi, A. H., S. Wientroub and N. Muthukumar (1987). "Biological principles of bone induction." Orthop Clin North Am **18**(2): 207-212.
108. Reddy, S. V. (2004). "Regulatory mechanisms operative in osteoclasts." Crit Rev Eukaryot Gene Expr **14**(4): 255-270.
109. Rehrmann, A. (1959). "Creation of an alveolar ridge after bone transplantation to the mandible." Plast Reconstr Surg **24**: 183-189.
110. Reuther, T. (2007). Untersuchungen zur Qualität des autologen Knochentransplantates und des Transplantatlagers in der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie. Würzburg, Habilitationsschrift, Julius-Maximilians-Universität.
111. Risdon, F. (1922). "Treatment of nonunion of fractures of mandible by free autogenous bonegrafts." J Am Dent Assoc **79**: 297-299.
112. Roesgen, M. (1991). Knöcherne Regeneration und Calciumphosphatkeramiken. Traumatologie aktuell. S. Weller and G. Hierholzer. Stuttgart, Thieme.
113. Rosenberg, N., R. Reich and M. Brahms (1955). "Experimental and clinical use of bone milled in the kitchen blender." Surg Gynecol Obstet **101**: 545-557.
114. Schenk, R. and H. Willenegger (1977). "Histology of primary bone healing: modifications and limits of recovery of gaps in relation to extent of the defect (author's transl)." Unfallheilkunde **80**(5): 155-160.
115. Schenk, R. K., D. Buser, R. Hardwick and C. Dahlin (1994). "Healing pattern of bone regeneration in membrane-protected defects: a histologic study in the canine mandible." Int J Oral Maxillofac Implants **9**(1): 13-29.
116. Schlegel, K. A., G. Fichtner, S. Schultze-Mosgau and J. Wiltfang (2003). "Histological findings in sinus augmentation with autogenous bone chips versus a bovine bone substitute." Int J Oral Maxillofac Implants **18**(1): 53-58.
117. Schmid, E. (1954). "Die aufbauende Kieferkammplastik." Österr Z Stomatol **51**: 582-583.
118. Schrör, K. (2001). "Pathophysiologie der Thrombozytenaktivierung und Pharmakologie der GPIIb/IIIa-Inhibitoren." Herz **26 S**: 30-34.

119. Senger, D. R., S. J. Galli, A. M. Dvorak, C. A. Perruzzi, V. S. Harvey and F. Dvorak (1983). "Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid." Science **219**: 983-985.
120. Shapiro, F. (1988). "Cortical bone repair. The relationship of the lacunar-canalicular system and intercellular gap junctions to the repair process." J Bone Joint Surg Am **70**(7): 1067-1081.
121. Smith, J. D. and M. Abramson (1974). "Membranous vs endochonral bone autografts." Arch Otolaryngol **99**: 203-205.
122. Soldner, E. and G. Herr (2001). "Knochen, Knochentransplantate und Knochenersatzmaterialien." Trauma Berufskrankh **3**: 256-269.
123. Steinhäuser, E. and H. Obwegeser (1967). Rebuilding the alveolar ridge with bone and cartilage autografts. Transactions. 2nd Congress of the International Association of Oral Surgeons, Oral Surgery. E. Husted and E. Hjorting-Hansen. Copenhagen, Munksgaard: 203-208.
124. Street, J., M. Bao, L. deGuzman, S. Bunting, F. V. Peale, N. Ferrara, H. Steinmetz, J. Hoeffel, J. L. Cleland, A. Daugherty, N. van Bruggen, H. P. Redmond, R. A. D. Carano and E. H. Filvaroff (2002). "Vascular endothelial growth factor stimulates bone repair by promoting angiogenesis and bone turnover." PNAS **99**(15): 9556-9661.
125. Summers, B. N. and S. M. Eisenstein (1989). "Donor site pain from the ilium. A complication of lumbar spine fusion." J Bone Joint Surg Br. **71**(4): 677-680.
126. Sykoff, W. (1900). "Zur Frage der Knochenplastik am Unterkiefer." Generalbl Chir **35**: 881-883.
127. Takahashi, T., T. Shirasawa, K. Miyake, Y. Yahagi, N. Maruyama, N. Kasahara, T. Kawamura, O. Matsumura, T. Mitarai and O. Sakai (1995). "Protein tyrosine kinases expressed in glomeruli and cultured glomerular cells: FLT-1 and VEGF expression in renal mesangial cells." Biochem Biophys Res Commun **209**: 218-226.
128. Terheyden, H., S. Jepsen and D. R. Rueger (1999). "Mandibular reconstruction in miniature pigs with prefabricated vascularized bone grafts using recombinant human osteogenic protein-1: a preliminary study." Int J Oral Maxillofac Surg **28**: 461-463.
129. Terman, B. I., M. Dougher-Vermazen, M. E. Carrion, D. Dimitrov, D. C. Armellino, D. Gospodarowicz and P. Bohlen (1992). "Identification of the KDR

- tyrosin kinase as a receptor for vascular endothelial cell growth factor." Biochem Biophys Res Commun **187**: 1579-1586.
130. Tsuji, K., A. Bandyopadhyay, B. D. Harfe, K. Cox, S. Kakar, L. Gerstenfeld, T. Einhorn, C. J. Tabin and V. Rosne (2006). "BMP2 activity, although dispensable for bone formation, is required for the initiation of fracture healing." Nature Genetics **38**(12): 1424-1429.
131. Turner, A. S. and A. R. Villanueva (1993). "Histomorphometry of the iliac crest: 9-11 year old ewes." Proc Vet Surg **22**: 413.
132. Uchida, S., A. Sakai, H. Kudo, H. Otomo, M. Watanuki, M. Tanaka, M. Nagashima and T. Nakamura (2003). "Vascular endothelial growth factor is expressed along with its receptors during the healing process of bone and bone marrow after drill-hole injury in rats." Bone **32**: 491-501.
133. Ulfig, N. (2005). Kurzlehrbuch Histologie. Stuttgart, Thieme.
134. Urist, M. R. (1965). "Bone formation by autoinduction." Science **150**: 893-899.
135. Vaisman, N., D. Gospodarowicz and G. Neufeld (1990). "Characterization of the receptors for vascular endothelial growth factor." J Biol Chem **265**: 19461-19466.
136. Verhoeven, J. W., J. Ruijter, M. S. Cune, M. Terlouw and M. Zoon (2000). "Onlay grafts in combination with endosseous implants in severe mandibular atrophy: one year results of a prospective, quantitative radiological study." Clin Oral Implants Res **11**: 583-594.
137. Vorschütz (1911). "Klinischer Beitrag zur Frage der freien Knochentransplantation bei Defekten des Unterkiefers." Dtsch Z Chir: 591-606.
138. Walter, P. v. (1821). "Wiedereinheilung der bei Trepanation ausgebohrten Knochenscheibe." J Chir Augenheilkd **2**: 571-583.
139. Wanschitz, F., A. Nell, S. Patruta, A. Wagner and R. Ewers (2005). "Influence of three currently used bone replacing materials on the in vitro proliferation of human peripheral blood mononuclear cells." Clin Oral Implants Res **16**(5): 570-574.
140. Wikesjö, U. M. E., R. G. Sorensen and J. M. Wozney (2001). "Augmentation of alveolar bone and dental implant osseointegration: Clinical implications of studies with rhBMP-2." J Bone Joint Surg **83-A**(Supplement 1, Part 2): 136-145.

141. Wippermann, B. W., H. E. Schrott, S. Steeg and H. Tscherne (1997). "Komplikationen der Spongiosaentnahme am Beckenkamm." Chirurg **68**: 1286-1291.
142. Wozney, J. M. (1999). Biology and clinical applications of rhBMP-2. Tissue engineering: applications in maxillofacial surgery and periodontics. S. E. Lynch, R. J. Genco and R. E. Marx. Chicago, Quintessence: 103-124.
143. Yang, R., G. R. Thomas, S. Bunting, A. Ko, N. Ferrara, B. Keyt, J. Ross and A. Jin (1996). "Effects of vascular endothelial growth factor on hemodynamics and cardiac performance." J Cardiovasc Pharmacol **27**(6): 838-844.
144. Yang, X. J. and C. L. Cepko (1996). "Flk-1, a receptor for vascular endothelial growth factor (VEGF), is expressed by renal progenitor cells." J Neurosci **16**: 6089-6099.
145. Yetimoglu, C. (2007). Expression von Bone Morphogenetic Protein-2 (BMP-2) während der Knochenentwicklung, der physiologischen Knochenheilung und der durch systemisch appliziertes Wachstumshormon (GH) stimulierten Knochenheilung. Berlin, Dissertation Charité Universitätsmedizin.
146. Younger, E. M. and C. M. W (1989). "Morbidity at bone graft donor sites." J Orthop Trauma **3**(3): 192-195.
147. Zins, J. E. and L. A. Whitaker (1983). "Membranous versus endochondral bone: Implications for craniofacial reconstruction." Plast Reconstr Surg **72**: 778-785.
148. Zöller, J. E., J. Neugebauer and F. C. Lazar (2007). Kieferkamm distraction und/oder Beckenkammaugmentation. Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie. H. H. H. München, Elsevier: 200-220.

