

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

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

Immunhistochemische Untersuchungen zur Rolle des oxidativen Stresses bei knöchernen Kieferaugmentationen im Schafmodell

Inaugural – Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Jörg Siebers

aus Nordhorn

Würzburg, Oktober 2010

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

Korreferent: Prof. Dr. rer. nat. J. Groll

Dekan: Prof. Dr. med. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 14.03.2011

Der Promovend ist Zahnarzt

In Liebe und Dankbarkeit meiner Familie gewidmet...

...für alles was Sie mir ermöglicht hat.

Abkürzungen:

AGEs	advanced glycation end-products
AK	Antikörper
AKT	Proteinkinase B
Aqua dest.	destilliertes Wasser
BAD	Bcl-2/BCL-XL-associated death promotor
BG	Bindegewebe
BLCs	Bone Lining Cells
BMPs	Bone Morphogenic Proteins
BSA	Rinderalbumin
bzw.	beziehungsweise
COX	Cyclooxygenase-Aktivität
DAB	Diaminobenzidin
EGF	epidermal growth factor
eNOS	endotheliale NOS
ERK1/2	extrazellulär regulierten Kinasen 1 und 2
FAK	focal adhesion kinase
FGF	fibroblast growth factors
FGF-1	fibroblast growth factor
GPCR	G-Protein-gekoppelte Rezeptoren
GPO	Glutathionperoxidase
GSH	Glutathion in reduzierter Form
GSSG	Glutathion in oxidiert Form
HCl	Salzsäure
Hsp	Hitzeschockproteine
IGF	Insulin-like growth factors
iNOS	induzierbare NOS
JNK	c-Jun N-terminalen Kinasen
KEM	Knochenersatzmaterial
MAPK	mitogen-aktivierte Proteinkinasen
MAPKK	MAPK Kinase
MAPKKK	MAPK Kinase Kinase
NAC	N-Acetylcystein
NaCl	Kochsalz
nNOS	neuronale NOS
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	NO-Synthasen
OB	Osteoblasten
OK	Osteoklasten
OZ	Osteozyten
pAKT	aktivierte PKB
PBS	Phosphat buffered Saline/Phosphatpuffer
PDK	phosphoinositide dependent kinase
pERK	aktivierte ERK
PGH2-Synthase	Prostaglandin H2-Synthase
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase

PKB	Proteinkinase B
PN	Peroxyinitrit
Prx	Peroxyredoxine
PTEN/MMAC1	phosphatase and tensin homologue/mutated in multiple advanced cancers
Raf	rapid accelerating fibrosarcoma
Ras	rapid accelerating sarcoma
RNS	reactive nitrogen species
RONs	reactive oxygen and nitrogen species
ROS	reactive oxygen species
RTK	Rezeptortyrosinkinase
s.c.	subkutan
SF	Schraubenfixation
SOD	Superoxiddismutase
TBS	Tris-buffered Saline
TGF- β	transforming growth factor
UK	Unterkiefer
VEGF	vascular endothelial growth factor
vgl.	vergleiche

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Prinzipien der Knochenbildung im Defektareal	1
1.1.1 Osteogenität.....	2
1.1.2 Osteoinduktion	2
1.1.3 Osteokonduktion.....	2
1.1.4 Kallusdistraktion.....	3
1.1.5 Guided Bone Regeneration.....	3
1.2 Knochenbildung, Knochenheilung und Remodeling	4
1.3 Funktionelle Adaptation des Knochengewebes.....	6
1.4 Funktion von Endost und Periost	6
1.5 Knochenersatzmaterialien	7
1.5.1 Knochenersatzmaterialien xenogener Herkunft	7
1.5.2 Autologer Knochen	8
1.6 Das Transplantatlager	9
1.7 Oxidativer Stress	10
1.7.1 Freie Radikale.....	12
1.7.2 Antioxidantien und Schutzenzyme.....	14
1.8 Biomarker für oxidativen Stress.....	18
1.8.1 pERK.....	19
1.8.2 pAKT.....	21
1.8.3 Nitrotyrosin.....	25
1.8.4 8-Isoprostan	26
1.9 Zielsetzung der Arbeit	27
2 Material und Methoden	29
2.1 Material.....	29
2.1.1 Geräte.....	29
2.1.2 Verbrauchsmittel	29

2.1.3 Chemikalien.....	30
2.1.3.1 Ansatz von TBS.....	30
2.1.3.2 Ansatz von Phosphatpuffer.....	31
2.1.3.3 Ansatz der DAB Lösung	31
2.1.4 Antikörper.....	31
2.2 Methoden.....	32
2.2.1 Vorausgegangene Untersuchungen	32
2.2.1.1 Versuchstiere und Methode.....	32
2.2.1.2 Anästhesie der Schafe.....	32
2.2.1.3 Gewinnung von kortikospongösem Beckenkamm.....	33
2.2.1.4 Knochentransplantation auf den lateralen Unterkiefer.....	33
2.2.1.5 Konditionierungen des Transplantatlagers	34
2.2.1.6 Euthanasie der Schafe.....	37
2.2.1.7 Fixation der Präparate.....	38
2.2.1.8 Knochenprobenentkalkung und histologischer Schnitt	38
2.2.2 Färbung von Paraffinschnitten	39
2.2.3 Arbeiten mit dem Mikroskop	40
2.2.4 Gesichtsfelder	40
2.2.5 Mikroskopieren der Präparate	41
2.2.6 Auswertung und statistische Analyse.....	45
3 Ergebnisse	48
3.1 Färbungsintensität von Osteozyten, Osteoblasten und Osteoklasten	48
3.1.1 Anfärbung von pERK.....	48
3.1.2 Anfärbung von pAKT.....	50
3.1.3 Anfärbung von Nitrotyrosin	52
3.1.4 Anfärbung von 8-Isoprostan.....	54
3.2 Gefäßanzahl in Bindegewebe und Knochen.....	56
3.3 Menge an Bindegewebe im Präparat.....	58
3.4 Färbungsintensität des Bindegewebes im Präparat	60
3.4.1 Anfärbung von pERK.....	60
3.4.2 Anfärbung von pAKT.....	62

3.4.3 Anfärbung von Nitrotyrosin	63
3.4.4 Anfärbung von 8-Isoprostan.....	64
4 Diskussion	67
4.1 Färbungsintensität der Knochenzellen.....	67
4.1.1 Anfärbung von pERK.....	69
4.1.2 Anfärbung von pAKT.....	70
4.1.3 Anfärbung von Nitrotyrosin	71
4.1.4 Anfärbung von 8-Isoprostan.....	72
4.1.5 Vergleich der Antikörper.....	73
4.2 Gefäßanzahl in Bindegewebe und Knochen.....	74
4.3 Menge an Bindegewebe im Präparat.....	76
4.4 Färbungsintensität des Bindegewebes im Präparat	77
5 Zusammenfassung.....	79
6 Literaturverzeichnis.....	83
7 Anhang	99

Danksagung

Lebenslauf

1 Einleitung

Ein Defizit oder der Verlust von Knochen, meist auf Grund von Traumen, Tumorentfernung, Infektionen sowie Syndrom-Operationen, stellt in der Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie ein häufiges Problem dar. Als Lastenträger und Stütze des Weichgewebes ist sein Ersatz unabdingbar, um im Anschluss eine funktionelle und ästhetische Rehabilitation zu ermöglichen. Nach wie vor ist die Verwendung autologer Knochen-
transplantate Goldstandard, da sie die einzige Methode darstellen, bei der auch die osteogenen Eigenschaften des Transplantats erhalten bleiben (157, 194).

Neben der Qualität des Transplantates sind bei der Einheilung vor allem die mechanische Stabilität im Defekt, die Defektgröße und die Qualität des Transplantatlagers sowie der umliegenden Weichteile von entscheidender Bedeutung (196).

Die Defektgröße selbst ist oft vorgegeben, da sie zumeist vom Krankheitsbild bzw. Trauma bestimmt wird. Der größte Einfluss auf die Qualität der knöchernen Rehabilitation konnte bisher durch eine adäquate Defektstabilisierung und Optimierung der Transplantatbeschaffenheit erreicht werden. Die Beeinflussung des Transplantatlagers erfolgte meist systemisch durch Gabe antiinfektöser Medikamente. Ferner ist es jedoch auch möglich, das Transplantatlager chirurgisch zu modifizieren, wodurch unter bestimmten Konditionierungen eine Atrophie verhindert bzw. verringert werden kann.

1.1 Prinzipien der Knochenbildung im Defektareal

Die Knochenheilung im Defektareal ist größenabhängig. Während kleinere Defekte spontan knöchern abheilen, ist dies bei Defekten kritischer Größe von Lokalisation, Spezies und Defektausdehnung abhängig. Bei Defekten, welche die individuelle, kritische Defektgröße überschreiten, ist keine spontane Knochenheilung zu erwarten. In diesem Fall geschieht die Reparatoren des knöchernen Defektes über den Umweg einer temporären, knorpeligen Kallusbildung, welche im späteren Heilungsverlauf durch voll belastbaren neuen, erst geflechtartigen, dann lamellären Knochen ersetzt wird. Knochen

ist letztlich zu einer „Restitutio ad integrum“, das heißt zur Ausheilung von Defekten ohne Narbenbildung, fähig (169).

Die Knochenheilung kann durch verschiedene Prinzipien erfolgen, welche im Folgenden kurz beschrieben werden:

1.1.1 Osteogenität

Der Begriff Osteogenität bezeichnet die Fähigkeit eines Materials, ohne die Anwesenheit von undifferenzierten, mesenchymalen Zellen Knochen zu produzieren. Dieses setzt somit die Anwesenheit von Osteoprogenitorzellen oder bereits differenzierter Osteoblasten vor Ort voraus, welche aus den zur Verfügung stehenden Bausteinen direkt knöcherne Strukturen herstellen können. Eine osteogene Aktivität in diesem Sinne besitzt ausschließlich das frische, vitale, autologe Knochentransplantat.

1.1.2 Osteoinduktion

Als Osteoinduktion bezeichnet man die Knochenneubildung durch Differenzierung von osteogenen Zellen aus undifferenzierten Vorläuferzellen (mesenchymale Stammzellen). Die Steuerung dieser Differenzierung geschieht durch osteoinduktive Proteine (95). Hier sind die Bone Morphogenic Proteins (BMPs), TGF- β (Transforming growth factor = transformierender Wachstumsfaktor) und IGF (Insulin-like growth factors = insulin-ähnliche Wachstumsfaktoren) zu nennen. Diese sind in der Hartsubstanz des Knochens eingelagert und wirken nach ihrer Freisetzung auf mesenchymale Vorläuferzellen in der Umgebung des Transplantates (3). Auch die Eigenschaft der Osteoinduktion finden wir in frischen, vitalen, autologen Knochentransplantaten.

1.1.3 Osteokonduktion

Als osteokonduktiv bezeichnen wir nicht nur autologe Knochentransplantate, sondern auch Knochenimplantate, mit denen bekanntlich keine vitalen Zellen übertragen werden. Hierbei handelt es sich um eine Leitschienenfunktion, an der sich

einwandernde knochenbildende Zellen orientieren, welche die Implantate/Transplantate schleichend durch neu gebildeten Knochen ersetzen. Die meisten Knochenersatzmaterialien ermöglichen eine Knochenneubildung durch Osteokonduktion.

1.1.4 Kallusdistraktion

Die Methode der Kallusdistraktion wurde erstmals von Ilizarov im Bereich der Extremitätenknochen beschrieben (72 – 74).

Nach Knochensegmentosteotomie und Einbringung eines Distraktors wird der Knochen zunächst für 7 Tage ruhig gestellt. Anschließend kann der fibrokartilaginäre Kallus, welcher sich interfragmentär gebildet hat, über eine externe Schraubvorrichtung um ca. 1 mm pro Tag mobilisiert werden. Die nutritive Versorgung erfolgt über das Periost, welches auf dem zu distrahierenden Segment belassen wurde. Nach gewünschter Distraktion wird der Kallus für 8 – 12 Wochen immobilisiert, wodurch es zu einer ungestörten Mineralisation und Knochenregeneration kommt.

In die MKG-Chirurgie wurde das Verfahren von McCarthy eingeführt (118 – 121). Heutzutage wird es hauptsächlich zur Behandlung von angeborenen kraniofazialen Fehlbildungen eingesetzt, wenn Distraktionen im Unter- oder Oberkiefer bzw. in der LeFort-II- oder LeFort-III-Ebene vorgenommen werden müssen. Allerdings kann auch der Alveolarfortsatz durch intraorale Distraktion in vertikaler Dimension vergrößert werden.

1.1.5 Guided Bone Regeneration (GBR)

Bei der so genannten „geleiteten Knochenregeneration“ wird das Transplantatlager dahingehend modifiziert, dass ein Einwachsen von schnell proliferierenden Zellen des umliegenden Weichgewebes in den abheilenden Knochendefekt durch Abschirmen des Defektes mit einer zellundurchlässigen Membran verhindert wird (17, 18, 161). Da so eine Konkurrenz von aktivierten Osteoprogenitorzellen und Weichgewebszellen ausgeschlossen ist, kann ein unerwünschtes Einwachsen von Granulationsgewebe in den Defekt nicht stattfinden. Es kommt somit schnell zur knöchernen Ausheilung des Knochendefektes.

Bei der Wahl der Membran kann man auf eine resorbierbare oder nicht-resorbierbare Membran zurückgreifen. Letztere ist stabiler, erfordert jedoch einen chirurgischen Zweiteingriff, um die Membran zu entfernen. Als Beispiel ist hier die e-PTFE-Membran zu nennen. Die resorbierbare, kollagene Bio-Gide[®] Membran verfügt über eine geringere mechanische Stabilität, erspart dem Patienten jedoch einen Zweiteingriff (62, 137).

Die GBR wird vor allem im Bereich der Oralchirurgie zur Abheilung von knöchernen Defekten unterhalb der kritischen Größe verwendet (33, 34, 82, 163).

1.2 Knochenbildung, Knochenheilung und Remodeling

Knochenbildung

Die erstmalige Bildung von Knochengewebe bezeichnet man als primäre Ossifikation. Sie läuft im Rahmen der embryonalen Entwicklung und der Frakturheilung ab. Hier wird immer Geflechtknochen gebildet. Den späteren Umbau (Remodeling) zu Lamellenknochen bezeichnet man als sekundäre Ossifikation. Bei der primären Ossifikation unterscheidet man die chondrale (indirekte) von der desmalen (direkten) Form der Knochenbildung.

Von der chondralen Osteogenese spricht man, wenn sich Mesenchymzellen zu Chondroblasten differenzieren, die zunächst ein Modell des künftigen Knochens aus hyalinem Knorpel (Primordialskelett) herstellen. Dieses Modell wird im späteren Verlauf von Knochen ersetzt. Je nachdem, an welchem Ort die Ossifikation stattfindet, spricht man von perichondraler Ossifikation (um das Knorpelmodell herum) oder von endochondraler Ossifikation (im Innern des Knorpelmodells). Bei der desmalen Osteogenese entsteht der Knochen ohne Umwege, indem sich Mesenchymzellen direkt zu Osteoblasten differenzieren (107). Das Knorpelstadium wird hierbei übersprungen (153).

Knochenheilung

Eine primäre Knochenheilung liegt vor, wenn ein lückenloser Kontakt (Frakturspalt < 200 µm) zwischen den Fragmenten besteht. Hier kommt es zu einer desmalen Ossifikation (164). Der Regelfall bei der Frakturheilung ist jedoch die sekundäre Heilung, bei der die Bildung des neuen Knochengewebes über den Umweg eines fixierenden Knorpelkallus erfolgt (169). Hier kommt es nach dem Defektdurchbau zu einer endochondralen Ossifikation (153, 154).

Einen sehr hohen Stellenwert bei der Knochenheilung hat die relative Ruhigstellung. Neben allen Bestrebungen zu gewebeschonenden Operationstechniken ist deshalb heute eine gute Reposition und eine flexible aber stabile Osteosynthese die Voraussetzung für einen komplikationslosen Umbau des zunächst aus Granulationsgewebe bestehenden Kallus in Bindegewebe (27). Große interfragmentäre Bewegungen verhindern hingegen die Entwicklung eines Brückenkallus, was in einer hypertrophen Pseudarthrose resultiert, während bei fehlendem Fragmentkontakt und zu hoher Implantatsteifigkeit, also zu starrer Fixierung, die mechanische Stimulation der Heilung ausbleibt (58). Bei fachgerechter Osteosynthese beginnt ab dem 10. Tag mit der Einlagerung von Hydroxylapatitkristallen die Mineralisation. In das von den Osteoblasten gebildete Osteoid werden nun vermehrt Calcium- und Magnesiumsalze eingelagert (169). Zeitgleich beginnt das Remodeling, wobei Osteoklasten und Osteoblasten den Geflechtknochen abbauen und durch lamellären Knochen ersetzen (s.u.). Dieser verfügt über eine hoch organisierte mineralisierte Matrix mit unterstützenden Haversschen Kanälen und ist auf die funktionelle Belastung des Knochens ausgerichtet. Gegenüber dem Geflechtknochen weist er eine deutlich höhere mechanische Belastbarkeit auf und unterteilt sich in eine kortikale, äußere Schale und ein trabekuläres, spongiöses Inneres. Die zellarme Kortikalis verleiht dem lamellären Knochen mechanische Stabilität, während die zellreiche Spongiosa mit ihrer großen Oberfläche für die biologische Aktivität des Knochens verantwortlich ist.