## 7 Anhang

### 7.1 statistische Auswertungen zur Signifikanz

#### 7.1.1 Bone Morphogenetic Protein-2 (BMP-2)

**Tabelle 51: Gruppenstatistiken, Gruppenvariable = Konditionierung**

Gruppenstatistiken - BMP-2					
		N	Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler des Mittelwertes
IRS	klinische Atrophie	48	4,1125	2,49	0,36
	keine klinische Atrophie	12	5,1775	1,9	0,55
Positivität	klinische Atrophie	48	2,0260	0,81	0,12
	keine klinische Atrophie	12	2,2292	0,58	0,17
FI	klinische Atrophie	48	1,7760	0,72	0,1
	keine klinische Atrophie	12	2,1458	0,39	0,11

**Tabelle 52: Test bei unabhängigen Stichproben, Gruppenvariable = Konditionierung**

Test bei unabhängigen Stichproben - BMP-2 - Konditionierung						
		Levene-Test der Varianzgleichheit		T-Test für die Mittelwertgleichheit		
		F	Signifikanz	T	df	Sig. (2-seitig)
IRS	Varianzen sind gleich	,831	,366	-1,380	58	,173
	Varianzen sind nicht gleich			-1,625	21,585	,119
Positivität	Varianzen sind gleich	,856	,359	-,815	58	,418
	Varianzen sind nicht gleich			-,996	23,150	,330
FI	Varianzen sind gleich	3,190	,079	-1,708	58	,093
	Varianzen sind nicht gleich			-2,409	32,174	,022

Test bei unabhängigen Stichproben - BMP-2 - Konditionierung					
		T-Test für die Mittelwertgleichheit			
				95% Konfidenzintervall der Differenz	
		Mittlere Differenz	Standardfehler der Differenz	Untere	Obere
IRS	Varianzen sind gleich	-1,06500	,77170	-2,60973	,47973
	Varianzen sind nicht gleich	-1,06500	,65552	-2,42598	,29598
Positivität	Varianzen sind gleich	-,20313	,24923	-,70202	,29577
	Varianzen sind nicht gleich	-,20313	,20395	-,62487	,21862
FI	Varianzen sind gleich	-,36979	,21645	-,80307	,06349
	Varianzen sind nicht gleich	-,36979	,15350	-,68240	-,05719

**Tabelle 53: Gruppenstatistiken, Gruppenvariable = Zeitpunkt**

**Gruppenstatistiken - BMP-2**

		N	Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler des Mittelwertes
IRS	Zeitpunkt 1	36	4,8236	2,27	0,38
	Zeitpunkt 2	36	3,6742	2,7	0,45
Positivität	Zeitpunkt 1	36	2,2778	0,59	0,1
	Zeitpunkt 2	36	1,7569	0,89	0,15
FI	Zeitpunkt 1	36	1,9722	0,57	0,09
	Zeitpunkt 2	36	1,6875	0,84	0,14

**Tabelle 54: Test bei unabhängigen Stichproben, Gruppenvariable = Zeitpunkt**

**Test bei unabhängigen Stichproben - BMP-2 - Zeitpunkt**

		Levene-Test der Varianzgleichheit		T-Test für die Mittelwertgleichheit		
		F	Signifikanz	T	df	Sig. (2-seitig)
IRS	Varianzen sind gleich	,787	,378	1,956	70	,054
	Varianzen sind nicht gleich			1,956	67,987	,055
Positivität	Varianzen sind gleich	4,918	,030	2,913	70	,005
	Varianzen sind nicht gleich			2,913	60,883	,005
FI	Varianzen sind gleich	4,841	,031	1,687	70	,096
	Varianzen sind nicht gleich			1,687	61,661	,097

**Test bei unabhängigen Stichproben - BMP-2 - Zeitpunkt**

		T-Test für die Mittelwertgleichheit			
				95% Konfidenzintervall der Differenz	
		Mittlere Differenz	Standardfehler der Differenz	Untere	Obere
IRS	Varianzen sind gleich	1,14944	,58754	-,02238	2,32126
	Varianzen sind nicht gleich	1,14944	,58754	-,02299	2,32187
Positivität	Varianzen sind gleich	,52083	,17880	,16422	,87745
	Varianzen sind nicht gleich	,52083	,17880	,16328	,87839
FI	Varianzen sind gleich	,28472	,16878	-,05190	,62135
	Varianzen sind nicht gleich	,28472	,16878	-,05271	,62215



**Tabelle 55: Gruppenstatistiken, Gruppenvariable = ROIs**

Gruppenstatistiken - BMP-2					
		N	Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler des Mittelwertes
IRS	Transplantatlager	24	5,3021	2,41	0,49
	Transplantat	24	3,7675	2,25	0,46
Positivität	Transplantatlager	24	2,3750	0,63	0,13
	Transplantat	24	1,8646	0,74	0,15
FI	Transplantatlager	24	2,1250	0,54	0,11
	Transplantat	24	1,6979	0,7	0,14

**Tabelle 56: Test bei unabhängigen Stichproben, Gruppenvariable = ROIs**

Test bei unabhängigen Stichproben - BMP-2 - ROIs						
		Levene-Test der Varianzgleichheit		T-Test für die Mittelwertgleichheit		
		F	Signifikanz	T	df	Sig. (2-seitig)
IRS	Varianzen sind gleich	,863	,358	2,281	46	,027
	Varianzen sind nicht gleich			2,281	45,792	,027
Positivität	Varianzen sind gleich	,011	,919	2,579	46	,013
	Varianzen sind nicht gleich			2,579	44,908	,013
FI	Varianzen sind gleich	,922	,342	2,374	46	,022
	Varianzen sind nicht gleich			2,374	43,116	,022

Test bei unabhängigen Stichproben - BMP-2 - ROIs					
		T-Test für die Mittelwertgleichheit			
				95% Konfidenzintervall der Differenz	
				Untere	Obere
Mittlere Differenz	Standardfehler der Differenz				
IRS	Varianzen sind gleich	1,53458	,67285	,18021	2,88896
	Varianzen sind nicht gleich	1,53458	,67285	,18004	2,88912
Positivität	Varianzen sind gleich	,51042	,19792	,11203	,90880
	Varianzen sind nicht gleich	,51042	,19792	,11177	,90906
FI	Varianzen sind gleich	,42708	,17994	,06489	,78928
	Varianzen sind nicht gleich	,42708	,17994	,06423	,78993

**Tabelle 57: Gruppenstatistiken, ROI = Transplantat, Gruppenvariable = Konditionierung**

**Gruppenstatistiken - BMP-2 - Transplantat zu beiden ZP**

		N	Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler des Mittelwertes
IRS	klinische Atrophie	16	3,6500	2,08	0,52
	keine klinische Atrophie	4	5,9075	1,64	0,82
Positivität	klinische Atrophie	16	1,8906	0,7	0,17
	keine klinische Atrophie	4	2,3125	0,63	0,31
FI	klinische Atrophie	16	1,7031	0,65	0,16
	keine klinische Atrophie	4	2,1875	0,52	0,26

**Tabelle 58: Test bei unabhängigen Stichproben, ROI = Transplantat, Gruppenvariable = Konditionierung**

**Test bei unabhängigen Stichproben – BMP-2 – Transplantat zu beiden ZP**

		Levene-Test der Varianzgleichheit		T-Test für die Mittelwertgleichheit		
		F	Signifikanz	T	df	Sig. (2-seitig)
IRS	Varianzen sind gleich	,324	,576	-2,003	18	,061
	Varianzen sind nicht gleich			-2,321	5,712	,062
Positivität	Varianzen sind gleich	,057	,813	-1,104	18	,284
	Varianzen sind nicht gleich			-1,180	5,045	,291
FI	Varianzen sind gleich	,258	,617	-1,370	18	,188
	Varianzen sind nicht gleich			-1,588	5,710	,166

**Test bei unabhängigen Stichproben – BMP-2 – Transplantat zu beiden ZP**

		T-Test für die Mittelwertgleichheit			
				95% Konfidenzintervall der Differenz	
				Untere	Obere
		Mittlere Differenz	Standardfehler der Differenz		
IRS	Varianzen sind gleich	-2,25750	1,12727	-4,62581	,11081
	Varianzen sind nicht gleich	-2,25750	,97265	-4,66690	,15190
Positivität	Varianzen sind gleich	-,42188	,38229	-1,22504	,38129
	Varianzen sind nicht gleich	-,42188	,35756	-1,33853	,49478
FI	Varianzen sind gleich	-,48438	,35353	-1,22712	,25837
	Varianzen sind nicht gleich	-,48438	,30509	-1,24020	,27145

**Tabelle 59: Gruppenstatistiken, ROI = Transplantat, 2. Zeitpunkt Gruppenvariable = Konditionierung**

**Gruppenstatistiken - BMP-2 - Transplantat - 2. Zeitpunkt**

		N	Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler des Mittelwertes
IRS	klinische Atrophie	8	3,7512	2,82	1
	keine klinische Atrophie	2	6,6900	2,21	1,56
Positivität	klinische Atrophie	8	1,7813	0,95	0,34
	keine klinische Atrophie	2	2,6250	0,53	0,38
FI	klinische Atrophie	8	1,6875	0,89	0,32
	keine klinische Atrophie	2	2,5000	0,35	0,25

**Tabelle 60: Test bei unabhängigen Stichproben, ROI = Transplantat, 2. Zeitpunkt, Gruppenvariable = Konditionierung**

**Test bei unabhängigen Stichproben - BMP-2 - Transplantat - 2. Zeitpunkt**

		Levene-Test der Varianzgleichheit		T-Test für die Mittelwertgleichheit		
		F	Signifikanz	T	df	Sig. (2-seitig)
IRS	Varianzen sind gleich	,244	,635	-1,349	8	,214
	Varianzen sind nicht gleich			-1,587	1,941	,257
Positivität	Varianzen sind gleich	,696	,428	-1,176	8	,273
	Varianzen sind nicht gleich			-1,677	2,970	,193
FI	Varianzen sind gleich	,845	,385	-1,216	8	,259
	Varianzen sind nicht gleich			-2,016	4,946	,100

**Test bei unabhängigen Stichproben - BMP-2 - Transplantat - 2. Zeitpunkt**

		T-Test für die Mittelwertgleichheit			
				95% Konfidenzintervall der Differenz	
		Mittlere Differenz	Standardfehler der Differenz	Untere	Obere
IRS	Varianzen sind gleich	-2,93875	2,17799	-7,96120	2,08370
	Varianzen sind nicht gleich	-2,93875	1,85228	-11,14506	5,26756
Positivität	Varianzen sind gleich	-,84375	,71730	-2,49786	,81036
	Varianzen sind nicht gleich	-,84375	,50320	-2,45429	,76679
FI	Varianzen sind gleich	-,81250	,66841	-2,35387	,72887
	Varianzen sind nicht gleich	-,81250	,40297	-1,85179	,22679

7.1.2 Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)

**Tabelle 61: Gruppenstatistiken, Gruppenvariable = Konditionierung**

**Gruppenstatistiken - VEGF**

		N	Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler des Mittelwertes
IRS	klinische Atrophie	48	2,3833	2,09	0,3
	keine klinische Atrophie	12	2,7850	1,73	0,5
Positivität	klinische Atrophie	48	1,4427	0,86	0,12
	keine klinische Atrophie	12	1,5975	0,55	0,16
FI	klinische Atrophie	48	1,2500	0,75	0,11
	keine klinische Atrophie	12	1,5975	0,59	0,17

**Tabelle 62: Test bei unabhängigen Stichproben, Gruppenvariable = Konditionierung**

**Test bei unabhängigen Stichproben - VEGF - Konditionierung**

		Levene-Test der Varianzgleichheit		T-Test für die Mittelwertgleichheit		
		F	Signifikanz	T	df	Sig. (2-seitig)
IRS	Varianzen sind gleich	,710	,403	-,613	58	,542
	Varianzen sind nicht gleich			-,688	19,896	,499
Positivität	Varianzen sind gleich	2,447	,123	-,592	58	,556
	Varianzen sind nicht gleich			-,769	26,340	,449
FI	Varianzen sind gleich	1,817	,183	-1,499	58	,139
	Varianzen sind nicht gleich			-1,728	20,806	,099

**Test bei unabhängigen Stichproben - VEGF - Konditionierung**

		T-Test für die Mittelwertgleichheit			
				95% Konfidenzintervall der Differenz	
		Mittlere Differenz	Standardfehler der Differenz	Untere	Obere
IRS	Varianzen sind gleich	-,40167	,65513	-1,71306	,90972
	Varianzen sind nicht gleich	-,40167	,58393	-1,62014	,81680
Positivität	Varianzen sind gleich	-,15479	,26156	-,67836	,36878
	Varianzen sind nicht gleich	-,15479	,20128	-,56826	,25868
FI	Varianzen sind gleich	-,34750	,23188	-,81165	,11665
	Varianzen sind nicht gleich	-,34750	,20116	-,76606	,07106

**Tabelle 63: Gruppenstatistiken, Gruppenvariable = Zeitpunkt**

		Gruppenstatistiken - VEGF			
		N	Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler des Mittelwertes
IRS	Zeitpunkt 1	36	3,0778	1,91	0,32
	Zeitpunkt 2	36	1,6394	1,87	0,31
Positivität	Zeitpunkt 1	36	1,7894	0,61	0,1
	Zeitpunkt 2	36	1,0278	0,83	0,14
FI	Zeitpunkt 1	36	1,5742	0,54	0,09
	Zeitpunkt 2	36	,9931	0,82	0,14

**Tabelle 64: Test bei unabhängigen Stichproben, Gruppenvariable = Zeitpunkt**

		Test bei unabhängigen Stichproben - VEGF - Zeitpunkt				
		Levene-Test der Varianzgleichheit		T-Test für die Mittelwertgleichheit		
		F	Signifikanz	T	df	Sig. (2-seitig)
IRS	Varianzen sind gleich	,079	,779	3,236	70	,002
	Varianzen sind nicht gleich			3,236	69,969	,002
Positivität	Varianzen sind gleich	3,497	,066	4,418	70	,000
	Varianzen sind nicht gleich			4,418	64,248	,000
FI	Varianzen sind gleich	8,705	,004	3,568	70	,001
	Varianzen sind nicht gleich			3,568	60,597	,001

		Test bei unabhängigen Stichproben - VEGF - Zeitpunkt			
		T-Test für die Mittelwertgleichheit			
				95% Konfidenzintervall der Differenz	
		Mittlere Differenz	Standardfehler der Differenz	Untere	Obere
IRS	Varianzen sind gleich	1,43833	,44448	,55185	2,32482
	Varianzen sind nicht gleich	1,43833	,44448	,55184	2,32483
Positivität	Varianzen sind gleich	,76167	,17239	,41784	1,10549
	Varianzen sind nicht gleich	,76167	,17239	,41730	1,10603
FI	Varianzen sind gleich	,58111	,16285	,25632	,90590
	Varianzen sind nicht gleich	,58111	,16285	,25543	,90679

**Tabelle 65: Gruppenstatistiken, Gruppenvariable = ROIs**

		Gruppenstatistiken - VEGF			
		N	Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler des Mittelwertes
IRS	Transplantatlager	24	3,1354	2,45	0,5
	Transplantat	24	2,2842	1,9	0,39
Positivität	Transplantatlager	24	1,6250	0,92	0,19
	Transplantat	24	1,3925	0,8	0,16
FI	Transplantatlager	24	1,5208	0,85	0,17
	Transplantat	24	1,2675	0,69	0,14

**Tabelle 66: Test bei unabhängigen Stichproben, Gruppenvariable = ROIs**

		Test bei unabhängigen Stichproben - VEGF - ROIs				
		Levene-Test der Varianzgleichheit		T-Test für die Mittelwertgleichheit		
		F	Signifikanz	T	df	Sig. (2-seitig)
IRS	Varianzen sind gleich	4,116	,048	1,348	46	,184
	Varianzen sind nicht gleich			1,348	43,322	,185
Positivität	Varianzen sind gleich	1,125	,294	,932	46	,356
	Varianzen sind nicht gleich			,932	45,077	,356
FI	Varianzen sind gleich	1,682	,201	1,129	46	,265
	Varianzen sind nicht gleich			1,129	44,162	,265

		Test bei unabhängigen Stichproben - VEGF - ROIs			
		T-Test für die Mittelwertgleichheit			
				95% Konfidenzintervall der Differenz	
		Mittlere Differenz	Standardfehler der Differenz	Untere	Obere
IRS	Varianzen sind gleich	,85125	,63165	-,42019	2,12269
	Varianzen sind nicht gleich	,85125	,63165	-,42231	2,12481
Positivität	Varianzen sind gleich	,23250	,24941	-,26953	,73453
	Varianzen sind nicht gleich	,23250	,24941	-,26981	,73481
FI	Varianzen sind gleich	,25333	,22444	-,19844	,70511
	Varianzen sind nicht gleich	,25333	,22444	-,19895	,70562