Remodeling

Aber auch der Lamellenknochen unterliegt zeitlebens physiologischen Umbauvorgängen, um Materialermüdungen vorzubeugen, Mikroschäden zu reparieren, sowie den Knochen auf geänderte Belastungen hin anzupassen. Hier arbeiten Osteoklasten

(Knochenresorption) und Osteoblasten (Knochenneubildung) Hand in Hand zusammen. Beim ausgewachsenen Mensch wird pro Jahr ca. 10% seiner Knochenmasse komplett umgebaut, wobei dieser Umbau in der Spongiosa deutlich schneller voranschreitet als in der Kompakta (107).

1.3 Funktionelle Adaptation des Knochengewebes

Nach dem Prinzip „Form follows Function“, welches Moss 1959 im Zusammenhang mit der „Theorie der funktionellen Matrix“ postulierte (168), versucht auch der Knochen, sich einwirkenden Druck- und Zugbelastungen stets optimal anzupassen. Diese funktionelle Adaptation geschieht durch relativ langsame, aber stetige Umbauprozesse in der Knochenmatrix und ist durch das Wolff's Gesetz (1892) geprägt (195). Dass Knochen bei mangelnder Krafterleitung an Masse verliert, zeigten Experimente in der Schwerelosigkeit (180) und bei lang andauernder Inaktivität von Individuen (100). Regelmäßige Belastung hingegen verhindert eine Knochenatrophie (179). Wird der Knochen indes überlastet, so kommt es zu einer überstürzten Ablagerung von Geflechtknochen an den periostalen Knochenoberflächen, welche der Situation bei der Frakturheilung ähnelt. Die genauen zellulären Mechanismen sind hier jedoch bisher noch nicht vollständig bekannt.

1.4 Funktion von Endost und Periost

Das Endost bedeckt sämtliche inneren Knochenoberflächen und besteht aus einer dünnen Schicht von nicht-mineralisierten Kollagenfibrillen und einer kontinuierlichen Lage von Bone Lining Cells (BLCs). Diese setzen sich aus mesenchymalen Stammzellen, Osteoprogenitorzellen, ruhenden Osteoklasten und ruhenden Osteoblasten zusammen, welche bei Bedarf aktiviert werden und (z.B. bei einer Fraktur) sofort mit dem Knochenumbau beginnen können (107).

Das Periost bedeckt die äußere Oberfläche des Knochens, ist reich vaskularisiert, innerviert und sehr schmerzempfindlich. Es besteht aus zwei Schichten: Die äußere

Faserschicht besteht aus straffem Bindegewebe und dient der Formgebung des wachsenden und regenerierenden Knochens; die innere Kambiumschicht liegt dem Knochen direkt an und ist mit den gleichen Zellen ausgestattet wie das Endost. Bei einer Fraktur reagieren die Zellen dieser inneren Schicht sehr schnell mit ihrer DNA-Synthese und Proliferation (141, 182). Wie das Endost ist auch das Periost sehr gut vaskularisiert und sorgt für eine ausreichende Ernährung der an der Defektheilung beteiligten Zellen und Gewebe. Ferner besitzt es auf Grund seiner straffen äußeren Faserschicht eine Barrierefunktion gegenüber in den Defekt einwachsendem Weichgewebe (z.B. Zahnfleischgewebe).

1.5 Knochenersatzmaterialien

Im Rahmen dieser Arbeit wurde autologer Knochen und Bio-Oss[®] als Knochenersatzmaterial (KEM) zur Augmentation (Knochenaufbau) verwendet.

KEM charakterisieren sich durch ihre Biokompatibilität, ihre Fähigkeit zur Zelladhärenz, ihre Platzhalterfunktion und ihre Fähigkeit zur Integration in das Wirtsgewebe (81, 133).

1.5.1 Knochenersatzmaterial xenogener Herkunft

Als wichtiger Vertreter xenogener KEM ist Bio-Oss[®] zu nennen. Es handelt sich hierbei um ein nicht-resorbierbares Material, welches nach der Implantation formstabil bleibt und eine osteokonduktive Wirkung bei der Knochenregeneration besitzt (167). Bei weniger als 450°C wird aus Rinderspongiosa xenogenes Hydroxylapatit gebildet, welches durch Pyrolyse von allen organischen Bestandteilen befreit wird, wobei die ursprüngliche Mineralstruktur weitgehend erhalten bleibt. Bio-Oss[®] besitzt eine der humanen Spongiosa sehr ähnliche Makro- und Mikrostruktur, die durch variable Porengrößen von mehreren hundert µm zu einer spezifischen Oberfläche von 80 m² / g führen.

Kurz zu erwähnen ist das weitaus weniger verwendete COLLOSS[®]. Hierbei handelt es sich um Kollagen Typ I zum Knochenersatz. Es stammt ebenfalls vom Rind, hat jedoch zusätzlich noch ein osteoinduktives Potential (135).

1.5.2 Autologer Knochen

Die ersten autologen Knochentransplantate wurden bereits 1820 von Walter beschrieben (39). Nachdem Axhausen 1908 den Nachweis erbrachte, dass Zellen des Periostes und des Knochenmarks im Transplantat nach der Replantation vital bleiben und zur Knochenbildung beitragen (11), avancierte das autologe Knochentransplantat zum Goldstandard. Diesen Status hat es auf Grund seiner osteogenen, osteokonduktiven und osteoinduktiven Eigenschaften bis heute behalten. Je nach Indikation kann Knochen aus der Schädelkalotte, dem Kinn, der Retromolarregion, dem Jochbeinkomplex, der Rippe, der Tibia oder dem Becken entnommen werden. Die mikrochirurgischen Operationstechniken brachten den Durchbruch für die Therapie von ausgedehnten Defekten oder ersatzschwachen Transplantatlager (76, 122, 186, 201). Über Anastomosen war so für eine sichere Vaskularisierung des Transplantates gesorgt.

Als Nachteil des autologen Knochentransplantates ist aufzuführen, dass die zusätzliche Knochenentnahme die Operationszeiten verlängert und zu einer höheren Belastung des Patienten führt, das heißt die Entnahmemorbidity wird gesteigert.

Die Langzeitprognose des Transplantates wird durch Remodeling-Prozesse bestimmt, welche wiederum hauptsächlich durch die mechanische Belastung beeinflusst werden.

Der gewonnene autologe Knochen besteht aus Kompakta und Spongiosa. Die Kompakta besitzt eine hohe mechanische Stabilität, ist zellarm und kann nur sehr langsam und nur zum Teil zu neuem Knochen umgebaut werden. Spongiöser Knochen hingegen ist poröser und aus diesem Grund nach der Transplantation von Anfang an besser vaskularisiert, was zu einem deutlich schnelleren Einbau und Umbau im neuen Transplantatlager führt (56).

Bei nicht vaskularisierten Transplantaten induziert eine Ischämie meist das Absterben der Mehrheit der zellulären Elemente. Am widerstandsfähigsten sind die mesenchymalen Stammzellen des Knochenmarks und die Vorläuferzellen der

Endothelzellen, welche deshalb beim erfolgreichen Einbau von autologen Transplantaten eine wichtige Rolle spielen (13).

1.6 Das Transplantatlager

Bereits 1908 erkannte Lexer die Relevanz der Vaskularisation des Transplantatlagers und teilte es in ein ersatzstarkes (gut vaskularisiert), ein ersatzschwaches (schlecht vaskularisiert) und ein ersatzunfähiges (gar nicht vaskularisiert) Lager ein (103). Neben der Vaskularisation ist jedoch auch die Anwesenheit und Funktionsfähigkeit von vitalen mesenchymalen Stammzellen, Osteoprogenitorzellen und endothelialen Progenitorzellen im Transplantatlager von eminenter Wichtigkeit. Zudem können Faktoren wie ausgedehnte Narben oder Operationstraumen, eine vorausgegangene Infektion oder Bestrahlung, eine Immunsuppression oder Nikotin als systemischer Faktor die Qualität des Transplantatlagers negativ beeinflussen.

Dies hat die Frage aufgeworfen, ob durch Modifikation des Transplantatlagers dessen Qualität und damit verbunden auch die Transplantateinheilung verbessert werden kann. Wie Reuther 2007 bereits zeigen konnte, ist jedoch lediglich eine Konditionierung des Transplantatlagers mit einer Bio-Gide[®] Membran und Bio-Oss[®] in der Lage, eine Atrophie in unbelasteten Augmentationsbereichen zu verhindern (157). Sämtliche anderen Konditionierungsmethoden in dieser Arbeit waren nach 4 Monaten nahezu vollständig wegresorbiert. Neuere Studien untermauern diese Ergebnisse und schreiben der oben genannten Konditionierung des Transplantatlagers sogar eine bemerkenswerte Volumenzunahme des augmentierten Knochens zu (1, 2). Der alleinige Einsatz einer Bio-Gide[®] Membran (ohne die Verwendung von Bio-Oss[®]) kann die klinische Atrophie zwar aufhalten, jedoch nicht verhindern (1).

Die Änderung des physiologischen Gleichgewichtes zwischen Knochenauf- und -abbau, welche für Knochenumbauprozesse oder –neubildungsprozesse verantwortlich sind, werden durch Hormone und Wachstumsfaktoren, wie z.B. den BMPs, reguliert (67). Es konnte bereits gezeigt werden, dass unterschiedliche Lagerungsverfahren dieses physiologische Gleichgewicht bei Knochentransplantaten verändern (98). Ebenso ist bekannt, dass für eine adäquate Vaskularisierung des Knochentransplantates

Gefäßneubildungsprozesse notwendig sind. Diese Gefäßentwicklungen werden unter anderem durch die Wachstumsfaktoren VEGF (Vascular endothelial growth factor) und TGF- β_1 gesteuert (138). Zudem haben diese Faktoren einen direkten, regulierenden Einfluss auf Osteoblasten bzw. deren Vorläuferzellen (115), so dass sie nicht nur die Angiogenese, sondern auch die Osteogenese und den Knochenumsatz fördern (176).

Die Wirkung von Zytokinen und Wachstumsfaktoren auf Osteoblasten, Osteoklasten und deren Vorläuferzellen entfalten ihre Wirkung meist durch Aktivierung von Signalkaskaden, in denen man häufig Kinasen vom Typ der AKT/PKB-Kinase und der MAP-Kinase ERK 1/2 findet, welche hier als Regulatoren von Wachstumsprozessen dienen.

Neben Stickstoffmonoxid (NO) scheinen auch die reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) in die Regulation von Osteoblasten und Osteoklasten miteinbezogen zu sein (22, 155).

Auf die MAP-Kinase ERK1/2, die AKT/PKB-Kinase sowie auf die ROS und NO wird in den folgenden Kapiteln noch näher eingegangen.

1.7 Oxidativer Stress

Die Beziehung zwischen Sauerstoff und dem aeroben Leben ist von ambivalentem Charakter (165). Ist Sauerstoff zum einen lebensnotwendig, kann es bei Abweichungen außerhalb des Normbereichs zu zellschädigenden Effekten, bis hin zum Zelltod, kommen (16). So können bei erhöhter Konzentration nicht nur das Sauerstoffradikal selbst, sondern auch die bei der unvollständigen Reduktion des Sauerstoffs entstehenden reaktiven Sauerstoffspezies (reactive oxygen species, ROS) viele Biomoleküle oxidieren und damit die Zelle schädigen (38, 173). Neben den ROS werden auch die reaktiven Stickstoffspezies (reactive nitrogen species, RNS) als Verursacher des oxidativen Schadens verantwortlich gemacht (60). Wird der Stress von RNS hervorgerufen, wird auch von nitrosativem Stress gesprochen (64). Zusammen werden sie als RONS (reactive oxygen and nitrogen species) bezeichnet. Entsteht ein Ungleichgewicht zwischen Bildung und Abbau von RONS und der antioxidativen Abwehr des aeroben Organismus, so kommt es zur unkontrollierten Oxidation (bzw. Nitrosylierung) von Biomolekülen, was man als oxidativen Stress bezeichnet (4, 61,

174). Tritt diese Oxidation ein, betrifft sie alle drei großen Klassen von Biomolekülen: Zucker (DNA), Proteine und Lipide (158). Durch RONS bedingte Oxidationsvorgänge an der DNA können Einzel- und Doppelstrangbrüche, Läsionen von Basen- oder Zuckerresten sowie die Bildung von DNA-Protein-Crosslinks induzieren (63, 146). Die oxidative Modifikation von Proteinen führt neben einer beschleunigten Proteindegradation auch zu einer Störung der Enzymfunktion (149). Bei den Lipiden beispielsweise ist die Lipidperoxidation zu nennen, welche durch ihre destruierte Wirkung die zelluläre Membranintegrität verletzt (54) (s. Abb. 1). Diese Vorgänge an DNA, Proteinen und Lipiden werden für den Alterungsprozess mitverantwortlich gemacht (77).

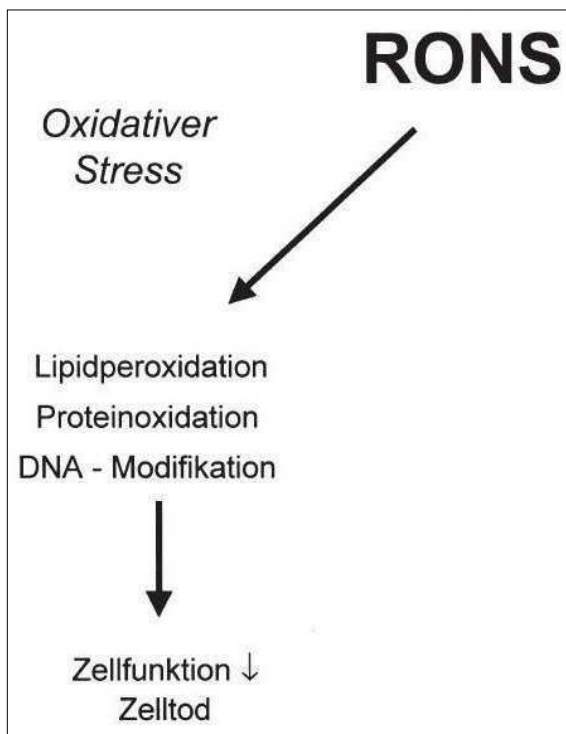


Abbildung 1 : Schematische Darstellung ausgewählter Effekte von RONS auf zellulärer Ebene (mod. nach 134); nähere Erläuterungen s. Text.

Bei der Entstehung von oxidativem Stress sind sowohl endogene wie auch exogene Faktoren von Bedeutung. Endogen entsteht oxidativer Stress meist in den Mitochondrien als Nebenprodukt der Zellatmung durch Monoaminoxidasen und im Rahmen der Atmungskette (Komplex I und III). Auch im Rahmen der Xanthinoxidase-Reaktion in den Peroxisomen entstehen durch Reduktion von Sauerstoff freie Radikale (86) (s. Abb 2). Des Weiteren sind Immunabwehr (aktivierte neutrophile Granulozyten und Monozyten), Arachidonsäure-Metabolismus, Fentonreaktion, Stickstoffmonoxidsynthese und oxidierende Enzyme (NADPH-Oxidase) aufzuführen (134). Bei den exogenen Faktoren sind Sauerstoff- sowie Nährstoffmangel und osmotische Konzentrationsabweichungen, durch Alkohol, Nikotin, Medikamente,

UV-Licht, Röntgenstrahlung und psychische sowie physische Stressfaktoren zu nennen (70).

Sowohl endogene als auch exogene Faktoren des oxidativen Stresses führen direkt oder indirekt zur Aktivierung meist derselben Signalkaskaden und Transkriptionsfaktoren. Eine Beschreibung dieser Aktivierungsmechanismen erfolgt in Kap. 1.8. Die Enzyme, aus denen die Signalkaskaden bestehen, nennen sich Proteinkinasen und aktivieren auf die Zellen wirksame Gene. Abhängig von der Dauer und der Stärke des Stresses kann es zur Proliferation, Stabilisierung oder Apoptose der Zelle kommen (156) (s. Kap. 1.8).