**Tabelle 67: Gruppenstatistiken, ROI = Transplantat, 2. Zeitpunkt Gruppenvariable = Konditionierung**

**Gruppenstatistiken - VEGF - Transplantat - 2. Zeitpunkt**

		N	Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler des Mittelwertes
IRS	klinische Atrophie	8	1,5338	2,05	0,73
	keine klinische Atrophie	2	3,2500	2,01	1,42
Positivität	klinische Atrophie	8	,9688	0,85	0,3
	keine klinische Atrophie	2	1,7500	0,59	0,42
FI	klinische Atrophie	8	,9375	0,8	0,28
	keine klinische Atrophie	2	1,7500	0,59	0,42

**Tabelle 68: Test bei unabhängigen Stichproben, ROI = Transplantat, 2. Zeitpunkt, Gruppenvariable = Konditionierung**

**Test bei unabhängigen Stichproben - VEGF - Transplantat - 2. Zeitpunkt**

		Levene-Test der Varianzgleichheit		T-Test für die Mittelwertgleichheit		
		F	Signifikanz	T	df	Sig. (2-seitig)
IRS	Varianzen sind gleich	,078	,788	-1,059	8	,320
	Varianzen sind nicht gleich			-1,076	1,577	,419
Positivität	Varianzen sind gleich	,395	,547	-1,202	8	,264
	Varianzen sind nicht gleich			-1,513	2,203	,258
FI	Varianzen sind gleich	,306	,595	-1,324	8	,222
	Varianzen sind nicht gleich			-1,605	2,049	,247

**Test bei unabhängigen Stichproben - VEGF - Transplantat - 2. Zeitpunkt**

		T-Test für die Mittelwertgleichheit			
				95% Konfidenzintervall der Differenz	
		Mittlere Differenz	Standardfehler der Differenz	Untere	Obere
IRS	Varianzen sind gleich	-1,71625	1,61991	-5,45178	2,01928
	Varianzen sind nicht gleich	-1,71625	1,59505	-10,68677	7,25427
Positivität	Varianzen sind gleich	-,78125	,64997	-2,28008	,71758
	Varianzen sind nicht gleich	-,78125	,51639	-2,81814	1,25564
FI	Varianzen sind gleich	-,81250	,61375	-2,22780	,60280
	Varianzen sind nicht gleich	-,81250	,50616	-2,94072	1,31572

7.1.3 Vascular Endothelial Growth Factor Rezeptor (VEGFR)

7.1.3.1 Vascular Endothelial Growth Factor Rezeptor-1 (VEGFR-1)

**Tabelle 69: Gruppenstatistiken, Gruppenvariable = Konditionierung**

Gruppenstatistiken - VEGFR-1					
		N	Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler des Mittelwertes
IRS	klinische Atrophie	48	3,4560	2,49	0,36
	keine klinische Atrophie	12	4,8125	2,52	0,73
Positivität	klinische Atrophie	48	1,8333	0,91	0,13
	keine klinische Atrophie	12	2,3333	0,69	0,2
FI	klinische Atrophie	48	1,5417	0,78	0,11
	keine klinische Atrophie	12	1,9167	0,61	0,17

**Tabelle 70: Test bei unabhängigen Stichproben, Gruppenvariable = Konditionierung**

Test bei unabhängigen Stichproben - VEGFR-1 - Konditionierung						
		Levene-Test der Varianzgleichheit		T-Test für die Mittelwertgleichheit		
		F	Signifikanz	T	df	Sig. (2-seitig)
IRS	Varianzen sind gleich	,114	,737	-1,685	58	,097
	Varianzen sind nicht gleich			-1,673	16,792	,113
Positivität	Varianzen sind gleich	2,479	,121	-1,782	58	,080
	Varianzen sind nicht gleich			-2,108	21,766	,047
FI	Varianzen sind gleich	1,443	,235	-1,556	58	,125
	Varianzen sind nicht gleich			-1,805	21,030	,085

Test bei unabhängigen Stichproben - VEGFR-1 - Konditionierung					
		T-Test für die Mittelwertgleichheit			
				95% Konfidenzintervall der Differenz	
		Mittlere Differenz	Standardfehler der Differenz	Untere	Obere
IRS	Varianzen sind gleich	-1,35646	,80505	-2,96794	,25502
	Varianzen sind nicht gleich	-1,35646	,81090	-3,06892	,35601
Positivität	Varianzen sind gleich	-,50000	,28058	-1,06164	,06164
	Varianzen sind nicht gleich	-,50000	,23724	-,99230	-,00770
FI	Varianzen sind gleich	-,37500	,24098	-,85737	,10737
	Varianzen sind nicht gleich	-,37500	,20775	-,80700	,05700



**Tabelle 71: Gruppenstatistiken, Gruppenvariable = Zeitpunkt**

		Gruppenstatistiken - VEGFR-1			
		N	Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler des Mittelwertes
IRS	Zeitpunkt 1	36	4,8756	2	0,33
	Zeitpunkt 2	36	2,2361	2,38	0,4
Positivität	Zeitpunkt 1	36	2,3264	0,56	0,09
	Zeitpunkt 2	36	1,3403	0,97	0,16
FI	Zeitpunkt 1	36	2,0069	0,51	0,09
	Zeitpunkt 2	36	1,1389	0,81	0,13

**Tabelle 72: Test bei unabhängigen Stichproben, Gruppenvariable = Zeitpunkt**

		Test bei unabhängigen Stichproben - VEGFR-1 - Zeitpunkt				
		Levene-Test der Varianzgleichheit		T-Test für die Mittelwertgleichheit		
		F	Signifikanz	T	df	Sig. (2-seitig)
IRS	Varianzen sind gleich	1,755	,190	5,088	70	,000
	Varianzen sind nicht gleich			5,088	67,999	,000
Positivität	Varianzen sind gleich	13,256	,001	5,307	70	,000
	Varianzen sind nicht gleich			5,307	55,955	,000
FI	Varianzen sind gleich	8,083	,006	5,437	70	,000
	Varianzen sind nicht gleich			5,437	59,164	,000

		Test bei unabhängigen Stichproben - VEGFR-1 - Zeitpunkt			
		T-Test für die Mittelwertgleichheit			
				95% Konfidenzintervall der Differenz	
		Mittlere Differenz	Standardfehler der Differenz	Untere	Obere
IRS	Varianzen sind gleich	2,63944	,51875	1,60482	3,67407
	Varianzen sind nicht gleich	2,63944	,51875	1,60429	3,67460
Positivität	Varianzen sind gleich	,98611	,18580	,61555	1,35667
	Varianzen sind nicht gleich	,98611	,18580	,61391	1,35832
FI	Varianzen sind gleich	,86806	,15965	,54964	1,18647
	Varianzen sind nicht gleich	,86806	,15965	,54861	1,18750

**Tabelle 73: Gruppenstatistiken, Gruppenvariable = ROIs**

Gruppenstatistiken - VEGFR-1					
		N	Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler des Mittelwertes
IRS	Transplantatlager	24	4,5000	3,08	0,63
	Transplantat	24	3,5425	2,37	0,48
Positivität	Transplantatlager	24	2,1458	0,88	0,18
	Transplantat	24	1,8125	0,99	0,2
FI	Transplantatlager	24	1,7917	0,88	0,18
	Transplantat	24	1,5729	0,76	0,15

**Tabelle 74: Test bei unabhängigen Stichproben, Gruppenvariable = ROIs**

Test bei unabhängigen Stichproben -VEGFR-1 - ROIs						
		Levene-Test der Varianzgleichheit		T-Test für die Mittelwertgleichheit		
		F	Signifikanz	T	df	Sig. (2-seitig)
IRS	Varianzen sind gleich	2,877	,097	1,209	46	,233
	Varianzen sind nicht gleich			1,209	43,157	,233
Positivität	Varianzen sind gleich	,294	,590	1,236	46	,223
	Varianzen sind nicht gleich			1,236	45,387	,223
FI	Varianzen sind gleich	1,582	,215	,921	46	,362
	Varianzen sind nicht gleich			,921	44,944	,362

Test bei unabhängigen Stichproben -VEGFR-1 - ROIs					
		T-Test für die Mittelwertgleichheit			
				95% Konfidenzintervall der Differenz	
		Mittlere Differenz	Standardfehler der Differenz	Untere	Obere
IRS	Varianzen sind gleich	,95750	,79189	-,63649	2,55149
	Varianzen sind nicht gleich	,95750	,79189	-,63933	2,55433
Positivität	Varianzen sind gleich	,33333	,26968	-,20951	,87617
	Varianzen sind nicht gleich	,33333	,26968	-,20970	,87637
FI	Varianzen sind gleich	,21875	,23753	-,25937	,69687
	Varianzen sind nicht gleich	,21875	,23753	-,25967	,69717

**Tabelle 75: Gruppenstatistiken, 1. Zeitpunkt, Gruppenvariable = Konditionierung**

**Gruppenstatistiken - VEGFR-1 - 1. Zeitpunkt**

		N	Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler des Mittelwertes
IRS	klinische Atrophie	24	4,4329	1,93	0,39
	keine klinische Atrophie	6	6,6250	1,83	0,75
Positivität	klinische Atrophie	24	2,2604	0,58	0,12
	keine klinische Atrophie	6	2,7500	0,42	0,17
FI	klinische Atrophie	24	1,8646	0,51	0,1
	keine klinische Atrophie	6	2,3750	0,38	0,15

**Tabelle 76: Test bei unabhängigen Stichproben, 1. Zeitpunkt, Gruppenvariable = Konditionierung**

**Test bei unabhängigen Stichproben - VEGFR-1 -1. Zeitpunkt**

		Levene-Test der Varianzgleichheit		T-Test für die Mittelwertgleichheit		
		F	Signifikanz	T	df	Sig. (2-seitig)
IRS	Varianzen sind gleich	,001	,976	-2,516	28	,018
	Varianzen sind nicht gleich			-2,598	8,023	,032
Positivität	Varianzen sind gleich	,528	,473	-1,926	28	,064
	Varianzen sind nicht gleich			-2,352	10,491	,039
FI	Varianzen sind gleich	,675	,418	-2,305	28	,029
	Varianzen sind nicht gleich			-2,744	9,998	,021

**Test bei unabhängigen Stichproben - VEGFR-1 -1. Zeitpunkt**

		T-Test für die Mittelwertgleichheit			
				95% Konfidenzintervall der Differenz	
				Untere	Obere
		Mittlere Differenz	Standardfehler der Differenz		
IRS	Varianzen sind gleich	-2,19208	,87126	-3,97677	-,40740
	Varianzen sind nicht gleich	-2,19208	,84370	-4,13667	-,24750
Positivität	Varianzen sind gleich	-,48958	,25420	-1,01030	,03113
	Varianzen sind nicht gleich	-,48958	,20812	-,95039	-,02878
FI	Varianzen sind gleich	-,51042	,22145	-,96404	-,05679
	Varianzen sind nicht gleich	-,51042	,18600	-,92487	-,09597

7.1.3.2 Vascular Endothelial Growth Factor Rezeptor-2 (VEGFR-2)

**Tabelle 77: Gruppenstatistiken, Gruppenvariable = Konditionierung**

**Gruppenstatistiken - VEGFR-2**

		N	Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler des Mittelwertes
IRS	klinische Atrophie	48	4,0029	2,43	0,35
	keine klinische Atrophie	12	4,9067	2,33	0,67
Positivität	klinische Atrophie	48	1,9635	0,85	0,12
	keine klinische Atrophie	12	2,4792	0,57	0,16
FI	klinische Atrophie	48	1,7760	0,67	0,1
	keine klinische Atrophie	12	1,9167	0,67	0,19

**Tabelle 78: Test bei unabhängigen Stichproben, Gruppenvariable = Konditionierung**

**Test bei unabhängigen Stichproben - VEGFR-2 - Konditionierung**

		Levene-Test der Varianzgleichheit		T-Test für die Mittelwertgleichheit		
		F	Signifikanz	T	df	Sig. (2-seitig)
IRS	Varianzen sind gleich	,000	,997	-1,161	58	,251
	Varianzen sind nicht gleich			-1,193	17,529	,249
Positivität	Varianzen sind gleich	,494	,485	-1,992	58	,051
	Varianzen sind nicht gleich			-2,519	24,812	,019
FI	Varianzen sind gleich	,001	,976	-,648	58	,519
	Varianzen sind nicht gleich			-,651	17,021	,524

**Test bei unabhängigen Stichproben - VEGFR-2 - Konditionierung**

		T-Test für die Mittelwertgleichheit			
				95% Konfidenzintervall der Differenz	
		Mittlere Differenz	Standardfehler der Differenz	Untere	Obere
IRS	Varianzen sind gleich	-,90375	,77860	-2,46229	,65479
	Varianzen sind nicht gleich	-,90375	,75768	-2,49864	,69114
Positivität	Varianzen sind gleich	-,51562	,25884	-1,03376	,00251
	Varianzen sind nicht gleich	-,51562	,20472	-,93741	-,09384
FI	Varianzen sind gleich	-,14063	,21691	-,57481	,29356
	Varianzen sind nicht gleich	-,14063	,21606	-,59642	,31517

**Tabelle 79: Gruppenstatistiken, Gruppenvariable = Zeitpunkt**

		Gruppenstatistiken - VEGFR-2			
		N	Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler des Mittelwertes
IRS	Zeitpunkt 1	36	5,0628	2,05	0,34
	Zeitpunkt 2	36	2,7436	2,62	0,44
Positivität	Zeitpunkt 1	36	2,4028	0,53	0,09
	Zeitpunkt 2	36	1,4583	1,03	0,17
FI	Zeitpunkt 1	36	2,0139	0,47	0,08
	Zeitpunkt 2	36	1,3958	0,82	0,14

**Tabelle 80: Test bei unabhängigen Stichproben, Gruppenvariable = Zeitpunkt**

		Test bei unabhängigen Stichproben - VEGFR-2 - Zeitpunkt				
		Levene-Test der Varianzgleichheit		T-Test für die Mittelwertgleichheit		
		F	Signifikanz	T	df	Sig. (2-seitig)
IRS	Varianzen sind gleich	1,273	,263	4,181	70	,000
	Varianzen sind nicht gleich			4,181	66,126	,000
Positivität	Varianzen sind gleich	18,951	,000	4,885	70	,000
	Varianzen sind nicht gleich			4,885	52,417	,000
FI	Varianzen sind gleich	13,338	,000	3,899	70	,000
	Varianzen sind nicht gleich			3,899	55,864	,000

		Test bei unabhängigen Stichproben - VEGFR-2 - Zeitpunkt			
		T-Test für die Mittelwertgleichheit			
				95% Konfidenzintervall der Differenz	
		Mittlere Differenz	Standardfehler der Differenz	Untere	Obere
IRS	Varianzen sind gleich	2,31917	,55470	1,21286	3,42547
	Varianzen sind nicht gleich	2,31917	,55470	1,21172	3,42661
Positivität	Varianzen sind gleich	,94444	,19334	,55885	1,33004
	Varianzen sind nicht gleich	,94444	,19334	,55656	1,33233
FI	Varianzen sind gleich	,61806	,15853	,30188	,93423
	Varianzen sind nicht gleich	,61806	,15853	,30047	,93564

**Tabelle 81: Gruppenstatistiken, Gruppenvariable = ROIs**

		Gruppenstatistiken - VEGFR-2			
		N	Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler des Mittelwertes
IRS	Transplantatlager	24	4,7396	3,18	0,65
	Transplantat	24	3,7617	2,25	0,46
Positivität	Transplantatlager	24	2,1042	1,08	0,22
	Transplantat	24	1,8542	0,83	0,17
FI	Transplantatlager	24	1,8958	0,78	0,16
	Transplantat	24	1,7188	0,74	0,15

**Tabelle 82: Test bei unabhängigen Stichproben, Gruppenvariable = ROIs**

		Test bei unabhängigen Stichproben - VEGFR-2 - ROIs				
		Levene-Test der Varianzgleichheit		T-Test für die Mittelwertgleichheit		
		F	Signifikanz	T	df	Sig. (2-seitig)
IRS	Varianzen sind gleich	7,425	,009	1,230	46	,225
	Varianzen sind nicht gleich			1,230	41,450	,226
Positivität	Varianzen sind gleich	3,575	,065	,899	46	,374
	Varianzen sind nicht gleich			,899	43,018	,374
FI	Varianzen sind gleich	,803	,375	,806	46	,424
	Varianzen sind nicht gleich			,806	45,887	,424

		Test bei unabhängigen Stichproben - VEGFR-2 - ROIs			
		T-Test für die Mittelwertgleichheit			
				95% Konfidenzintervall der Differenz	
		Mittlere Differenz	Standardfehler der Differenz	Untere	Obere
IRS	Varianzen sind gleich	,97792	,79535	-,62304	2,57887
	Varianzen sind nicht gleich	,97792	,79535	-,62779	2,58362
Positivität	Varianzen sind gleich	,25000	,27822	-,31003	,81003
	Varianzen sind nicht gleich	,25000	,27822	-,31108	,81108
FI	Varianzen sind gleich	,17708	,21974	-,26523	,61940
	Varianzen sind nicht gleich	,17708	,21974	-,26526	,61943

**Tabelle 83: Gruppenstatistiken, 2. Zeitpunkt, Gruppenvariable = Konditionierung**

Gruppenstatistiken - VEGFR-2 - 2. Zeitpunkt					
		N	Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler des Mittelwertes
IRS	klinische Atrophie	24	3,0887	2,7	0,55
	keine klinische Atrophie	6	3,8967	2,15	0,88
Positivität	klinische Atrophie	24	1,5521	0,97	0,2
	keine klinische Atrophie	6	2,2917	0,6	0,25
FI	klinische Atrophie	24	1,5417	0,8	0,16
	keine klinische Atrophie	6	1,6667	0,75	0,31