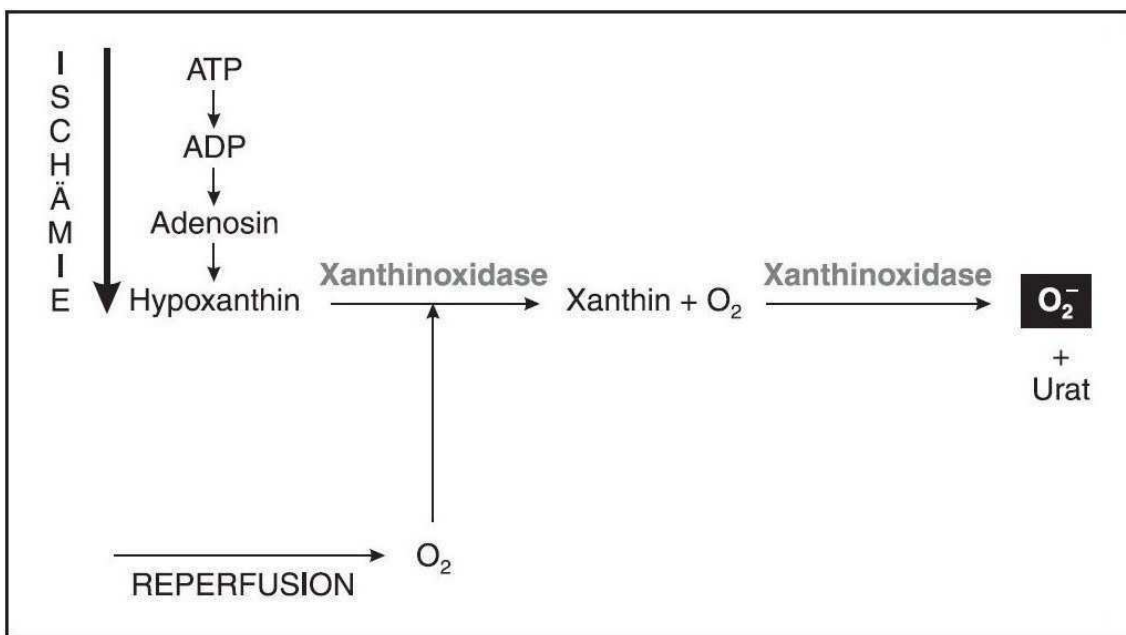


Abbildung 2: Die Xanthinoxidase-Reaktion (183). ATP: Adenosintriphosphat; ADP: Adenosindiphosphat; O₂: Sauerstoff; O₂⁻: Superoxid-Anion

1.7.1 Freie Radikale

Unter freien Radikalen versteht man instabile Atome und Moleküle, die ein oder mehrere ungepaarte Elektronen in ihrer äußeren Elektronenschale aufweisen und infolgedessen eine ausgeprägte chemische Reaktivität besitzen, welche man als oxidativen Stress bezeichnet. In Abhängigkeit ihres Zentralatoms werden die RONS in ROS und RNS unterteilt. Die chemische Reaktivität von RONS ist zwar unterschiedlich, im Allgemeinen jedoch recht hoch (59). Da die freien Radikale zur Stabilisierung schnell andere Moleküle oxidieren, indem sie diesen ein Elektron

entreißen, sind sie sehr kurzlebig (10). Die in Gang gesetzten Kettenreaktionen lassen jedoch an anderer Stelle neue Radikale entstehen.

ROS (reactive oxygen species)

Zu den ROS zählt man das Superoxid-Anion, Wasserstoffperoxid, das Hydroxyl-Radikal sowie atomaren Sauerstoff und molekularen Sauerstoff im Grundzustand.

Zum Abbau der Produkte der unvollständigen Oxidation von Sauerstoff stehen dem Organismus unter anderem die Superoxid-Dismutase, die Katalase und die Fenton-Reaktion zur Verfügung. Abb.3 zeigt die möglichen Reaktionen des Superoxid-Anions nach W. H. Koppenol (91). Ozon, Singulett-Sauerstoff und die hypochlorige Säure werden zu den nicht-radikalischen ROS gezählt.

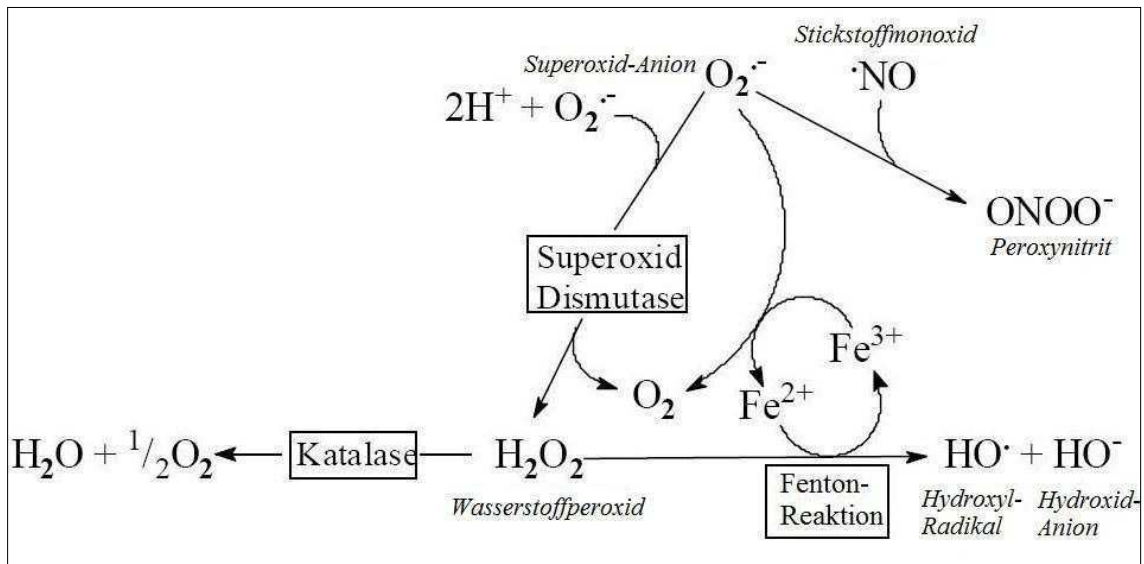


Abbildung 3: Mögliche Reaktionen des Metabolismus des Superoxid-Anions ($\text{O}_2^{\cdot-}$) (mod. nach 165).

RNS (reactiv nitrogen species)

Zu den RNS zählt man das Stickstoffmonoxid (NO), das Stickstoffdioxid und das Peroxynitrit. Reduziert oder oxidiert man NO, so entstehen die nicht radikalischen Ionen Nitroxyl-Anion und Nitrosyl-Kation (71). Peroxynitrit kann auf zwei Wegen entstehen: entweder durch Reaktion des Nitroxyl-Anions mit molekularem Sauerstoff oder durch Reaktion von Stickstoffmonoxid mit dem Superoxid-Anion (s. Abb. 3). Eine weitere Reaktion des Peroxynitrit mit Kohlenstoffdioxid führt zum Teil zu einer

Erhöhung der Reaktivität des Peroxynitrits (185), so dass es verstärkt zur Nitrierung bzw. Oxidierung von Proteinen, Aminosäuren, DNA und Lipiden kommt. Auf Grund seines hohen Redoxpotentials ist Peroxynitrit wesentlich aggressiver als seine Vorläufermoleküle und wird für eine Reihe von pathologischen Veränderungen verantwortlich gemacht (14, 42). NO wird durch drei verschiedene NO-Synthasen (NOS), aus der Aminosäure L-Arginin und Sauerstoff gebildet und ist als Radikal neben der Relaxation von Gefäßen auch an pathophysiologischen Prozessen wie der Lipid-Peroxidation beteiligt. Im Gegensatz zu den konstitutiv exprimierten neuronalen (nNOS) und endothelialen NOS (eNOS) erfolgt die Regulierung der induzierbaren NOS (iNOS) auf transkriptioneller Ebene, wodurch das einmal exprimierte iNOS-Protein weitgehend kalziumunabhängig größere Mengen an Stickstoffmonoxid bilden kann. Alle drei NOS-Isoformen konnten in Knochenzellen nachgewiesen werden, wobei besonders eNOS und nNOS für die Regulation von Osteoblasten und Osteozyten relevant sein dürften (22).

1.7.2 Antioxidantien und Schutzenzyme

Da die Bildung von freien Radikalen unvermeidbar ist, besitzen Organismen ein antioxidatives Abwehrsystem, um Oxidationsschäden einzudämmen. Entscheidend ist die Balance zwischen den Oxidantien und Antioxidantien (16, 29) (s. Abb. 6). Im Prinzip funktionieren diese Schutzmechanismen nach ein und demselben Prinzip: Sie besitzen eine chemische Affinität zu freien Radikalen und entschärfen diese durch Übertragung eines Elektrons.

Die Einteilung der Antioxidantien erfolgt in enzymatische und nicht-enzymatische, wobei letztere weiter in alimentäre und endogene Antioxidantien unterschieden werden. Enzymatische Antioxidantien bezeichnet man auch als endogene antioxidative Schutzsysteme (147). Abb. 4 zeigt eine schematische Darstellung des antioxidativen Abwehrsystems (16).

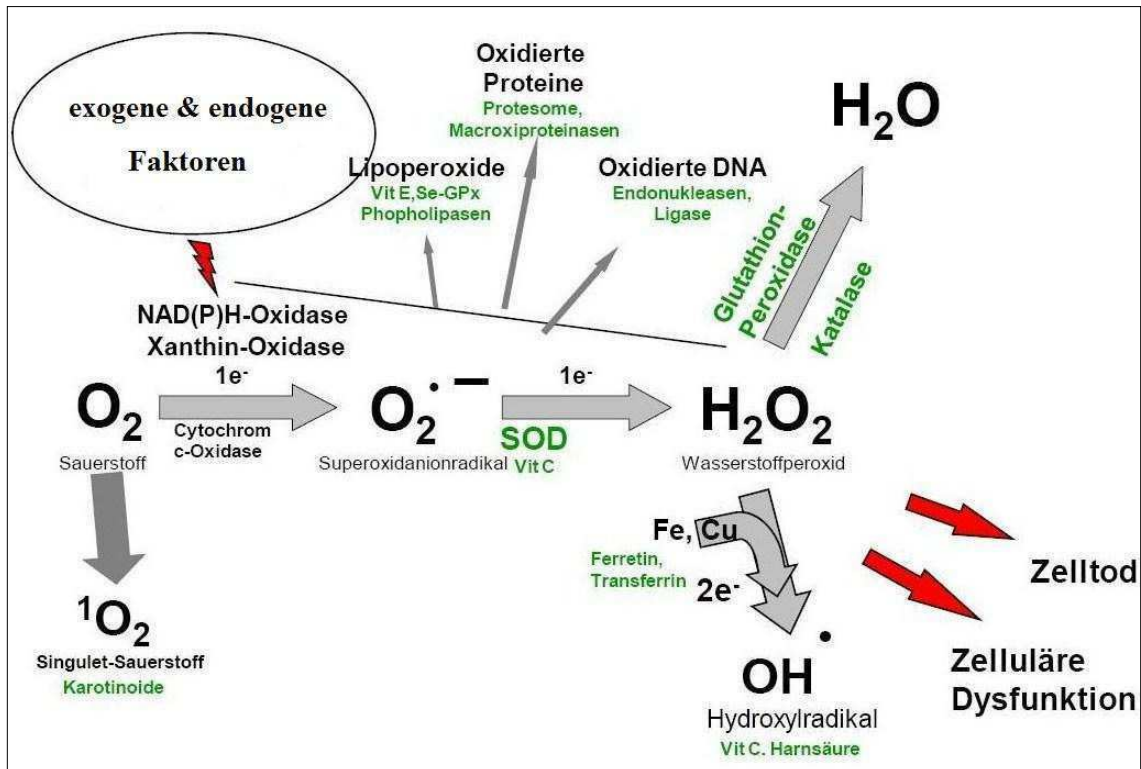


Abbildung 4: Schematische Darstellung: Bildung freier Radikale mit antioxidativem Abwehrsystem (mod. nach 16). Grün: antioxidative Mechanismen; SOD: Superoxiddismutase

Alimentäre Antioxidantien

Bei Antioxidantien, die mit der Nahrung zugeführt werden, handelt es sich meistens um die Vitamine A, C und E. Ascorbinsäure (Vitamin C) ist wasserlöslich, fungiert als dominanter alimentärer Radikalfänger im Plasma und Interstitium und hilft vor allem beim Recyceln von zellulären Antioxidantien (51). Die Tocopherole (hauptsächlich α -Tocopherol, Vitamin E) gelten in der Lipidphase biologischer Systeme als die wichtigsten Antioxidantien, da sie Lipide vor der Peroxidation durch Radikale schützen (124).

Des Weiteren können in Nahrungsmitteln Inhaltsstoffe, wie Anthocyane (Delphinidin, Malvidin, Cyanidin), Proanthocyanidine, Isoflavone (z.B. in Soja), monomere Flavonole, Flavonole (Quercetin), Phenolsäuren, Stilbene-Derivate (Resveratrol; z.B. in Rotwein) und Picoline (Methylpyridinium; z.B. in Kaffee) gefunden werden. Diese Nahrungsinhaltsstoffe haben eine effektive Scavengerfunktion (Fängerfunktion) gegenüber RONS und wirken damit bei entsprechender Dosis ebenfalls antioxidativ (96).

Die adäquate Verabreichung von essentiellen Antioxidantien wird bei erhöhtem oxidativen Stress (z.B. bei Krankheiten, Alterungsprozessen etc.) empfohlen, obwohl die therapeutische Wirkung noch umstritten ist (189).

Endogene Antioxidantien

Bei den körpereigenen Antioxidantien sind Harnsäure, Coeruloplasmin, Metallothionein, Ferritin, Transferrin, Laktoferrin, Katecholamine, Bilirubin und Quinonderivate in reduzierter Form aufzuführen (9).

Ferritin, Transferrin, Coeruloplasmin und Metallothionein wirken präventiv gegen oxidativen Stress, indem sie reaktive Übergangsmetallionen wie Kupfer und Eisen inaktivieren (16).

Endogene antioxidative Schutzsysteme

Zu den antioxidativen Enzymen gehören die Superoxiddismutase (SOD), die Katalase, die Glutathionperoxidase (GPO), Peroxyredoxine; bedingt auch Hitzeschockproteine und die Thioredoxinreduktase.

Letztere ist neben der Rückumwandlung des Ascobyl-Radikals in Ascorbinsäure an dem Abbau von Lipidperoxiden und Wasserstoffperoxid beteiligt.

Das Metalloprotein SOD ist in den Mitochondrien und im Zytosol vorhanden, katalysiert die Reaktion von Superoxid-Anionen und Protonen zu Wasserstoffperoxid und bildet damit die primäre Verteidigungslinie gegen oxidativen Stress (78). Das Wasserstoffperoxid kann im Folgenden durch die Katalase zu Wasser und Sauerstoff detoxifiziert werden, was die Grundlage einer Fenton-Reaktion unterminiert (s. Abb 3). Damit konkurriert die SOD mit Stickstoffmonoxid um das Superoxid-Anion und verringert die Peroxynitrit-Bildung. Die GPO katalysiert ebenfalls die Reduktion von Wasserstoffperoxid und steuert damit zur Elimination von Lipidperoxiden bei. Sie ist jedoch selenabhängig und neben Wasser kann auch Alkohol entstehen. Zudem wird hier Glutathion in reduzierter Form (GSH) als Elektronendonator benötigt. Durch diese Elektronenabgabe wird GSH in seine oxidierte Form (GSSG) überführt (48). Der Recyclingprozess zu GSH läuft über die Glutathionreduktase unter Anwesenheit von NADPH oder NADH als reduzierendes Agens ab. Da N-Acetylcystein (NAC) eine wichtige Komponente des Glutathions zur Verfügung stellt, kann dieses nach

Substitution den oxidativen Stress im Organismus verringern (23, 83). Das Tripeptid GSH ist eines der wichtigsten zellulären Antioxidantien, da es nicht nur ein essentielles Substrat für die GPO darstellt, sondern darüber hinaus direkt mit ROS reagieren kann und eine zentrale Rolle bei der Genexpression von pro- und antiinflammatorischen Proteinen spielt (16). Abb. 5 zeigt eine Übersicht über das SOD-System.

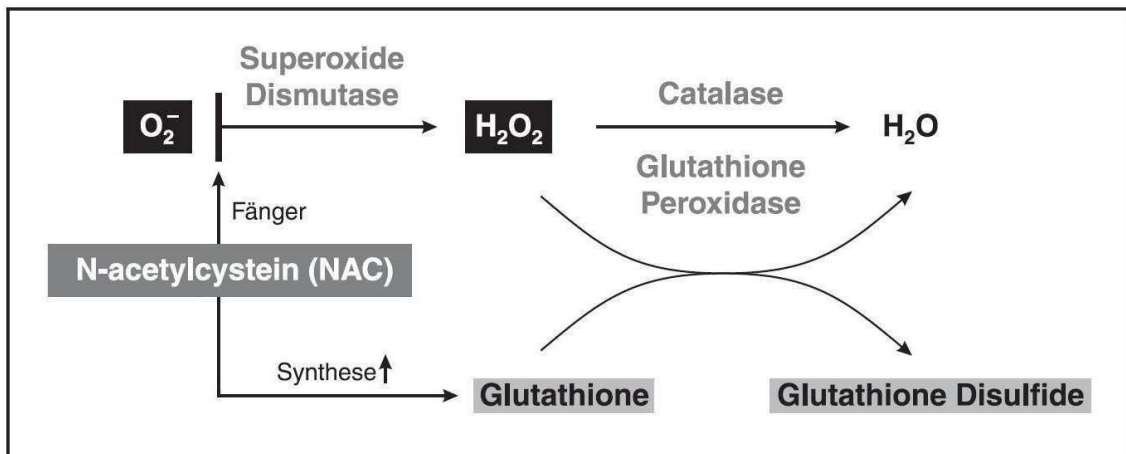


Abbildung 5: Endogene Antioxidantien, Bedeutung des Glutathions und Angriffspunkte von N-Acetylcystein (183). O_2^- : Superoxid-Anion; H_2O_2 : Wasserstoffperoxid; H_2O : Wasser

Peroxyredoxine (Prx) gehören in die Gruppe der Peroxidasen. Sie reduzieren Peroxide bei gleichzeitiger Oxidation eines Kosubstrats. Prx sind jedoch gleichzeitig Peroxidase als auch Kosubstrat und üben eine Schutzfunktion aus, indem sie Wasserstoffperoxid gezielt zur Oxidation von Cystein verwenden. Da die Leistungsfähigkeit im Vergleich zu Katalase und GPO deutlich kleiner ist, scheinen Prx vorwiegend in Stresssituationen von Bedeutung zu sein (16). Ferner scheint ein hohes Vorkommen an Prx die Apoptose zu inhibieren und die Zellproliferation zu induzieren (75).