**Tabelle 84: Test bei unabhängigen Stichproben, 2. Zeitpunkt, Gruppenvariable = Konditionierung**

Test bei unabhängigen Stichproben - VEGFR-2 - 2. Zeitpunkt						
		Levene-Test der Varianzgleichheit		T-Test für die Mittelwertgleichheit		
		F	Signifikanz	T	df	Sig. (2-seitig)
IRS	Varianzen sind gleich	,633	,433	-,678	28	,503
	Varianzen sind nicht gleich			-,780	9,410	,454
Positivität	Varianzen sind gleich	2,363	,136	-1,776	28	,087
	Varianzen sind nicht gleich			-2,350	12,447	,036
FI	Varianzen sind gleich	,036	,852	-,345	28	,733
	Varianzen sind nicht gleich			-,359	8,107	,729

Test bei unabhängigen Stichproben - VEGFR-2 - 2. Zeitpunkt						
		T-Test für die Mittelwertgleichheit				
				95% Konfidenzintervall der Differenz		
		Mittlere Differenz	Standardfehler der Differenz	Untere	Obere	
IRS	Varianzen sind gleich	-,80792	1,19100	-3,24757	1,63173	
	Varianzen sind nicht gleich	-,80792	1,03550	-3,13491	1,51908	
Positivität	Varianzen sind gleich	-,73958	,41636	-1,59247	,11330	
	Varianzen sind nicht gleich	-,73958	,31466	-1,42246	-,05671	
FI	Varianzen sind gleich	-,12500	,36256	-,86767	,61767	
	Varianzen sind nicht gleich	-,12500	,34831	-,92635	,67635	

7.1.4 von-Willebrand-Faktor (vWF)

**Tabelle 85: Gruppenstatistiken, Gruppenvariable = Konditionierung**

		Gruppenstatistiken - vWF			
		N	Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler des Mittelwertes
IRS	klinische Atrophie	48	3,6852	2,44	0,35
	keine klinische Atrophie	12	2,7400	1,96	0,57
Positivität	klinische Atrophie	48	1,8958	0,79	0,11
	keine klinische Atrophie	12	1,5208	0,86	0,25
FI	klinische Atrophie	48	1,6563	0,75	0,11
	keine klinische Atrophie	12	1,4167	0,8	0,23

**Tabelle 86: Test bei unabhängigen Stichproben, Gruppenvariable = Konditionierung**

		Test bei unabhängigen Stichproben - vWF - Konditionierung				
		Levene-Test der Varianzgleichheit		T-Test für die Mittelwertgleichheit		
		F	Signifikanz	T	df	Sig. (2-seitig)
IRS	Varianzen sind gleich	,678	,414	1,241	58	,219
	Varianzen sind nicht gleich			1,418	20,480	,171
Positivität	Varianzen sind gleich	,360	,551	1,447	58	,153
	Varianzen sind nicht gleich			1,378	16,019	,187
FI	Varianzen sind gleich	,054	,817	,977	58	,333
	Varianzen sind nicht gleich			,939	16,184	,361

		Test bei unabhängigen Stichproben - vWF - Konditionierung			
		T-Test für die Mittelwertgleichheit			
				95% Konfidenzintervall der Differenz	
		Mittlere Differenz	Standardfehler der Differenz	Untere	Obere
IRS	Varianzen sind gleich	,94521	,76143	-,57896	2,46937
	Varianzen sind nicht gleich	,94521	,66676	-,44354	2,33396
Positivität	Varianzen sind gleich	,37500	,25921	-,14387	,89387
	Varianzen sind nicht gleich	,37500	,27212	-,20182	,95182
FI	Varianzen sind gleich	,23958	,24527	-,25137	,73054
	Varianzen sind nicht gleich	,23958	,25509	-,30069	,77985



**Tabelle 87: Gruppenstatistiken, Gruppenvariable = Zeitpunkt**

		Gruppenstatistiken - vWF			
		N	Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler des Mittelwertes
IRS	Zeitpunkt 1	36	3,9553	2,46	0,41
	Zeitpunkt 2	36	2,8439	2,14	0,36
Positivität	Zeitpunkt 1	36	1,9722	0,82	0,14
	Zeitpunkt 2	36	1,6042	0,75	0,12
FI	Zeitpunkt 1	36	1,7153	0,75	0,12
	Zeitpunkt 2	36	1,4722	0,72	0,12

**Tabelle 88: Test bei unabhängigen Stichproben, Gruppenvariable = Zeitpunkt**

		Test bei unabhängigen Stichproben - vWF - Zeitpunkt				
		Levene-Test der Varianzgleichheit		T-Test für die Mittelwertgleichheit		
		F	Signifikanz	T	df	Sig. (2-seitig)
IRS	Varianzen sind gleich	1,690	,198	2,043	70	,045
	Varianzen sind nicht gleich			2,043	68,656	,045
Positivität	Varianzen sind gleich	,015	,902	1,986	70	,051
	Varianzen sind nicht gleich			1,986	69,354	,051
FI	Varianzen sind gleich	,252	,617	1,402	70	,165
	Varianzen sind nicht gleich			1,402	69,933	,165

		Test bei unabhängigen Stichproben - vWF - Zeitpunkt			
		T-Test für die Mittelwertgleichheit			
				95% Konfidenzintervall der Differenz	
		Mittlere Differenz	Standardfehler der Differenz	Untere	Obere
IRS	Varianzen sind gleich	1,11139	,54395	,02651	2,19626
	Varianzen sind nicht gleich	1,11139	,54395	,02614	2,19664
Positivität	Varianzen sind gleich	,36806	,18531	-,00154	,73765
	Varianzen sind nicht gleich	,36806	,18531	-,00160	,73771
FI	Varianzen sind gleich	,24306	,17336	-,10269	,58881
	Varianzen sind nicht gleich	,24306	,17336	-,10270	,58881

**Tabelle 89: Gruppenstatistiken, Gruppenvariable = ROIs**

		Gruppenstatistiken - vWF			
		N	Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler des Mittelwertes
IRS	Transplantatlager	24	4,3229	2,71	0,55
	Transplantat	24	3,0633	2,11	0,43
Positivität	Transplantatlager	24	2,1042	0,72	0,15
	Transplantat	24	1,6771	0,76	0,15
FI	Transplantatlager	24	1,8750	0,66	0,14
	Transplantat	24	1,5104	0,72	0,15

**Tabelle 90: Test bei unabhängigen Stichproben, Gruppenvariable = ROIs**

		Test bei unabhängigen Stichproben - vWF - ROIs				
		Levene-Test der Varianzgleichheit		T-Test für die Mittelwertgleichheit		
		F	Signifikanz	T	df	Sig. (2-seitig)
IRS	Varianzen sind gleich	2,626	,112	1,796	46	,079
	Varianzen sind nicht gleich			1,796	43,357	,079
Positivität	Varianzen sind gleich	,020	,887	2,000	46	,051
	Varianzen sind nicht gleich			2,000	45,897	,051
FI	Varianzen sind gleich	,026	,873	1,829	46	,074
	Varianzen sind nicht gleich			1,829	45,730	,074

### 7.1.5 Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS)

#### 7.1.5.1 endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS)

**Tabelle 91: Gruppenstatistiken, Gruppenvariable = Konditionierung**

		Gruppenstatistiken - eNOS			
		N	Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler des Mittelwertes
IRS	klinische Atrophie	48	4,1542	2,39	0,34471
	keine klinische Atrophie	12	4,6933	1,82	0,52511
Positivität	klinische Atrophie	48	2,0833	0,75	0,10795
	keine klinische Atrophie	12	2,2642	0,45	0,13025
FI	klinische Atrophie	48	1,7865	0,68	0,09762
	keine klinische Atrophie	12	2,0000	0,5	0,14375

**Tabelle 92: Test bei unabhängigen Stichproben, Gruppenvariable = Konditionierung**

**Test bei unabhängigen Stichproben - eNOS - Konditionierung**

		Levene-Test der Varianzgleichheit		T-Test für die Mittelwertgleichheit		
		F	Signifikanz	T	df	Sig. (2-seitig)
IRS	Varianzen sind gleich	1,336	,253	-,729	58	,469
	Varianzen sind nicht gleich					
Positivität	Varianzen sind gleich	1,982	,164	-,799	58	,428
	Varianzen sind nicht gleich					
FI	Varianzen sind gleich	1,825	,182	-1,024	58	,310
	Varianzen sind nicht gleich					