Hitzeschockproteine (HSP) sind eigentlich keine antioxidativen Enzyme, sondern dienen vielmehr als Schutzmoleküle im Sinne ihrer Chaperonfunktion, welche für die korrekte Faltung von Proteinen vor allem unter Extrembedingungen (z.B. Hitze) verantwortlich ist. Sie weisen jedoch auch einen protektiven Effekt gegenüber dem Einfluss von RONS auf. So wird bei oxidativem Stress durch die Expression von HSP25 und HSP27 die zelluläre Verfügbarkeit von GSH gesteigert (148). Zudem wird durch HSP32, auch Hämoxygenase-1 genannt, die Synthese von Ferritin induziert (188) und der Abbau von Häm zu Bilirubin katalysiert (109).

Abb. 6 veranschaulicht noch einmal schematisch die Balance zwischen oxidativem Stress und antioxidativer Verteidigung.

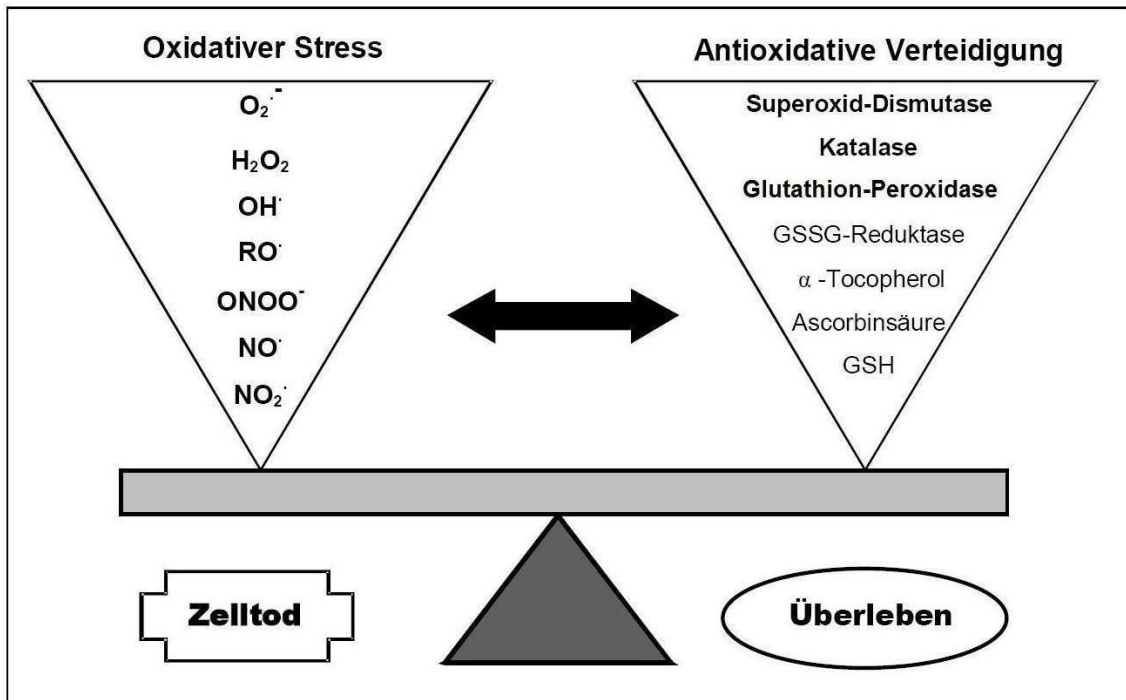


Abbildung 6: Gleichgewicht zwischen oxidativem Stress und antioxidativer Verteidigung. Durch erhöhte RONS-Bildung bzw. ungenügender antioxidativer Verteidigung kommt es zum Ungleichgewicht und in diesem Fall zum oxidativem Stress, der die Zellen schädigt (mod. nach 52).

1.8 Biomarker für oxidativen Stress

Auf Grund der extremen Reaktionsfreudigkeit und der sehr kurzen Halbwertszeit von freien Radikalen ist ein direkter Nachweis von RONS nicht möglich (41, 87). Es besteht jedoch die Möglichkeit, den oxidativen Status indirekt durch Messung von speziellen, stabilen Abbauprodukten zu beurteilen. Im Folgenden werden die einzelnen Stressmarker (Abbauprodukte), die im Rahmen dieser Arbeit immunhistochemisch angefärbt wurden, vorgestellt.

1.8.1 pERK

Proliferation, Differenzierung, Stress-Adaptation, Apoptose und zelluläres Überleben werden intrazellulär über die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, den Zellzyklus oder apoptotische Prozesse gesteuert, welche wiederum von der Aktivierung von verschiedenen Signalwegen reguliert werden (66). Zu diesen Signalwegen zählen durch extrazelluläre Signale regulierte Kaskaden aus Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK). Hierbei handelt es sich um Serin/Threonin-Kinasen, die in drei große Familien unterteilt werden: Die extrazellulär regulierten Kinasen 1 und 2 (ERK1/2 = ERK), die c-Jun N-terminalen Kinasen (JNK) und die p38 Kinasen (112). Die Signalwege, die zur Aktivierung der MAPK führen, umfassen zwei weitere Kinasen, die den MAPK vorangestellt sind. Dabei handelt es sich um die MAPK Kinase (MAPKK), welche MAPK aktiviert und die MAPK Kinase Kinase (MAPKKK), die wiederum MAPKK aktiviert (88). Die Aktivierung erfolgt über eine doppelte Phosphorylierung an Threonin- und Tyrosinresten (65). Als Trigger des initialen Phosphorylierungsvorgangs agieren Wachstumsfaktoren, Hormone, oxidativer Stress (ROS), Zytokine Azidose, vasoaktive Peptide, osmotischer Schock, Ischämie, Hypoxie, Strahlung (Gamma- oder UV-Strahlung), mechanischer Stress und Tumorpromotoren wie Phorbolster (57, 134, 160). Abb. 7 veranschaulicht die Signaltransduktion der MAPK und die Benennung der jeweiligen Kinasen bzw. GTPasen.

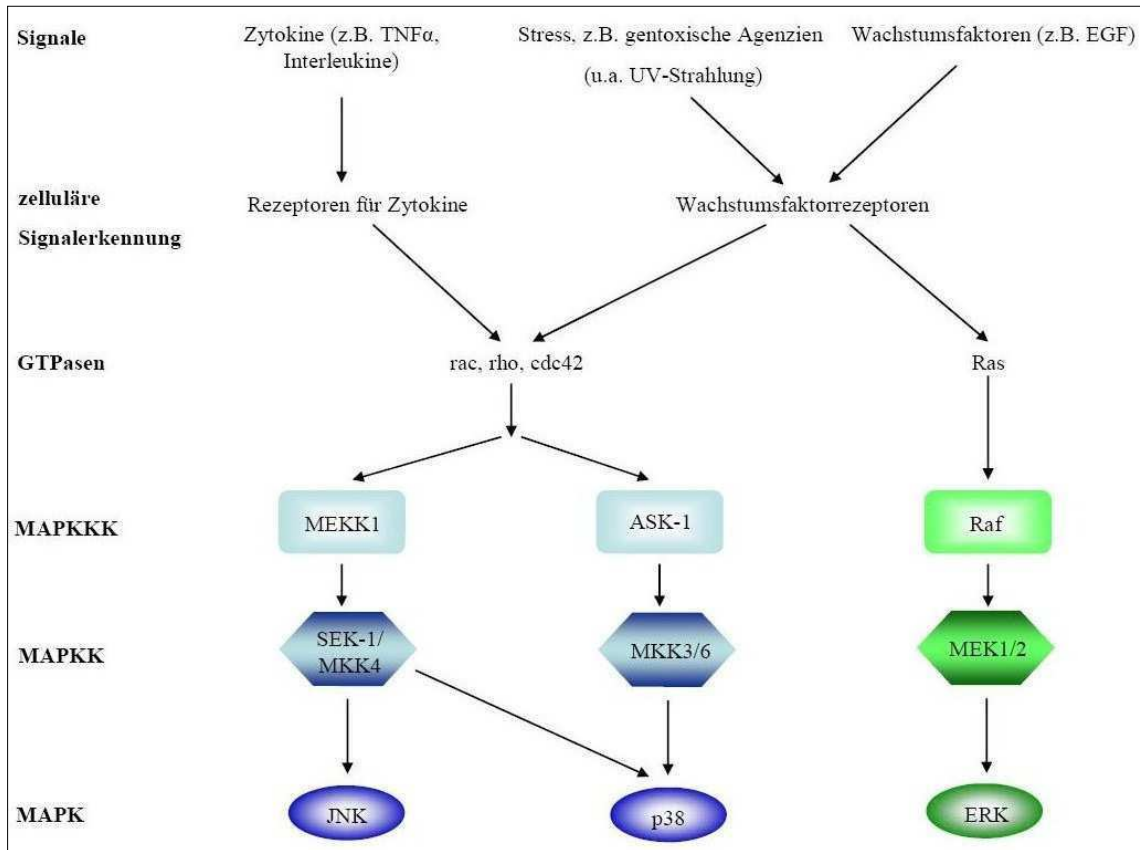
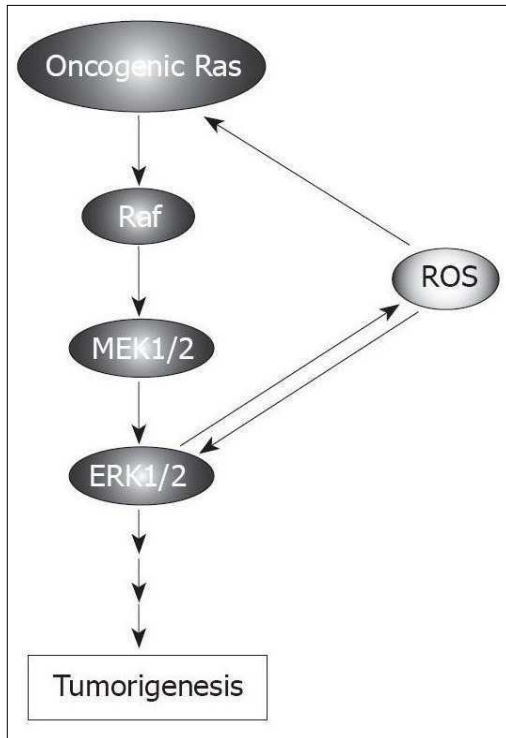


Abbildung 7: Schematische Darstellung der MAPK-Signaltransduktionskaskade (57). EGF: Epidermaler Wachstumsfaktor („epidermal growth factor“); ERK: Extrazellulär-regulierte Kinase; JNK: c-Jun-N-terminale Kinase; MAPK: Mitogen-aktivierte Proteinkinase; MAPKK: Mitogen-aktivierte Proteinkinase-Kinase; MAPKKK: Mitogen-aktivierte Proteinkinase-Kinase-Kinase; MKK: MAPK/ERK-Kinase; Raf: Ras-aktivierter Faktor; Ras: Rat Sarkoma; RTK: Rezeptortyrosinkinase; TNF α : Tumor-Nekrosefaktor α

Die hauptsächliche Aktivierung von ERK erfolgt durch Wachstums- (EGF = epidermal growth factor) und Differenzierungsfaktoren, was zur Aktivierung von Rezeptortyrosinkinasen (RTK) und dadurch zur Aktivierung des Rezeptors, z.B. dem EGF-Rezeptor, führt (166). Dadurch wird über die GTPase Ras (rapid accelerating sarcoma) die MAPKKK Raf (rapid accelerating fibrosarcoma) phosphoryliert, welche nachfolgend MAPKK MEK1/2 aktiviert, die wiederum MAPK ERK durch Phosphorylierung des Threonins 202 und des Tyrosins 204 aktiviert (= pERK). Dies hat den ca. 1000-fachen Anstieg der enzymatischen Aktivität von ERK zur Folge (193), da pERK nun in den Zellkern wandern kann. Dort entfaltet pERK durch Stimulation der Nukleotidsynthese, Phosphorylierung von Translations- und Transkriptionsfaktoren sowie VEGF-Expression (vascular endothelial growth factor) seine mitogenen Effekte.

Neben dem RTK-Aktivierungsweg kann ERK auch über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren aktiviert werden. Damit ist ERK nicht nur durch Wachstumsfaktoren und Hormone, sondern auch durch Peptide, Neurotransmitter oder biogene Amine aktivierbar. Weitere Aktivierungsmöglichkeiten stellen Vitamin K₃ (Menadion), UV-Licht und Phorbol ester dar. Neben diesen klassischen Rezeptor-vermittelten Wegen



stellt oxidativer Stress mit seinen freien Radikalen Wasserstoffperoxid und Peroxynitrit einen weiteren Aktivierungsweg dar. Nach neuesten Studien nimmt ROS dabei eine Sonderstellung ein, da es nicht nur Ras aktiviert, sondern auch in direkter Interaktion mit ERK steht (s. Abb. 8).

Abbildung 8: Rolle von ROS im Ras-Raf-MEK-ERK-Signalweg (mod. nach 142).

Je nach Dauer und Stärke der ERK-Aktivierung werden viele zelluläre Vorgänge wie Proliferation, Differenzierung, Migration oder Zelltod moduliert. Neben seiner mitogenen Wirkung weist pERK auch apoptotische und eine antiapoptotische Wirkungskomponente auf (89, 152, 160).

1.8.2 pAKT

Die Serin/Threonin-Kinase AKT wird auch Proteinkinase B (PKB) genannt, ist maßgeblich an der Regulation von Zellproliferation und Apoptose beteiligt (28) und wird zumeist über den PI3K-Signalweg (Phosphoinositid-3-Kinase), welcher nicht zu den MAPK-Kaskaden gehört, aktiviert. Ähnlich wie der ERK-Signalweg, wird auch die PI3K mittels RTK über Wachstumsfaktorrezeptoren (EGF-Rezeptor oder GFR) und G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR) aktiviert (vgl. Abb. 12). Die PI3K katalysiert die Phosphorylierung membranständiger Phosphatidylinositol-Lipide ($\text{PIP}_2 \rightarrow \text{PIP}_3$), welche nun AKT binden und somit an die Zellmembran transportiert. Dort kann die

PDK (phosphoinositide dependent kinase 1 & 2) AKT an zwei Domänen phosphorylieren (Tyrosin 308 und Serin 473) und damit aktivieren (= pAKT) (57, 88, 89, 160) (s. Abb. 9).

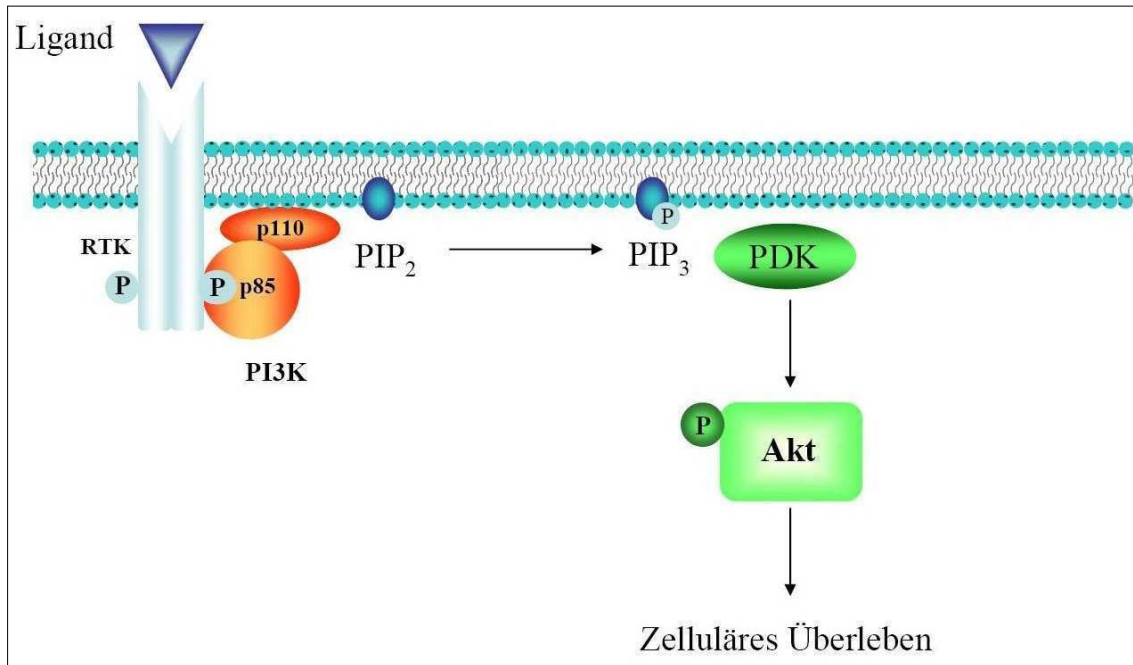


Abbildung 9: Signalkaskade, die zur Aktivierung von AKT führt (57). Erläuterungen im Text. PI: Phosphatidylinositol; PI3K: Phosphoinositid-3-Kinase; p85: Regulatorische Untereinheit der PI3K; p110: Katalytische Untereinheit der PI3K; PDK: PI-dependent kinase (PI-abhängige Kinase); PIP₂: Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat; PIP₃: Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat; RTK: Rezeptortyrosinkinase

Neben der Aktivierung durch RTK und GPCR kann AKT auch noch durch Stressstimuli, wie Hitzeschock, Hypoxie, UV- und γ -Strahlung und oxidativen Stress (z.B. Wasserstoffperoxid), aktiviert werden (26, 30, 37, 90, 170). So sorgt z.B. Wasserstoffperoxid für eine stressbedingte Phosphorylierung von FAK (focal adhesion kinase), welche nun an PI3K bindet, die dann wiederum AKT phosphoryliert (166). Ebenfalls durch die Aktivierung von Wasserstoffperoxid hat FAK zudem Zugang zum MAPK-Signalweg und kann somit auch ERK aktivieren (s. Abb. 10).

Die einzige bisher beschriebene Hemmung der AKT-Aktivität findet durch eine Phospholipid-Phosphatase statt, welche das Produkt von PTEN/MMAC1 (phosphatase and tensin homologue/mutated in multiple advanced cancers) darstellt (108, 130).

AKT reguliert fundamental wichtige zelluläre Funktionen wie beispielsweise Zellwachstum, Zellüberleben, Glukosehaushalt und die Proteinsynthese. Ein weiterer Effekt der AKT-Stimulierung ist die Aktivierung von eNOS. Diese produziert NO, welches als „second-messenger“-Molekül Blutdruckänderungen und Angiogenese vermittelt (166). Neben proliferativen Eigenschaften verfügt AKT über stark anti-apoptotische Eigenschaften, indem sie zum Beispiel durch Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren der „forkhead“-Familie die Expression apoptotischer Proteine inhibiert. Über die Phosphorylierung und Inaktivierung von BAD (Bcl-2/BCL-XL-associated death promotor) und Caspase 9 werden weitere Apoptosesignalwege inhibiert (57, 89, 160). Eine Übersicht über die stimulierenden bzw. hemmenden Wirkungen von PI3K und AKT geben Abb. 10 und 11.

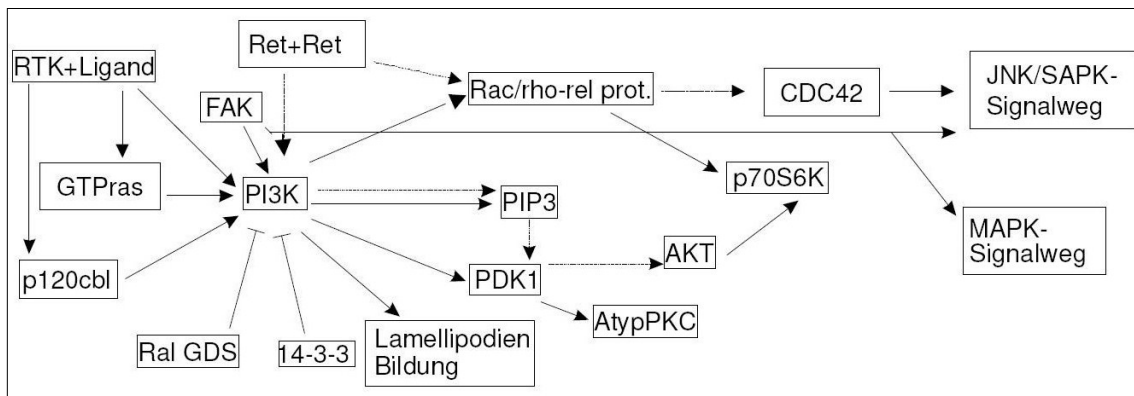


Abbildung 10: PI3K-Signalweg mit schematischer Stimulierung (Pfeil) bzw. Hemmung (Strich) der nachfolgenden Komponente (166). PI3K: Phosphoinositid-3-Kinase

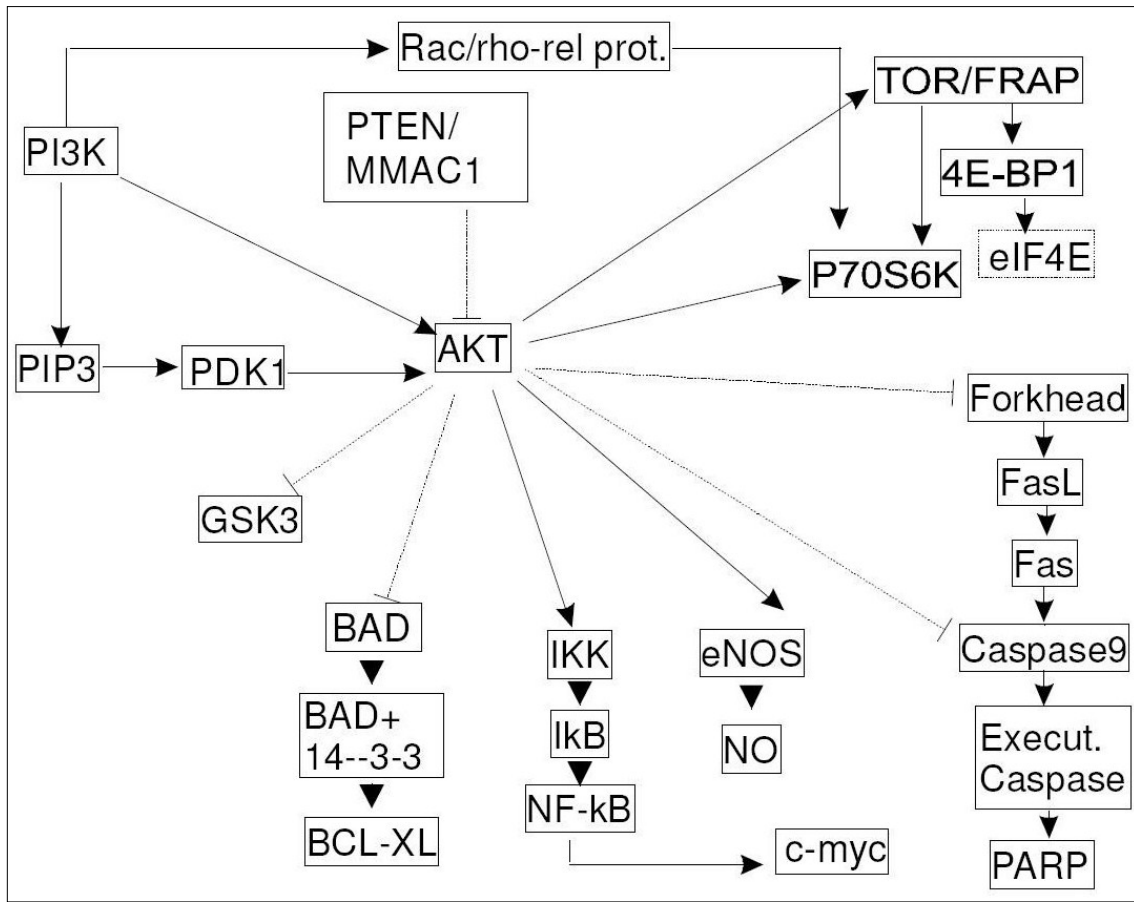


Abbildung 11: Der PKB/AKT-Signalweg mit schematischer Stimulierung (Pfeil) bzw. Hemmung (Strich) der nachfolgenden Komponente (166). PKB: Proteinkinase B

Somit bildet der PI3K/AKT-Signalweg gemeinsam mit dem MAPK/ERK-Signalweg ein kompliziertes Signalnetzwerk, das sowohl Proliferation als auch Apoptose maßgeblich beeinflussen kann. Dabei wirkt ERK meist proliferativ und apoptotisch, während AKT meist proliferative und anti-apoptische Eigenschaften vermittelt (s. Abb. 12).

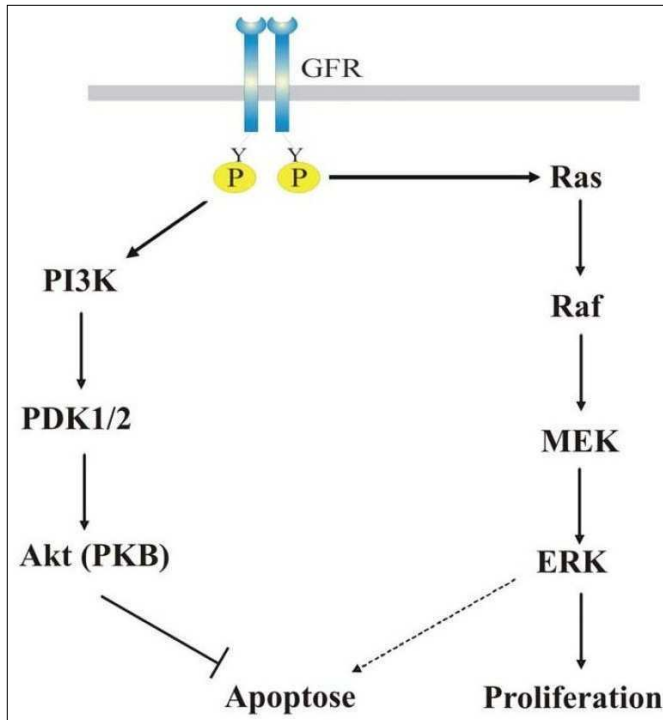


Abbildung 12: Schematische Darstellung der GFR-Signalkaskade, die zur Aktivierung von AKT und ERK führt (89). GFR: Wachstumsfaktor-rezeptor (growth factor receptor); PI3K: Phosphoinositid-3-Kinase; PDK1/2: Phosphoinositid-abhängige Kinase 1 und 2 (phosphoinositid-dependent kinase 1 and 2); PKB: Proteinkinase B; MEK: MAPK/ERK-Kinase; ERK: Extrazellulär-regulierte Kinasen

1.8.3 Nitrotyrosin

Nitrotyrosin wird durch die Reaktion von Peroxynitrit und in Proteinen vorkommenden Tyrosin-Resten gebildet (s. Abb. 13). Abb. 14 zeigt die Reaktion von Peroxynitrit und Tyrosin. Die entstandenen stabilen, nitrotyrosinylierten Proteine können als 3-Nitrotyrosin mit Hilfe spezifischer monoklonaler oder polyklonaler Anti-Nitrotyrosin-Antikörper immunhistochemisch nachgewiesen werden. Da die Nitrierung von Tyrosin die Beteiligung von RNS (in diesem Falle Peroxynitrit) einschließt, ist 3-Nitrotyrosin als Biomarker des nitrosativen Stresses und der oxidativen Proteinschädigung anzusehen (165). Neben zahlreichen Erkrankungen wird auch nach Transplantation und bei entzündlichen Prozessen über die Nitrierung von Tyrosin-Resten berichtet (175, 171).

Die Möglichkeit der enzymatischen Bildung von Nitrotyrosin durch die Eosinophilenperoxidase und die Myelperoxidase wird diskutiert (177).

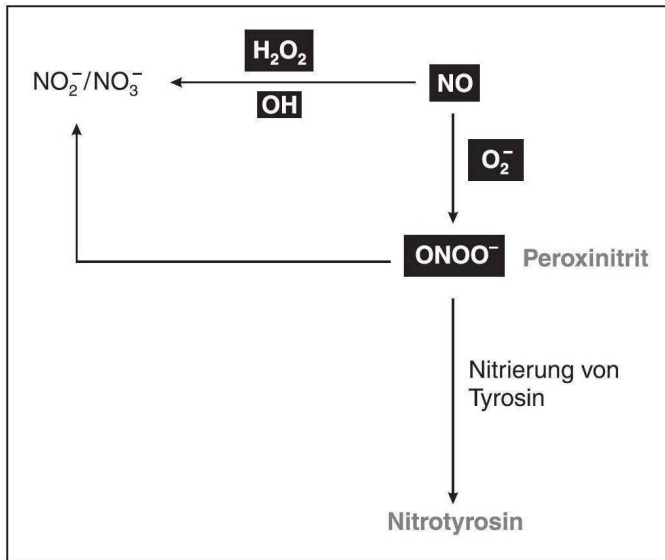


Abbildung 13: Chemische Reaktionen des Stickstoffmonoxids (183). NO: Stickstoffmonoxid; H_2O_2 : Wasserstoffperoxid; OH: Hydroxyl-Radikal; NO_2^- : Nitrit; NO_3^- : Nitrat; O_2^- : Superoxid-Anion; ONOO^- : Peroxynitrit

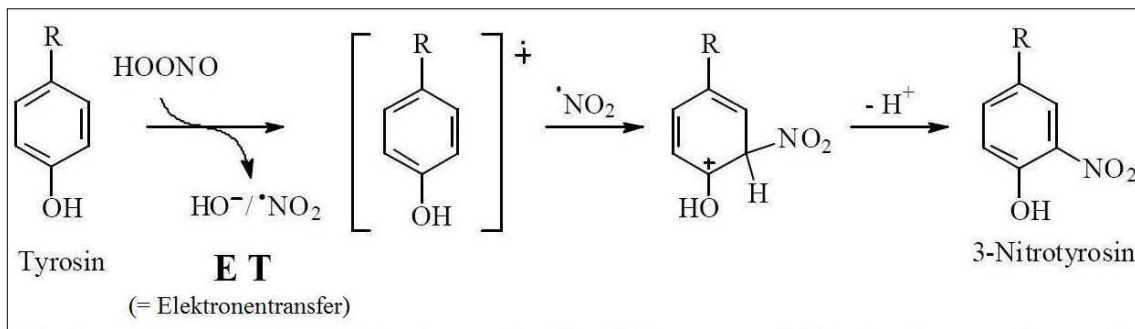


Abbildung 14: Ein möglicher Mechanismus für die Bildung von 3-Nitrotyrosin aus Peroxynitrit und Tyrosin (mod. nach 165).

1.8.4 8-Isoprostan

Die Abkürzung 8-Isoprostan steht für 8-iso-Prostaglandin- $\text{F}_2\alpha$ oder Isoprostan 8-epi-Prostaglandin- $\text{F}_2\alpha$. Die Isoprostane sind stabile Regio- und Stereoisomere der Prostaglandine und werden als Folge einer durch freie Radikale katalysierten Lipid-Peroxidation gebildet (99, 104, 127). Dabei werden primär Prostaglandin- F_2 -ähnliche Verbindungen, auch F_2 -Isoprostane genannt, gebildet, welche als nicht-enzymatische Spaltprodukte der membranständigen Arachidonsäure entstehen (126). Die zur Familie der Prostaglandinisomere gehörenden F_2 -Isoprostane setzen sich aus vier Regioisomeren zusammen, wovon 8-Isoprostan als erstes identifiziert wurde (113, 128).

Außerdem ist eine enzymatische Bildung von 8-Isoprostan als Nebenprodukt durch die Cyclooxygenase-Aktivität (COX) der Prostaglandin H₂-Synthase (PGH₂-Synthase) möglich. Durch bestimmte Medikamente, so genannte COX-Hemmer, kann die Cyclooxygenase-Aktivität gestoppt und damit die enzymatische Bildung von 8-Isoprostan unterbunden werden (165). Der Anteil an den durch freie Radikale gebildeten Isoprostanen ist jedoch gering.

Abb. 15 veranschaulicht die Entstehung von 8-Isoprostan.

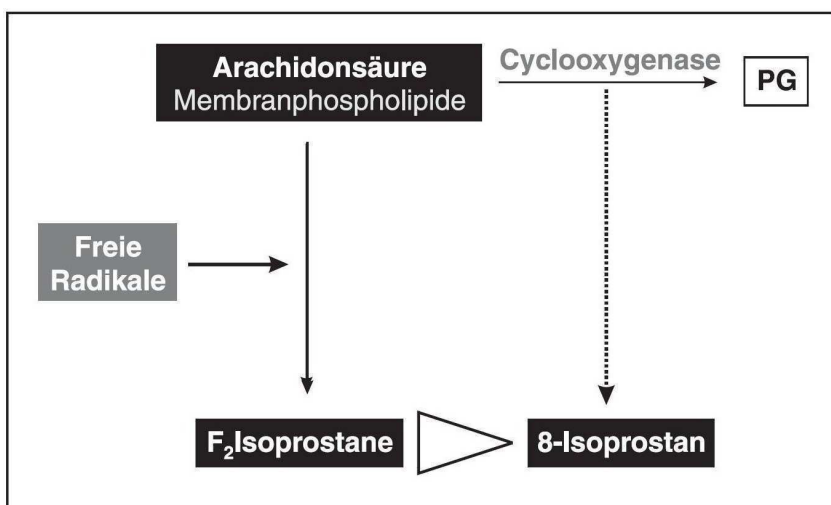


Abbildung 15: 8-Isoprostan (8-iso-Prostaglandin-F₂ α) (183). PG: Prostaglandine

8-Isoprostan kann wegen seiner biologischen Stabilität in Flüssigkeiten (127), seiner spezifischen Entstehung im Rahmen der Lipid-Peroxidation (106, 114) und seines ubiquitären Vorkommen im Organismus als ein sehr spezifischer und stabiler Parameter des oxidativen Stresses gewertet werden (101). Es ist somit ein Marker für ROS und RNS, da beide zu Lipid-Peroxidation beitragen. Zudem ist 8-Isoprostan biologisch aktiv, indem es z.B. als hochpotenter Vasokonstriktor arterieller Blutgefäße und als Antagonist der Blutplättchenaggregation fungiert (92, 93, 105, 129, 191).

1.9 Zielsetzung der Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Studie war es, den oxidativen Stress, einschließlich der Veränderung von nachgeschalteten Signalmolekülen, nach Augmentation von autologem Knochen im Bereich des lateralen Unterkiefers am Schafmodell zu

verschiedenen Zeitpunkten und zu verschiedenen Konditionierungen des Transplantatlagers anhand vier verschiedener Antikörper (AK) immunhistochemisch zu bestimmen. Klinisch hat zu diesem Versuch bereits eine Auswertung stattgefunden, die in dieser Arbeit nun noch auf zellulärer Ebene, immunhistochemisch, nachuntersucht werden soll. Da sich die Auswirkungen des oxidativen Stresses über den MAPK-Weg bzw. den PKB-Signalweg manifestieren können, wurde die Aktivierung dieser Signalwege mittels AK gegen pERK und pAKT überprüft. Bei Nitrotyrosin und 8-Isoprostan handelt es sich um stabile Folgeprodukte von freien Radikalen. Sie dienen somit als direkte Biomarker von oxidativem Stress und wurden ebenfalls mit entsprechenden AK immunhistochemisch angefärbt.