**Test bei unabhängigen Stichproben - eNOS - Konditionierung**

		T-Test für die Mittelwertgleichheit			
				95% Konfidenzintervall der Differenz	
				Untere	Obere
		Mittlere Differenz	Standardfehler der Differenz		
IRS	Varianzen sind gleich	-,53917	,73948	-2,01939	,94106
	Varianzen sind nicht gleich	-,53917	,62814	-1,84331	,76497
Positivität	Varianzen sind gleich	-,18083	,22636	-,63395	,27228
	Varianzen sind nicht gleich	-,18083	,16917	-,52726	,16559
FI	Varianzen sind gleich	-,21354	,20859	-,63108	,20400
	Varianzen sind nicht gleich	-,21354	,17377	-,57356	,14648

**Tabelle 93: Gruppenstatistiken, Gruppenvariable = Zeitpunkt**

**Gruppenstatistiken - eNOS**

		N	Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler des Mittelwertes
IRS	Zeitpunkt 1	36	4,4286	2,07	0,35
	Zeitpunkt 2	36	3,7372	2,53	0,42
Positivität	Zeitpunkt 1	36	2,2244	0,57	0,09
	Zeitpunkt 2	36	1,8428	0,82	0,14
FI	Zeitpunkt 1	36	1,8728	0,54	0,09
	Zeitpunkt 2	36	1,7106	0,78	0,13

**Tabelle 94: Test bei unabhängigen Stichproben, Gruppenvariable = Zeitpunkt**

**Test bei unabhängigen Stichproben - eNOS - Zeitpunkt**

		Levene-Test der Varianzgleichheit		T-Test für die Mittelwertgleichheit		
		F	Signifikanz	T	df	Sig. (2-seitig)
IRS	Varianzen sind gleich	1,447	,233	1,268	70	,209
	Varianzen sind nicht gleich			1,268	67,354	,209
Positivität	Varianzen sind gleich	2,149	,147	2,305	70	,024
	Varianzen sind nicht gleich			2,305	62,362	,025
FI	Varianzen sind gleich	4,793	,032	1,020	70	,311
	Varianzen sind nicht gleich			1,020	62,417	,312

**Test bei unabhängigen Stichproben - eNOS - Zeitpunkt**

		T-Test für die Mittelwertgleichheit			
				95% Konfidenzintervall der Differenz	
				Untere	Obere
		Mittlere Differenz	Standardfehler der Differenz		
IRS	Varianzen sind gleich	,69139	,54543	-,39644	1,77922
	Varianzen sind nicht gleich	,69139	,54543	-,39719	1,77997
Positivität	Varianzen sind gleich	,38167	,16562	,05135	,71198
	Varianzen sind nicht gleich	,38167	,16562	,05064	,71269
FI	Varianzen sind gleich	,16222	,15906	-,15502	,47946
	Varianzen sind nicht gleich	,16222	,15906	-,15570	,48014

**Tabelle 95: Gruppenstatistiken, Gruppenvariable = ROIs**

**Gruppenstatistiken - eNOS**

		N	Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler des Mittelwertes
IRS	Transplantatlager	24	5,2917	2,78	0,57
	Transplantat	24	3,2800	1,48	0,3
Positivität	Transplantatlager	24	2,3125	0,81	0,16
	Transplantat	24	1,8092	0,62	0,13
FI	Transplantatlager	24	2,0625	0,8	0,16
	Transplantat	24	1,5833	0,54	0,11

**Tabelle 96: Test bei unabhängigen Stichproben, Gruppenvariable = ROIs**

**Test bei unabhängigen Stichproben - eNOS - ROIs**

		Levene-Test der Varianzgleichheit		T-Test für die Mittelwertgleichheit		
		F	Signifikanz	T	df	Sig. (2-seitig)
IRS	Varianzen sind gleich	14,789	,000	3,127	46	,003
	Varianzen sind nicht gleich			3,127	35,062	,004
Positivität	Varianzen sind gleich	2,183	,146	2,424	46	,019
	Varianzen sind nicht gleich			2,424	43,237	,020
FI	Varianzen sind gleich	3,970	,052	2,430	46	,019
	Varianzen sind nicht gleich			2,430	40,581	,020

**Test bei unabhängigen Stichproben - eNOS - ROIs**

		T-Test für die Mittelwertgleichheit			
				95% Konfidenzintervall der Differenz	
		Mittlere Differenz	Standardfehler der Differenz	Untere	Obere
IRS	Varianzen sind gleich	2,01167	,64342	,71652	3,30681
	Varianzen sind nicht gleich	2,01167	,64342	,70553	3,31780
Positivität	Varianzen sind gleich	,50333	,20763	,08540	,92127
	Varianzen sind nicht gleich	,50333	,20763	,08468	,92199
FI	Varianzen sind gleich	,47917	,19721	,08221	,87612
	Varianzen sind nicht gleich	,47917	,19721	,08078	,87756

**Tabelle 97: Gruppenstatistiken, 2. Zeitpunkt, Gruppenvariable = Konditionierung**

**Gruppenstatistiken - eNOS - 2. Zeitpunkt**

		N	Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler des Mittelwertes
IRS	klinische Atrophie	24	4,0529	2,06	0,42
	keine klinische Atrophie	6	5,8600	1,38	0,56
Positivität	klinische Atrophie	24	2,1875	0,59	0,12
	keine klinische Atrophie	6	2,5550	0,39	0,16
FI	klinische Atrophie	24	1,7500	0,51	0,1
	keine klinische Atrophie	6	2,2783	0,4	0,16

**Tabelle 98: Test bei unabhängigen Stichproben, 2. Zeitpunkt, Gruppenvariable = Konditionierung**

**Test bei unabhängigen Stichproben - eNOS - 2. Zeitpunkt**

		Levene-Test der Varianzgleichheit		T-Test für die Mittelwertgleichheit		
		F	Signifikanz	T	df	Sig. (2-seitig)
IRS	Varianzen sind gleich	1,274	,269	-2,025	28	,053
	Varianzen sind nicht gleich			-2,569		
Positivität	Varianzen sind gleich	3,053	,092	-1,437	28	,162
	Varianzen sind nicht gleich			-1,840		
FI	Varianzen sind gleich	,728	,401	-2,368	28	,025
	Varianzen sind nicht gleich			-2,718		

**Test bei unabhängigen Stichproben - eNOS - 2. Zeitpunkt**

		T-Test für die Mittelwertgleichheit			
				95% Konfidenzintervall der Differenz	
				Untere	Obere
		Mittlere Differenz	Standardfehler der Differenz		
IRS	Varianzen sind gleich	-1,80708	,89252	-3,63534	,02117
	Varianzen sind nicht gleich	-1,80708	,70333	-3,34950	-,26467
Positivität	Varianzen sind gleich	-,36750	,25577	-,89141	,15641
	Varianzen sind nicht gleich	-,36750	,19977	-,80462	,06962
FI	Varianzen sind gleich	-,52833	,22309	-,98532	-,07135
	Varianzen sind nicht gleich	-,52833	,19437	-,96534	-,09133

7.1.5.2 induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS)

**Tabelle 99: Gruppenstatistiken, Gruppenvariable = Konditionierung**

**Gruppenstatistiken - iNOS**

		N	Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler des Mittelwertes
IRS	klinische Atrophie	48	4,4354	2,26	0,33
	keine klinische Atrophie	12	4,4925	2,48	0,72
Positivität	klinische Atrophie	48	2,1198	0,67	0,1
	keine klinische Atrophie	12	2,3200	0,47	0,14
FI	klinische Atrophie	48	1,9323	0,6	0,09
	keine klinische Atrophie	12	1,8325	0,72	0,21

**Tabelle 100: Test bei unabhängigen Stichproben, Gruppenvariable = Konditionierung****Test bei unabhängigen Stichproben - iNOS - Konditionierung**

		Levene-Test der Varianzgleichheit		T-Test für die Mittelwertgleichheit		
		F	Signifikanz	T	df	Sig. (2-seitig)
IRS	Varianzen sind gleich	,000	,997	-,077	58	,939
	Varianzen sind nicht gleich			-,072	15,869	,943
Positivität	Varianzen sind gleich	4,542	,037	-,975	58	,333
	Varianzen sind nicht gleich			-1,197	23,332	,243
FI	Varianzen sind gleich	,470	,496	,498	58	,621
	Varianzen sind nicht gleich			,445	15,018	,663

**Test bei unabhängigen Stichproben - iNOS - Konditionierung**

		T-Test für die Mittelwertgleichheit			
				95% Konfidenzintervall der Differenz	
		Mittlere Differenz	Standardfehler der Differenz	Untere	Obere
IRS	Varianzen sind gleich	-,05708	,74415	-1,54666	1,43249
	Varianzen sind nicht gleich	-,05708	,78808	-1,72886	1,61469
Positivität	Varianzen sind gleich	-,20021	,20529	-,61114	,21072
	Varianzen sind nicht gleich	-,20021	,16732	-,54606	,14565
FI	Varianzen sind gleich	,09979	,20052	-,30159	,50117
	Varianzen sind nicht gleich	,09979	,22442	-,37850	,57808