Des Weiteren wurden die Gefäßanzahl in Bindegewebe und Knochen sowie die Anfärbung und Menge des Bindegewebes im Augmentationsbereich in Abhängigkeit von den gleichen Parametern wie oben beschrieben verglichen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Folgende Geräte wurden für diese Arbeit verwendet:

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

2.1.2 Verbrauchsmittel

Folgende Verbrauchsmittel wurden für diese Arbeit verwendet:

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 [®])	Greiner

Pasteurpipetten aus Glas	Brand
Einmal-Pasteurpipetten aus PE, 3 ml	Hartenstein
Verschlussfolie (Parafilm [®])	American National Can (Hartenstein)

2.1.3 Chemikalien

Folgende Chemikalien wurden für diese Arbeit verwendet:

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
Entellan	Merck

2.1.3.1 Ansatz von 0,05 M TBS (Tris-buffered Saline), 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 (PBS) 0,1 M, pH 7,4

Der PBS 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 DAB-Entwicklung zum Aliquotieren:

DAB	5000 mg in 100 ml Aqua dest.
NH_4Cl	4000 mg in 100 ml Aqua dest.
$\text{NiSO}_4 \times 6 \text{H}_2\text{O}$	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 PBS (pH 7,4) werden 150 μl DAB-Lösung (= 7,5 mg), 150 μl NH_4Cl (= 6 mg), 300 μl NiSO_4 (= 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

Es wurde mit den Antikörpern Anti-Phospho-ERK (pERK), Anti-Phospho-Akt1/PKB α (pAKT), Anti-Nitrotyrosine (Nitrotyrosin) und Anti-8-epi-PGF (8-Isoprostan) gearbeitet. Nähere Informationen finden sich in Tab. 1.

Tabelle 1: Auflistung der verwendeten Antikörper.

AK	Spezies	Anti-Spezies	Lagerung	Firma	Verdünnung (mit TBS)	DAB-Einwirkzeit
<i>pERK</i>	Ziege	Maus	- 20°C	Sigma	1 : 400	30 min
<i>pAKT</i>	Kaninchen	Human	- 20°C	Upstate	1 : 500	20 min
<i>Nitrotyrosin</i>	Kaninchen	Alle	+ 4°C	Chemicon	1 : 500	15 min
<i>Isoprostan</i>	Ziege		- 80°C	NatuTec	1 : 1500	10 min

2.2 Methoden

2.2.1 Vorausgegangene Untersuchungen

Die vorliegende Studie wurde im Schaf-Tiermodell durchgeführt. Die Operationen an den Schafen erfolgten bereits im Vorfeld durch Prof. Dr. Dr. A. Kübler und PD Dr. Dr. T. Reuther.

2.2.1.1 Versuchstiere und Methode

Für die Versuchsreihe wurden 16 erwachsene weibliche Schafe (\emptyset -Gewicht $73,6 \pm 8,6$ kg) auf 4 Gruppen für 4 Euthanasiezeitpunkte mit jeweils 4 Tieren randomisiert. Die Opferung der Schafe fand nach 4, 8, 12 und 16 Wochen statt. Vor und nach Durchführung des chirurgisch-experimentellen Eingriffs wurden die Tiere unter standardisierten Laborbedingungen gehalten, veterinärmedizinisch überwacht und hatten freien Zugang zu Nahrung. Sowohl die zuständige Ethikkommission als auch die zuständige Bezirksregierung (Antragsnummer 50.203.2 K43, 36/01) genehmigten die Tierversuche.

2.2.1.2 Anästhesie der Schafe

Die Vollnarkose wurde mit 2% Propofol eingeleitet. Nach Intubation wurde die Anästhesie mit Isofluran, Sauerstoff, Propofol 2% und Midazolam aufrechterhalten.

Prophylaktisch wurde peri- und postoperativ (für 3 Tage) mit Penicillin s.c. abgeschirmt. Zur Schmerzreduktion wurde postoperativ bis zum dritten Tag ein Analgetikum s.c. (Rimadyl) verabreicht. Durch schrittweise Reduzierung des Propofol wurde die Anästhesie beendet. Sämtliche operativen Maßnahmen wurden unter aseptischen Bedingungen vorgenommen.

2.2.1.3 Gewinnung von kortikospongiösem Beckenspan

Die Entnahme des autologen, kortikospongiösen Beckenspanes erfolgte mit einer oszillierenden Sticksäge unter dauernder Kochsalzkühlung. So wurde ein bikortikales Knochenstück der Größe 2,0 x 2,0 x 1,5 cm gewonnen, welches komplett von Periostanteilen befreit und bis zu seiner weiteren Verwendung in einem sterilen, mit Kochsalz getränkten, Tupfer aufbewahrt wurde. Der Wundverschluss der Entnahmestelle erfolgte vierschichtig mit Vicryl und anschließendem Sprühverband.

2.2.1.4 Knochentransplantation auf den lateralen Unterkiefer

Vorbereitung des OP-Feldes durch Rasur im Bereich des horizontalen Unterkieferastes der Schafe mit anschließender Desinfizierung (Cutasept[®] F). Darstellung der gesamten Länge des Unterkiefers (von der Eckzahnregion bis kurz vor den M. masseter) nach vorheriger Inzision entlang des Unterkieferbasalrandes, Blutstillung und schichtweiser Aufpräparation bis zur lateralen Fläche des Unterkiefers (UKs). Die nun frei gelegte laterale UK-Fläche stellte das Transplantatlager dar. Zuvor wurde jedoch noch das bereits gewonnene bikortikale Knochenstück aus dem Beckenkamm unter Wasserkühlung mit der Sticksäge in 4-6 gleich große monokortikale Knochenstücke geteilt. Diese wurden nun, zu verschiedenen Konditionierungen des Transplantatlagers, mittels zweier Titan-Mikroschrauben (10 mm lang, 1,5 mm breit) auf den lateralen UK der Schafe fixiert. Dabei wurden die monokortikalen Späne spongiosaseitig auf die Kortikalis des Transplantatlagers aufgebracht. Der anschließende Wundverschluss erfolgte zweischichtig mit Vicryl mit anschließendem Sprühverband.

2.2.1.5 Konditionierungen des Transplantatlagers

Folgende Konditionierungen des Transplantatlagers wurden gewählt:

Konditionierung I

Kortikospongiosa + Schraubenfixation (SF): Spongiosaseitige Fixierung des monokortikalen Beckenspanns mittels Titan-Mikroschrauben auf dem lateralen UK der Schafe (s. Abb. 16)

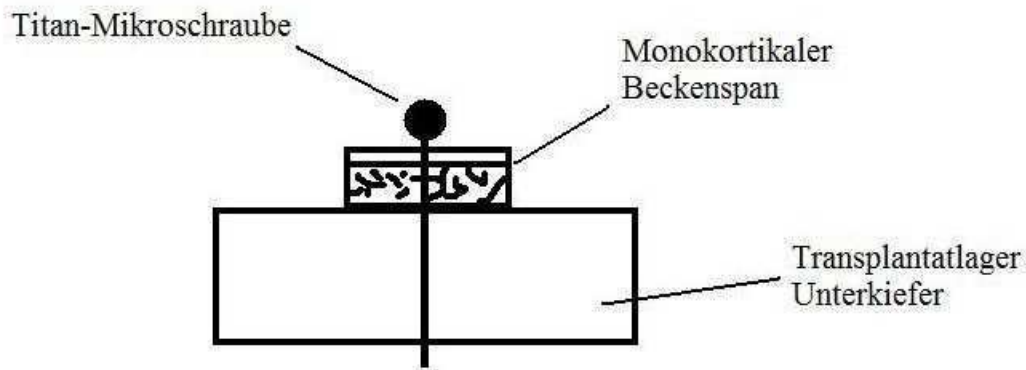


Abbildung 16: Schematische Darstellung von Konditionierung I (Kortikospongiosa + Schraubenfixation).

Konditionierung II

Perforation des Transplantatlagers + SF: Eröffnung der Spongiosaräume an 8-10 Stellen des Transplantatlagers mittels Perforation der Außenkortikalis des UKs durch einen Rosenbohrer. Anschließende spongiosaseitige Fixation des monokortikalen Beckenspanns mittels Titan-Mikroschrauben auf dem lateralen UK der Schafe (s. Abb. 17).

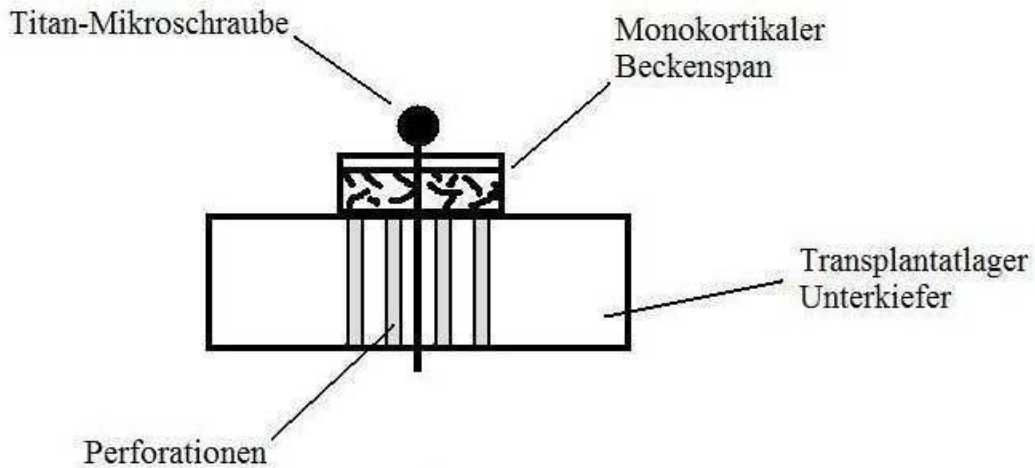


Abbildung 17: Schematische Darstellung von Konditionierung II (Perforation des Transplantatlagers + Schraubenfixation).

Konditionierung III

SF + Periostexzision: Nach herkömmlicher Schraubenfixation des Transplantates im UK wurde das bedeckende Periost exzidiert. Eine Perforation der Kortikalis erfolgte nicht (s. Abb. 18).

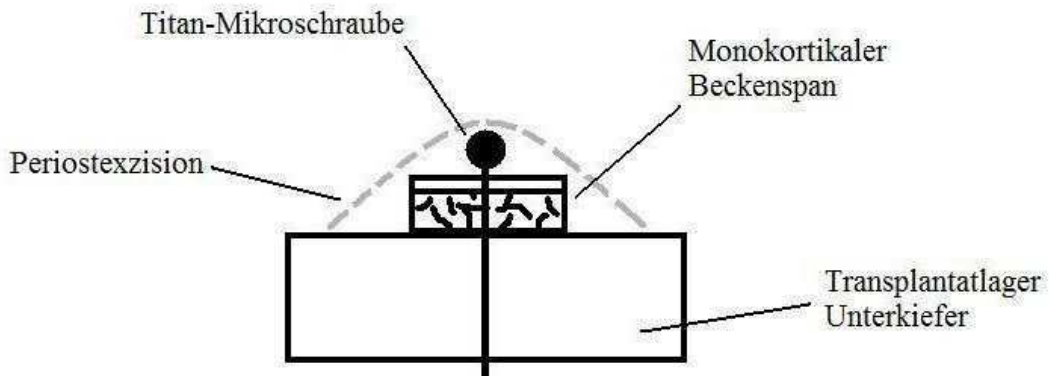


Abbildung 18: Schematische Darstellung von Konditionierung III (Schraubenfixation + Periostexzision).

Konditionierung IV

SF + Membran: Periostverstärkung durch eine direkte Abdeckung des Transplantates mit einer resorbierbaren Kollagen-Membran (Bio-Gide®). Fixierung der Membran

mittels 4-6 Mikroschrauben. Das Transplantat wurde somit vom umliegenden Gewebe isoliert (s. Abb. 19).

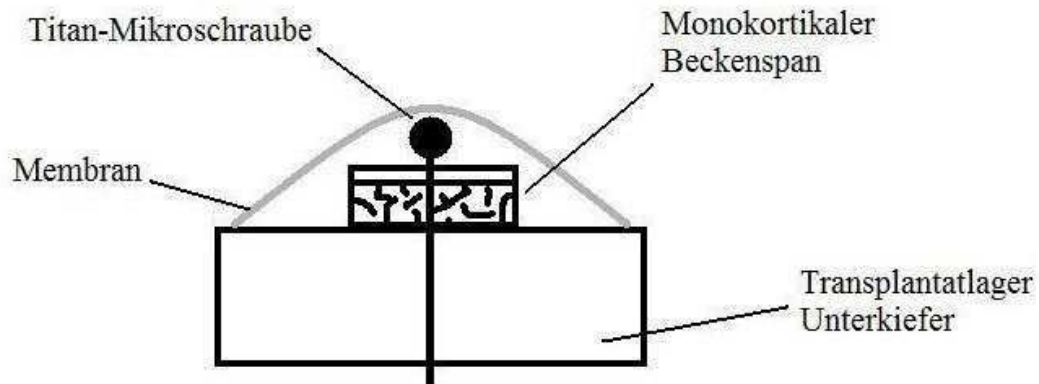


Abbildung 19: Schematische Darstellung von Konditionierung IV (Schraubenfixation + Membran).

Konditionierung V

SF + Bio-Oss[®] + Membran: Gleiche Vorgehensweise wie bei Konditionierung IV; nur, dass der Raum zwischen Augmentat und Bio-Gide[®] Membran mit Bio-Oss[®] Spongiosa Granulat der Größe 0,25 – 1,0 mm aufgefüllt wurde (s. Abb. 20).

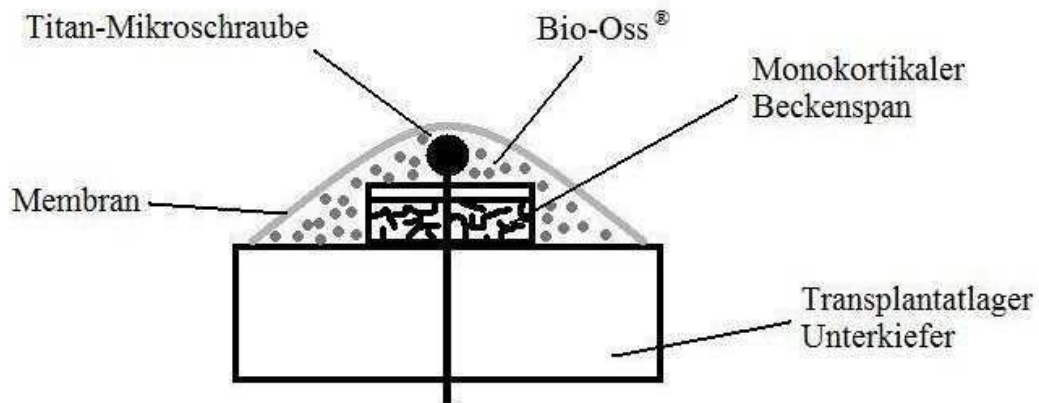


Abbildung 20: Schematische Darstellung von Konditionierung V (Schraubenfixation + Bio-Oss[®] + Membran).

Konditionierung VI

Sperre + SF: Applikation einer undurchlässigen Silikonmembran zwischen Transplantatlager und monokortikalem Augmentat, um beide von einander zu separieren (s. Abb. 21).

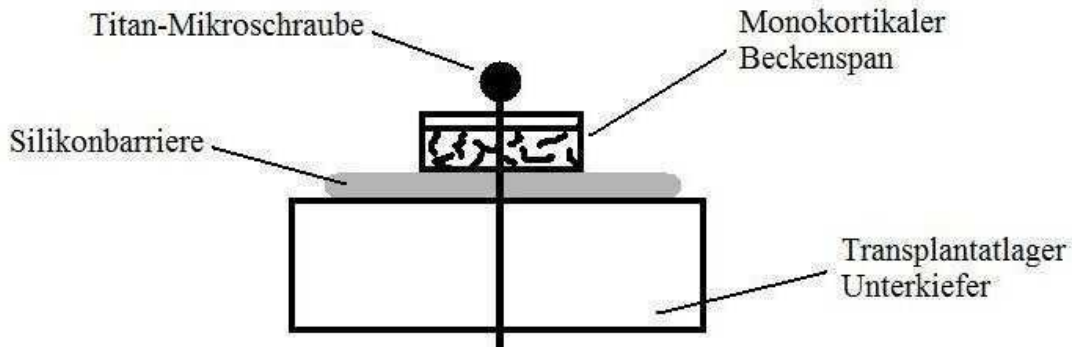


Abbildung 21: Schematische Darstellung von Konditionierung VI (Sperre + Schraubenfixation).

Die Augmentationen wurden jeweils auf beiden Seiten des lateralen UKs mit einem Abstand von ca. 1 cm durchgeführt. Konnte dieser Abstand nicht eingehalten werden, so wurden pro Seite anstatt drei lediglich zwei monokortikale Beckenspäne transplantiert.

Die sechs verschiedenen Konditionierungen des Transplantatlagers wurden möglichst gleichmäßig auf die Versuchsgruppen verteilt, so dass zu den verschiedenen Einheilzeitpunkten (4, 8, 12 und 16 Wochen) für jede Fragestellung nach Möglichkeit 3 Proben vorlagen und ausgewertet werden konnten. Um Variationen bei der Operationstechnik zu vermeiden, wurden alle Eingriffe vom selben Operateur vorgenommen, anhand des gleichen Protokolls ausgeführt und fotodokumentarisch festgehalten.

2.2.1.6 Euthanasie der Schafe

Nach ihren jeweiligen Einheilzeitpunkten (4, 8, 12 und 16 Wochen) wurde bei den Schafen mittels Propofol 2% eine Narkose eingeleitet und die Tiere mit einer Überdosis

Narcoren (40 ml) euthanasiert. Um eine Blutkoagulation zu verhindern, wurde den Schafen zudem 7 ml Liquemin[®] N 25000 (= 37.500 I.E.) i.v. verabreicht.

2.2.1.7 Fixation der Präparate

Eine Fixation der Präparate war auf Grund der Größe der Proben und der teils sehr dichten Knochenstruktur nur durch Perfusion und anschließende Immersion zu gewährleisten.

Deshalb wurden den Schafen unmittelbar nach ihrer Tötung beidseits kleinlumige Katheter in die A. carotis communis und die V. jugularis interna inseriert. Nach Abtrennung des Schädels vom Rumpf wurde dieser solange mit Kochsalzlösung (NaCl 0,9%; 3 Liter) gespült bis über die V. jugularis interna ein klarsichtiger Rückfluss zu erkennen war. Im Anschluss erfolgte die Perfusionsfixation des gesamten Schädels mit Paraformaldehyd (pH 7,4; 2 Liter) in 0,1% PBS. Nun konnte, nach Präparation des UKs mit dem Skalpell, die Gewinnung der Proben durch Osteotomie erfolgen. Während dieses Vorganges wurde stets auf eine sorgfältige Kühlung mit NaCl 0,9% geachtet. Im Anschluss wurden die Proben in der Mitte in zwei gleich große Stücke geteilt. Die in dieser wissenschaftlichen Arbeit untersuchten Hälften der Proben wurden für 2 Tage in 4%igem Paraformaldehyd (PFA) in 0,1% PBS immersionsnachfixiert. Die anderen Hälften wurde mit 4%igem Formalin immersionsfixiert, bevor sie für verschiedene Auswertungsprozesse zur Verfügung standen (157).

2.2.1.8 Knochenprobenentkalkung und histologischer Schnitt

Die Entkalkung der PFA-fixierten Probenhälften wurde mit EDTA durchgeführt. Diese Behandlung dauerte ca. 3-4 Wochen.

Zur weiteren Entkalkung wurde 10%ige Ameisensäure verwendet. Zur Beendigung des Entkalkungsprozesses war hier, abhängig vom Probenvolumen, ein Zeitraum von 4-5 Wochen notwendig.

Die anschließende Entwässerung der Proben erfolgte durch Immersion in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%, 96% und 100%) für jeweils 2 min und durch Immersion in Xylol für 5 min. Als nächstes wurden die Proben in reproduzierbarer

Positionierung in Paraffin eingebettet. Von den entkalkten Gewebsblöcken konnten nun, mit Hilfe eines Mikrotoms (Leica RM 2255), Schnitte von 10 µm Schichtdicke angefertigt und anschließend auf gläserne Objektträger aufgezogen werden.

2.2.2 Färbung von Paraffinschnitten

Der verwendete Puffer ist 0,5 M TBS; alle Schritte erfolgten bei Raumtemperatur (25°C).

Zunächst wurden die Präparate in einer absteigenden Alkoholreihe „bewässert“, damit die Färbung bzw. AK-Lösungen aufgenommen werden können. Dazu wurden sie erst 20 min in Xylol gewässert und anschließend nacheinander jeweils für 5 min in 100%, 96% und 70% Ethanol gegeben.

Danach wurden die Präparate dreimal für 5 min mit dem Puffer TBS (0,5 M) gewaschen. Da eine nicht blockierte endogene Peroxidase zu einem falsch positiven Ergebnis führen würde, wurden die Präparate 2 x 10 min mit 3% H₂O₂ in Methanol getränkt. Im Anschluss wurde wieder 2 x 5 min mit TBS gewaschen. Nun wurde für 10 min eine Lösung von 0,5 M Ammoniumchlorid + 0,25% Triton X-100 in TBS auf die Präparate gegeben. Dabei sorgt das Triton X-100 für eine Permeabilisierung der Zellen; das heißt die Membranen der Zellen wurden in diesem Schritt permeabilisiert, was das Eindringen der AK in die Zellen erleichtert. Zudem werden durch das Ammoniumchlorid die Aldehydvernetzungen aufgelöst und somit das Gewebe maskiert. Es erfolgte eine weitere Spülung mit TBS für 2 x 5 min. Im nächsten Schritt wurde für 60 min 5%iges BSA (Rinderalbumin) in TBS auf die Präparate gegeben. Ziel dieses Schrittes war die Besetzung von unspezifischen Bindungsstellen mit dem Protein. Diese Bindungsstellen waren nun blockiert und konnten nicht mehr vom primären (= 1.) AK gebunden werden. Die Inkubation mit dem 1. AK (Verdünnung mit TBS s. Tab. 1) wurde über Nacht bei 4°C durchgeführt. In diesem Schritt bindet der AK spezifisch gegen das Antigen, welches später nachgewiesen werden soll. Am nächsten Tag wurden die Präparate zuerst 4 x 5 min mit TBS gewaschen. Anschließend erfolgte für 60 min die Inkubation mit dem sekundären (= 2.) AK (Verdünnung mit TBS s. Tab. 1) gegen die Spezies, aus der auch der 1. AK stammt. Danach erfolgte wieder eine TBS-Waschung für 4 x 5 min. Nun erfolgte 60 min lang die Markierung des 2. AK durch die

Inkubation mit dem Horseradish Peroxidasekomplex. Dieser lag in einer Verdünnung von 1:150 in TBS vor. Der 2. AK konnte jetzt durch eine Entwicklungsmethode, in diesem Fall mittels DAB, nachgewiesen werden. Zuvor wurde jedoch noch einmal für 4 x 5 min mit TBS gewaschen. Zur DAB-Entwicklung wurde nun die filtrierte DAB-Lösung auf die Schnitte aufgetragen. Die AK-spezifische DAB-Einwirkzeit ist Tab. 1 zu entnehmen. Durch Abnahme der DAB-Lösung und sofortiges Auftragen von TBS wurde die Entwicklung gestoppt. Auch das TBS wurde sofort wieder abgesaugt. Es folgte eine Waschung mit TBS für 3 x 5 min.

Nachdem der eigentliche Färbevorgang nun abgeschlossen war, wurden die Schnitte wieder entwässert. Dies geschah mit einer aufsteigenden Alkoholreihe, wobei die Präparate nacheinander für jeweils 5 min in 70%, 96% und 100% Ethanol getränkt wurden. Durch eine 10-minütige Wässerung in Xylol wurden die Schnitte mit Entellan eingedeckt.

2.2.3 Arbeiten mit dem Mikroskop

Für die Auszählung/Auswertung einer AK-Reihe wurde immer mit den gleichen Vergrößerungen und Lichteinstellungen am Mikroskop gearbeitet, damit ein Vergleich der einzelnen Präparate möglich war. Insbesondere die die Kondensatoreinstellungen waren konstant.

2.2.4 Gesichtsfelder

Bei sämtlichen Aufnahmen mit der Digitalkamera wurde mit den gleichen Einstellungen und stets ohne Blitz gearbeitet. Zuerst wurden jeweils Übersichtsaufnahmen von der AK-Färbung und der Kontrolle des Präparates bei 16-facher Vergrößerung gemacht. Im Folgenden wurden fünf verschiedene Gesichtsfelder definiert und diese bei 200-facher Vergrößerung mehrmals abfotografiert (s. Abb. 22 – 24): Bereich 1 bezeichnet das Transplantatlager, bestehend aus der Kompakta des UKs. Bei Bereich 2 handelt es sich um die mediane Übergangszone vom Augmentat zum Transplantatlager. Bereich 3 stellt den spongiös-knöchernen Anteil des Augmentates dar. Beim lateralen Übergang vom Transplantat zum Transplantatlager handelt es sich

um Bereich 4. Schließlich wurde als 5. Bereich noch der kortikale Anteil des Augmentates abfotografiert.

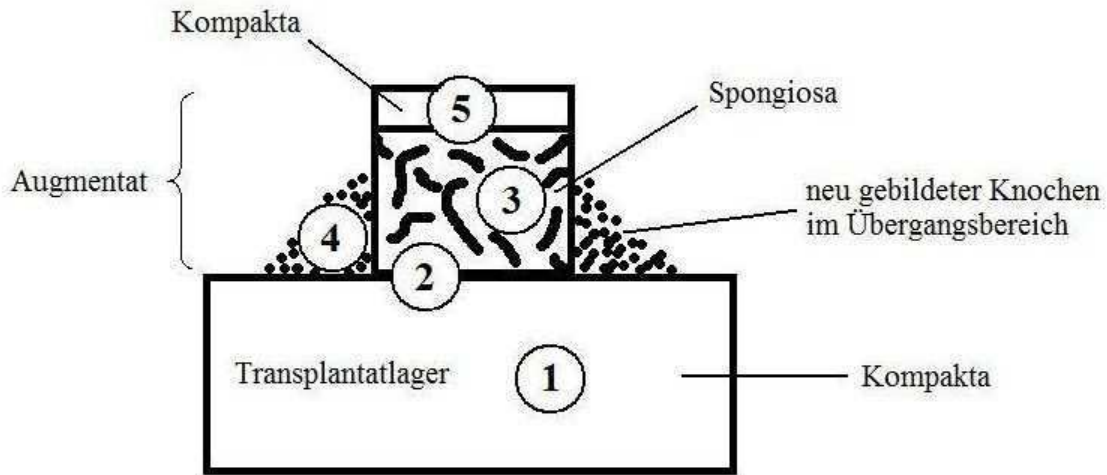


Abbildung 22: Schematische Darstellung der Bereiche 1-5. Beschreibung siehe Text.

2.2.5 Mikroskopieren der Präparate

Auf den abfotografierten Bildern wurden zuerst die Übersichtsaufnahmen verglichen. In der Regel war zu sehen, dass die AK-Färbung intensiver gefärbt war als der Kontrollschnitt (vgl. Abb. 23 und 24).



Abbildung 23: Übersichtsaufnahme der IHC-Kontrolle bei 16-facher Vergrößerung mit Markierung der Bereiche 1-5. Beschreibung siehe Text. IHC: Immun-Histo-Chemie

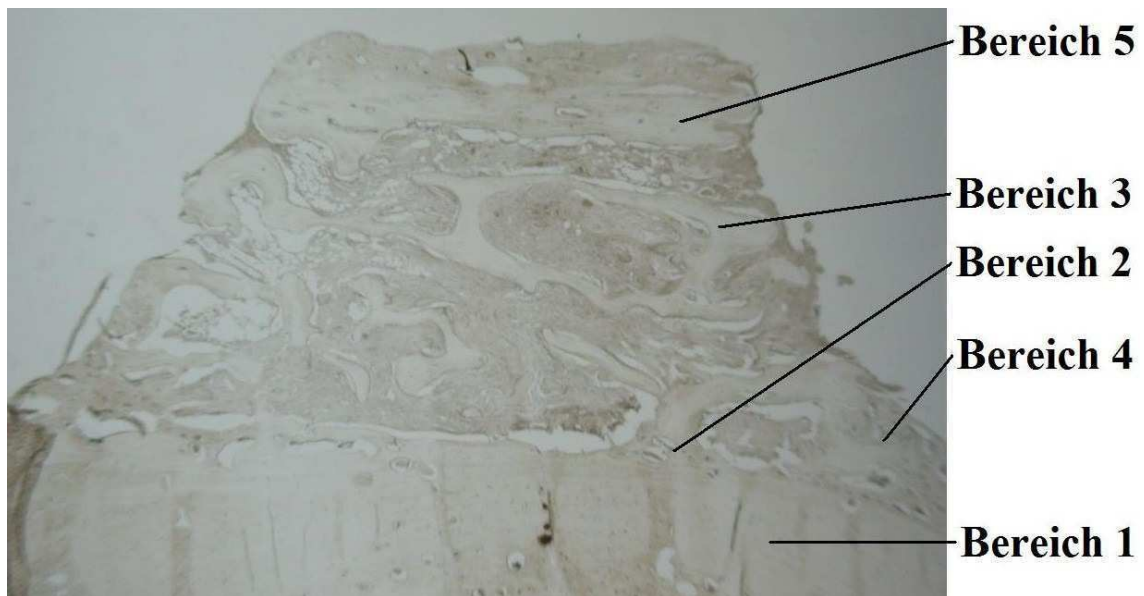


Abbildung 24: Übersichtsaufnahme der AK-Färbung (Nitrotyrosin) bei 16-facher Vergrößerung mit Markierung der Bereiche 1-5. Beschreibung siehe Text. AK: Antikörper

Anschließend wurden in den fünf verschiedenen Bereichen jeweils Osteozyten (OZ), Osteoblasten (OB) und Osteoklasten (OK) auf ihre Farbintensität hin ausgezählt (s. Abb. 25 und 26). Hierzu wurde jeder einzelnen Knochenzelle eine Zahl von 0 – 3 zugeordnet, wobei 0 „weiß“ (wenig gefärbt) und 3 „schwarz“ (stark gefärbt) entsprach.

Dazwischen liegende Farbintensitäten werden entsprechend mit 1 oder 2 bezeichnet. Abb. 26 verdeutlicht die Zuordnung von Intensitätswerten anhand der OZ. Pro Bereich und Präparat sollten an fünf verschiedenen Stellen jeweils ca. 50 Knochenzellen auf ihre Farbintensität hin bestimmt werden.

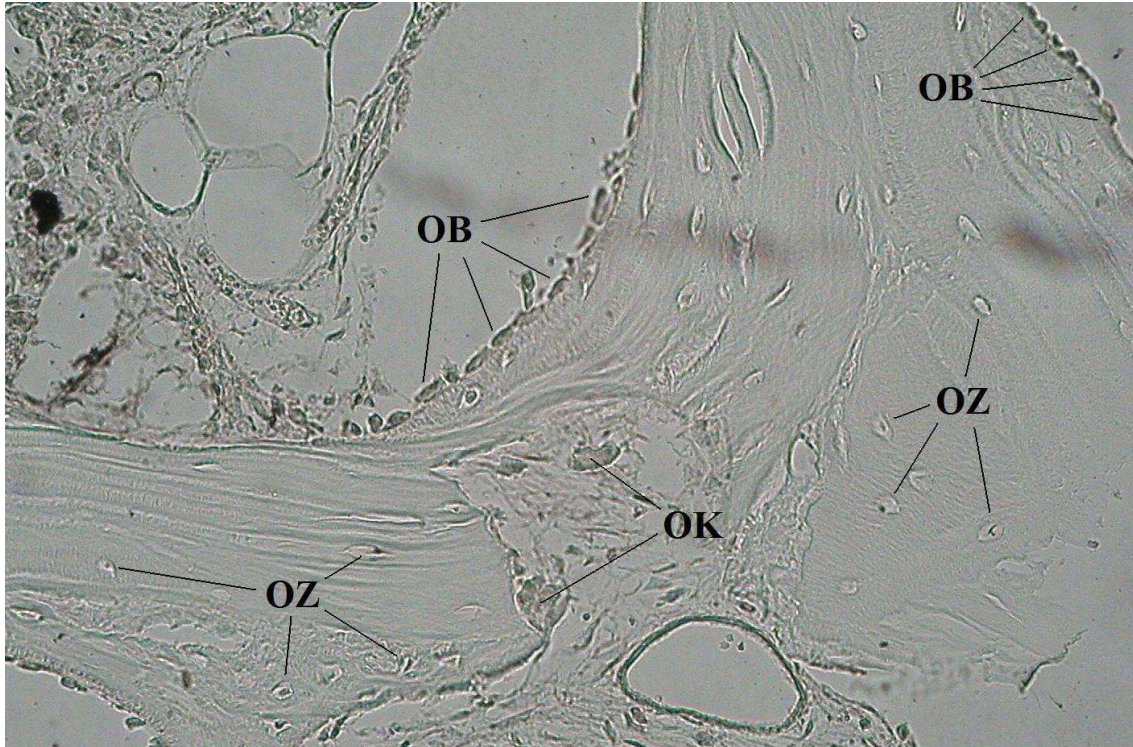


Abbildung 25: Darstellung der Knochenzellen aus Bereich 3 nach AK-Färbung (Nitrotyrosin) bei 200-facher Vergrößerung. AK: Antikörper; OZ: Osteozyten; OB: Osteoblasten; OK: Osteoklasten