**Tabelle 101: Gruppenstatistiken, Gruppenvariable = Zeitpunkt****Gruppenstatistiken - iNOS**

		N	Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler des Mittelwertes
IRS	Zeitpunkt 1	36	5,2283	2,3	0,38
	Zeitpunkt 2	36	3,0894	1,9	0,32
Positivität	Zeitpunkt 1	36	2,3125	0,64	0,11
	Zeitpunkt 2	36	1,7247	0,73	0,12
FI	Zeitpunkt 1	36	2,1411	0,54	0,09
	Zeitpunkt 2	36	1,5739	0,67	0,11

**Tabelle 102: Test bei unabhängigen Stichproben, Gruppenvariable = Zeitpunkt**

**Test bei unabhängigen Stichproben - iNOS - Zeitpunkt**

		Levene-Test der Varianzgleichheit		T-Test für die Mittelwertgleichheit		
		F	Signifikanz	T	df	Sig. (2-seitig)
		IRS	Varianzen sind gleich	,679	,413	4,301
	Varianzen sind nicht gleich			4,301	67,535	,000
Positivität	Varianzen sind gleich	,776	,381	3,635	70	,001
	Varianzen sind nicht gleich			3,635	68,942	,001
FI	Varianzen sind gleich	1,643	,204	3,934	70	,000
	Varianzen sind nicht gleich			3,934	67,103	,000

**Test bei unabhängigen Stichproben - iNOS - Zeitpunkt**

		T-Test für die Mittelwertgleichheit			
				95% Konfidenzintervall der Differenz	
		Mittlere Differenz	Standardfehler der Differenz	Untere	Obere
IRS	Varianzen sind gleich	2,13889	,49734	1,14698	3,13080
	Varianzen sind nicht gleich	2,13889	,49734	1,14634	3,13143
Positivität	Varianzen sind gleich	,58778	,16172	,26524	,91031
	Varianzen sind nicht gleich	,58778	,16172	,26516	,91040
FI	Varianzen sind gleich	,56722	,14417	,27967	,85477
	Varianzen sind nicht gleich	,56722	,14417	,27946	,85499

**Tabelle 103: Gruppenstatistiken, Gruppenvariable = ROIs**

**Gruppenstatistiken - iNOS**

Bereich		N	Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler des Mittelwertes
IRS	Transplantatlager	24	5,0313	2,33	0,48
	Transplantat	24	3,3308	1,79	0,37
Positivität	Transplantatlager	24	2,3750	0,68	0,14
	Transplantat	24	1,7017	0,64	0,13
FI	Transplantatlager	24	2,0000	0,63	0,13
	Transplantat	24	1,6975	0,6	0,12



**Tabelle 104: Test bei unabhängigen Stichproben, Gruppenvariable = ROIs**

**Test bei unabhängigen Stichproben - iNOS - ROIs**

		Levene-Test der Varianzgleichheit		T-Test für die Mittelwertgleichheit		
		F	Signifikanz	T	df	Sig. (2-seitig)
		IRS	Varianzen sind gleich	,996	,323	2,832
	Varianzen sind nicht gleich			2,832	43,103	,007
Positivität	Varianzen sind gleich	,017	,897	3,543	46	,001
	Varianzen sind nicht gleich			3,543	45,801	,001
FI	Varianzen sind gleich	,022	,883	1,711	46	,094
	Varianzen sind nicht gleich			1,711	45,913	,094

**Test bei unabhängigen Stichproben - iNOS - ROIs**

		T-Test für die Mittelwertgleichheit			
				95% Konfidenzintervall der Differenz	
		Mittlere Differenz	Standardfehler der Differenz	Untere	Obere
IRS	Varianzen sind gleich	1,70042	,60040	,49187	2,90896
	Varianzen sind nicht gleich	1,70042	,60040	,48967	2,91116
Positivität	Varianzen sind gleich	,67333	,19003	,29081	1,05585
	Varianzen sind nicht gleich	,67333	,19003	,29077	1,05590
FI	Varianzen sind gleich	,30250	,17677	-,05331	,65831
	Varianzen sind nicht gleich	,30250	,17677	-,05333	,65833

---

## 7.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	<i>Seite 12</i>	Abbildung 26	<i>Seite 76</i>
Abbildung 2	<i>Seite 20</i>	Abbildung 27	<i>Seite 78</i>
Abbildung 3	<i>Seite 34</i>	Abbildung 28	<i>Seite 81</i>
Abbildung 4	<i>Seite 35</i>	Abbildung 29	<i>Seite 82</i>
Abbildung 5	<i>Seite 35</i>	Abbildung 30	<i>Seite 84</i>
Abbildung 6	<i>Seite 36</i>	Abbildung 31	<i>Seite 86</i>
Abbildung 7	<i>Seite 36</i>	Abbildung 32	<i>Seite 87</i>
Abbildung 8	<i>Seite 37</i>	Abbildung 33	<i>Seite 89</i>
Abbildung 9	<i>Seite 42</i>		
Abbildung 10	<i>Seite 43</i>		
Abbildung 11	<i>Seite 44</i>		
Abbildung 12	<i>Seite 45</i>		
Abbildung 13	<i>Seite 51</i>		
Abbildung 14	<i>Seite 53</i>		
Abbildung 15	<i>Seite 54</i>		
Abbildung 16	<i>Seite 57</i>		
Abbildung 17	<i>Seite 59</i>		
Abbildung 18	<i>Seite 60</i>		
Abbildung 19	<i>Seite 63</i>		
Abbildung 20	<i>Seite 65</i>		
Abbildung 21	<i>Seite 66</i>		
Abbildung 22	<i>Seite 69</i>		
Abbildung 23	<i>Seite 71</i>		
Abbildung 24	<i>Seite 72</i>		
Abbildung 25	<i>Seite 75</i>		

### 7.3 Auswertungsbogen

Präparat (Nr.)		Einheitzeit		Antikörper	
Konditionierung (zB +Rmem)					
Positivität der Färbung	(-) 0-5%	(+) >5-20%	(++) >20-50%	(+++) >50-100%	
	2,5	12,5	35,0	75,0	
UK Komp	GESICHTSFELDER				
<b>Färbemertensität</b>					
<input type="checkbox"/> 0 NICHTS					
<input type="checkbox"/> 1 Schwach					
<input type="checkbox"/> 2 Mittel					
<input type="checkbox"/> 3 Stark					
<i>Becken Spongiosa</i>					
<b>Färbemertensität</b>					
<input type="checkbox"/> 0 NICHTS					
<input type="checkbox"/> 1 Schwach					
<input type="checkbox"/> 2 Mittel					
<input type="checkbox"/> 3 Stark					
<i>Becken Kompakta</i>					
<b>Färbemertensität</b>					
<input type="checkbox"/> 0 NICHTS					
<input type="checkbox"/> 1 Schwach					
<input type="checkbox"/> 2 Mittel					
<input type="checkbox"/> 3 Stark					
<i>Ecke</i>					
<b>Färbemertensität</b>					
<input type="checkbox"/> 0 NICHTS					
<input type="checkbox"/> 1 Schwach					
<input type="checkbox"/> 2 Mittel					
<input type="checkbox"/> 3 Stark					
<i>eventl BioOss Kompartment</i>					
<b>Färbemertensität</b>					
<input type="checkbox"/> 0 NICHTS					
<input type="checkbox"/> 1 Schwach					
<input type="checkbox"/> 2 Mittel					
<input type="checkbox"/> 3 Stark					

## 8 Danksagung

Herrn Priv. – Doz. Dr. med. Dr. med. dent. T. Reuther, leitender Oberarzt der Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie des Universitätsklinikums Würzburg, gilt mein besonderer Dank für die Überlassung des Dissertationsthemas und die sowohl fachlich wie auch menschlich jederzeit hervorragende Betreuung.

Ich danke Herrn Univ. – Professor Dr. med. Dr. med. dent. A. C. Kübler, Direktor der Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie des Universitätsklinikums Würzburg, für die Möglichkeit, die Arbeit im Labor seiner Klinik durchführen zu können.

Herrn Univ. – Professor Dr. med. W. Block, Vorstand des Institutes für Kreislaufforschung und Sportmedizin der deutschen Sporthochschule Köln, danke ich für die Unterstützung bei den ersten Schritten im Labor.

Herrn Univ. – Professor Dr. rer. nat. J. Groll, Vorstand der Abteilung für Funktionswerkstoffe der Medizin und Zahnheilkunde des Universitätsklinikums Würzburg danke ich für die Übernahme des Koreferates.

Ebenfalls bedanken möchte ich mich besonders bei Andreas Wannhoff, der die zeitintensive Zweitauswertung so geduldig und engagiert übernommen hat.

Bei meiner Familie, die mir das Studium erst ermöglicht hat, möchte ich mich für die Unterstützung in allen Lebenslagen von Herzen bedanken.

Mein größter Dank gilt meiner Freundin Christine.