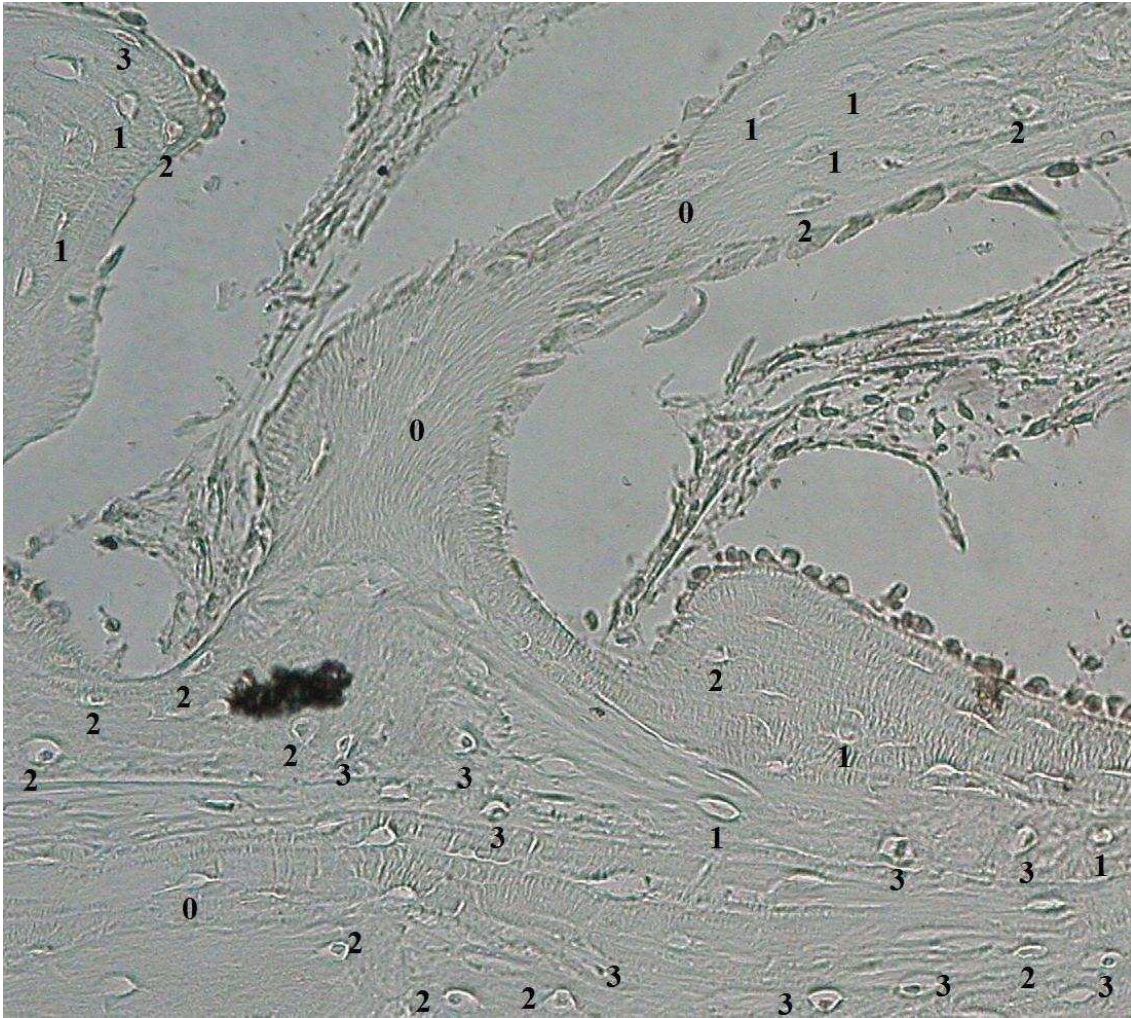


Abbildung 26: Verdeutlichung der Zuordnung von Intensitätswerten (0-3) anhand von OZ, wobei 0 für „wenig gefärbt“ (weiß) und 3 für „stark gefärbt“ (schwarz) steht. Dazwischen liegende Farbintensitäten wurden entsprechend mit 1 oder 2 gekennzeichnet. Es handelt sich um den Bereich 2 einer AK-Färbung (Nitrotyrosin) bei 200-facher Vergrößerung. OZ: Osteozyten; AK: Antikörper

Des Weiteren wurde die Menge an Bindegewebe (BG) im Präparat sowie die Färbung des BG im Präparat ebenfalls mit einem Score von 0 – 3 belegt. Dabei steht 0 für wenig BG im Präparat bzw. für eine niedrige Farbintensität des BG und 3 für viel BG bzw. für eine hohe Farbintensität des BG im Präparat. Letztlich wurde noch die Anzahl der Gefäße im BG und Knochen getrennt gezählt. Auch hier wurde mit Werten von 0 – 3 gearbeitet, wobei 0 für sehr wenig und 3 für sehr viele Gefäße steht.

Präparate, auf denen keine eindeutige Struktur des angegebenen Augmentationsverfahrens wieder zu finden ist, wurden so weit wie möglich ausgewertet. Präparate, die

nicht auswertbar waren und von denen es keine Möglichkeit gab, neue Schnitte anzufertigen, wurden von der Auswertung ausgeschlossen.

Die Auszählung erfolgte doppelt durch zwei Personen unabhängig voneinander.

2.2.6 Auswertung und statistische Analyse

Zur Auswertung der AK-Färbungen wurde die Farbintensität der einzelnen Knochenzellen (OZ, OB und OK) in den Bereichen 1 – 5 ausgezählt (s. Abb. 22). Da sich in den Präparaten nur eine sehr geringe Anzahl an OK finden ließ, wurde der Grenzwert (Threshold) für OK auf $n = 5$ gesetzt. Die Anzahl von OZ und OB war weitaus höher, so dass fast immer die geforderte Anzahl von 250 Zellen (fünf Stellen \times 50 Zellen) pro Feld erreicht wurde. Um einen Mittelwert für die statistische Analyse zu erhalten wurde der Mittelwert aus beiden Auszählungen für jedes der fünf Gesichtsfelder gebildet. Anschließend erfolgte die Zusammenfassung aller korrespondierenden Gesichtsfelder. So erhielt man pro Präparat jeweils einen Mittelwert für OZ, OB und OK. Dieser wurde auf drei Stellen nach dem Komma gerundet.

Zusätzlich zu den Mittelwerten der Farbintensität der Knochenzellen wurde noch die Anzahl der Gefäße in Knochen und BG und die Menge und Färbung des BG im Präparat ausgewertet.

Die Daten wurden mit der Software SPSS für Windows (Version 17.0) analysiert.

Konditionierung VI diente als Negativkontrolle. Weil sie klinisch am Patienten nie praktiziert wird, wurde sie nicht in die statistische Analyse miteinbezogen.

Die klinische Auswertung der verschiedenen Augmentationsverfahren zeigte, dass nach 16 Wochen Einheilzeit alle Augmentate, abgesehen von Konditionierung V, nahezu komplett wegresorbiert waren und die Fixationsschrauben meist entblößt im Knochen standen (157).

Um die Daten der Auswertung überschaubar zu halten und den klinischen Aspekt der Studie zu berücksichtigen, wurde der klinische Erfolg von Konditionierung V (keine bzw. keine große Atrophie) den Werten der Konditionierungen I – IV (Gruppe der Präparate mit Atrophie) gegenübergestellt. Es wurden somit zwei Gruppen erstellt: Eine

Nicht-Atrophie-Gruppe (ohne bzw. mit wenig Atrophie) und eine Atrophie-Gruppe (mit klinischer Atrophie).

Auf Grund der geringen Präparateanzahl in der Nicht-Atrophie-Gruppe (teilweise nur zwei Präparate pro Zeitpunkt), wurden die Einheilzeiten von vier auf zwei Zeitpunkte zusammengefasst. Den 1. Zeitpunkt stellen die Präparate mit 4 und 8 Wochen Einheilzeit dar; den 2. Zeitpunkt die Präparate mit 12 und 16 Wochen Einheilzeit. Durch diese Zusammenfassung konnte die Anzahl der Präparate pro Zeitpunkt verdoppelt werden.

Die Werte der beiden Gruppen (klinische Atrophie vs. keine klinische Atrophie) wurden nun unter Betrachtung der beiden Zeitpunkte (4. + 8. Woche vs. 12. + 16. Woche), einzeln für jede der vier AK-Färbungen, statistisch ausgewertet.

Zusätzlich wurden bei allen Auswertungen die Standardabweichungen errechnet und Signifikanztests durchgeführt. Für normalverteilte Daten kam der T-Test und bei nicht normalverteilten Daten der Mann-Whitney-Test zum Einsatz. Beim T-Test wurde im Vorfeld ein Levene-Test auf Varianzgleichheit durchgeführt. Ist das Ergebnis des Levene-Test größer als 0,05, so sind die Varianzen gleich; ist der Wert hingegen kleiner als 0,05, so sind die Varianzen nicht gleich.

Da sehr viele Signifikanztests durchgeführt wurden (multiples Testen), musste zudem das Signifikanzniveau angepasst werden. Dabei wurde das Signifikanzniveau von 0,05 durch die Anzahl der Tests (pro Färbung) dividiert (Bsp.: bei 6 Tests $\rightarrow 0,05 / 6 = 0,008$). Die Signifikanzwert (p-Wert) wurde im Anschluss also nicht mit 0,05, sondern stattdessen mit dem korrigierten Wert (hier 0,008) verglichen. Ist der p-Wert kleiner als der korrigierte Signifikanzwert, so ist der Unterschied zwischen den Gruppen signifikant. Ist der p-Wert kleiner als 0,001 wird der Unterschied als hoch signifikant angesehen.

Bei der Auswertungsreihe der Färbungsintensität der Knochenzellen handelt es sich um normalverteilte Daten. Die Signifikanz wurde mittels T-Test überprüft und das Signifikanzniveau entsprechend der Anzahl der durchgeführten Tests (Anzahl = 6) auf 0,008 gesenkt.

Bei der Auswertungsreihe bezüglich der Anzahl der Gefäße in BG und Knochen handelt es sich um nicht-normalverteilte Daten. Die Signifikanz wurde hier mittels nicht-parametrischer Mann-Whitney-Tests überprüft und das Signifikanzniveau entsprechend der Anzahl der durchgeführten Tests (Anzahl = 4) auf 0,013 gesenkt.

Bei den Auswertungsreihen bezüglich der Menge an BG im Präparat und der Färbungsintensität des BG im Präparat handelt es sich ebenfalls um nicht-normalverteilte Daten. Die Signifikanz wurde in beiden Fällen mittels nicht-parametrischer Mann-Whitney-Tests überprüft und das Signifikanzniveau entsprechend der Anzahl der durchgeführten Tests (Anzahl = 2) auf 0,025 gesenkt.

3 Ergebnisse

Bei der Auswertung der Daten wurde stets die Gruppe ohne bzw. mit nur geringer klinischer Atrophie (entspricht Konditionierung V) der Gruppe mit eindeutiger klinischer Atrophie (entspricht den Konditionierungen I – IV) gegenübergestellt. Letztere wird Atrophie-Gruppe genannt. Die Gruppe ohne bzw. mit nur geringer klinischer Atrophie wird als Nicht-Atrophie-Gruppe bezeichnet.

3.1 Färbungsintensität von Osteozyten, Osteoblasten und Osteoklasten

Da es sich bei dieser Auswertungsreihe um normalverteilte Daten handelt, wurde die Signifikanz mittels T-Tests überprüft. Das Signifikanzniveau wurde entsprechend der Anzahl der durchgeführten Tests (Anzahl = 6) auf 0,008 gesenkt.

3.1.1 Anfärbung von pERK

Die Färbungsintensität der Gruppe ohne klinische Atrophie ist zumeist höher, als die der Gruppe mit Atrophie. Lediglich in der 4. – 8. Woche (1. Zeitpunkt) kommt es annähernd zu einer Stagnation der Werte der OZ und in der 12. – 16. Woche (2. Zeitpunkt) sogar zu einem Abfall der Farbintensität der OK zwischen den jeweiligen Gruppen.

Betrachten wir die unterschiedlichen Zeitpunkte, so ist bei den OB keine Veränderung zu erkennen. Bei den OK weist lediglich die Gruppe ohne klinische Atrophie eine Absenkung der Farbintensitätswerte zum 2. Zeitpunkt hin auf. Die OZ verzeichnen in der Gruppe mit klinischer Atrophie eine Absenkung der Werte ebenfalls zum 2. Zeitpunkt.

Die höchsten Farbintensitätswerte erzielen OB, gefolgt von OK und OZ (vgl. Abb. 27).

Die deskriptive Statistik kann Tab. 2 und 3 entnommen werden.

Bei der Anfärbung von pERK konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden (s. Anhang).

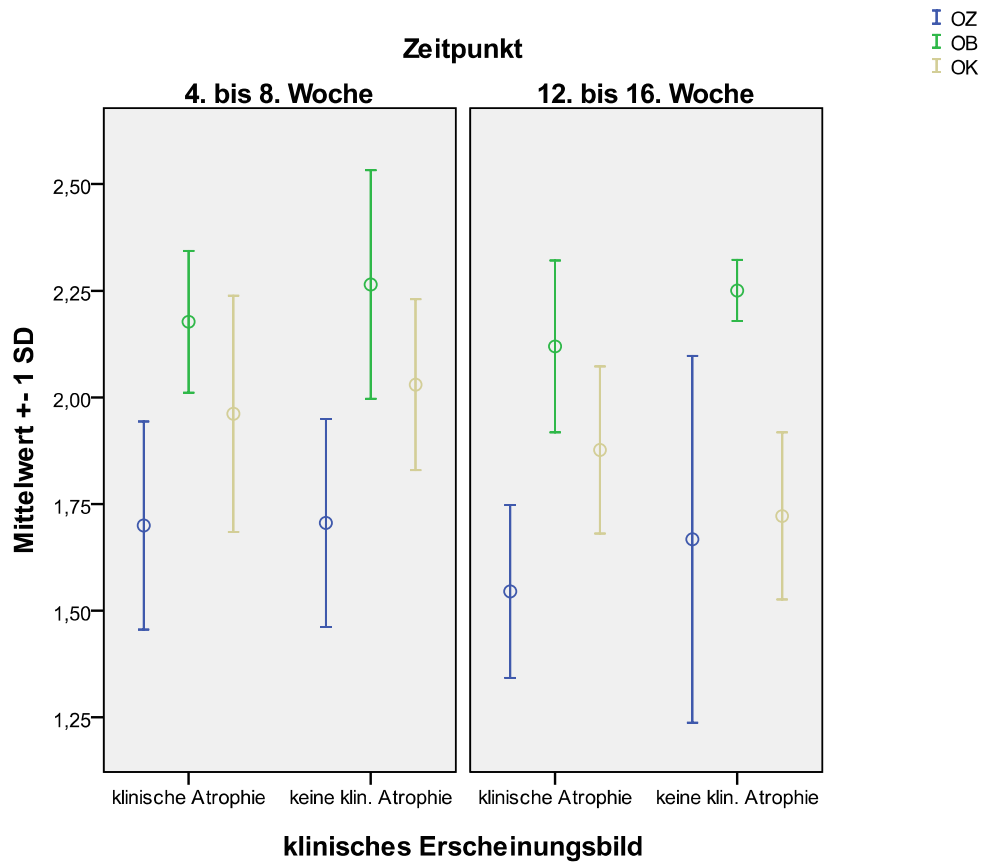


Abbildung 17: Farbintensität von OZ, OB und OK nach Anfärbung von pERK. OZ: Osteozyten (blau); OB: Osteoblasten (grün); OK: Osteoklasten (gelb)

Tabelle 2: Zeitpunkt: 4. – 8. Woche. Standardabweichungen und Mittelwerte von OZ, OB und OK nach Anfärbung von pERK. N: Anzahl der Präparate; OZ: Osteozyten; OB: Osteoblasten; OK: Osteoklasten

	klinisches Erscheinungsbild	N	Mittelwert	Standardabweichung
OZ	klinische Atrophie	24	1,70350	0,239294
	keine klin. Atrophie	6	1,70583	0,243819
OB	klinische Atrophie	24	2,16342	0,176286
	keine klin. Atrophie	6	2,26450	0,267789
OK	klinische Atrophie	23	1,96174	0,276955
	keine klin. Atrophie	6	2,02983	0,200173

Tabelle 3: Zeitpunkt: 12. – 16. Woche. Standardabweichungen und Mittelwerte von OZ, OB und OK nach Anfärbung von pERK. N: Anzahl der Präparate; OZ: Osteozyten; OB: Osteoblasten; OK: Osteoklasten

	klinisches Erscheinungsbild	N	Mittelwert	Standardabweichung
OZ	klinische Atrophie	20	1,65510	0,336443
	keine klin. Atrophie	5	1,71500	0,386976
OB	klinische Atrophie	18	2,15478	0,206965
	keine klin. Atrophie	5	2,30040	0,127653
OK	klinische Atrophie	13	1,87677	0,195571
	keine klin. Atrophie	4	1,72200	0,195842

3.1.2 Anfärbung von pAKT

In der 4. – 8. Woche nach Knochentransplantation weist die Gruppe ohne klinische Atrophie bei allen Knochenzellen eine geringere Färbungsintensität auf, als die Gruppe mit Atrophie. Beim 2. Zeitpunkt sind die Werte der Gruppen nahezu identisch, lediglich die OB in der Gruppe ohne Atrophie erzielen höhere Werte als die Kontrollgruppe. Während es beim 2. Zeitpunkt bei den OK zu einem Absinken der Farbintensität kommt, bleiben die Werte der OZ konstant. Bei den OB kann in der Atrophie-Gruppe ein Absinken der Werte zum 2. Zeitpunkt beobachtet werden; die Werte der Gruppe ohne Atrophie bleiben konstant.

Die höchsten Farbintensitätswerte erzielen OB, gefolgt von OK und OZ (vgl. Abb. 28).

Die deskriptive Statistik kann Tab. 4 und 5 entnommen werden.

Signifikante Unterschiede ($p = 0,001$) weisen die OB und OK der Atrophie-Gruppe beim Vergleich der beiden Zeitpunkte auf. In der Nicht-Atrophie-Gruppe sind die OK zu den verschiedenen Zeitpunkten mit $p = 0,016$ als nicht signifikant zu erwähnen (s. Anhang).

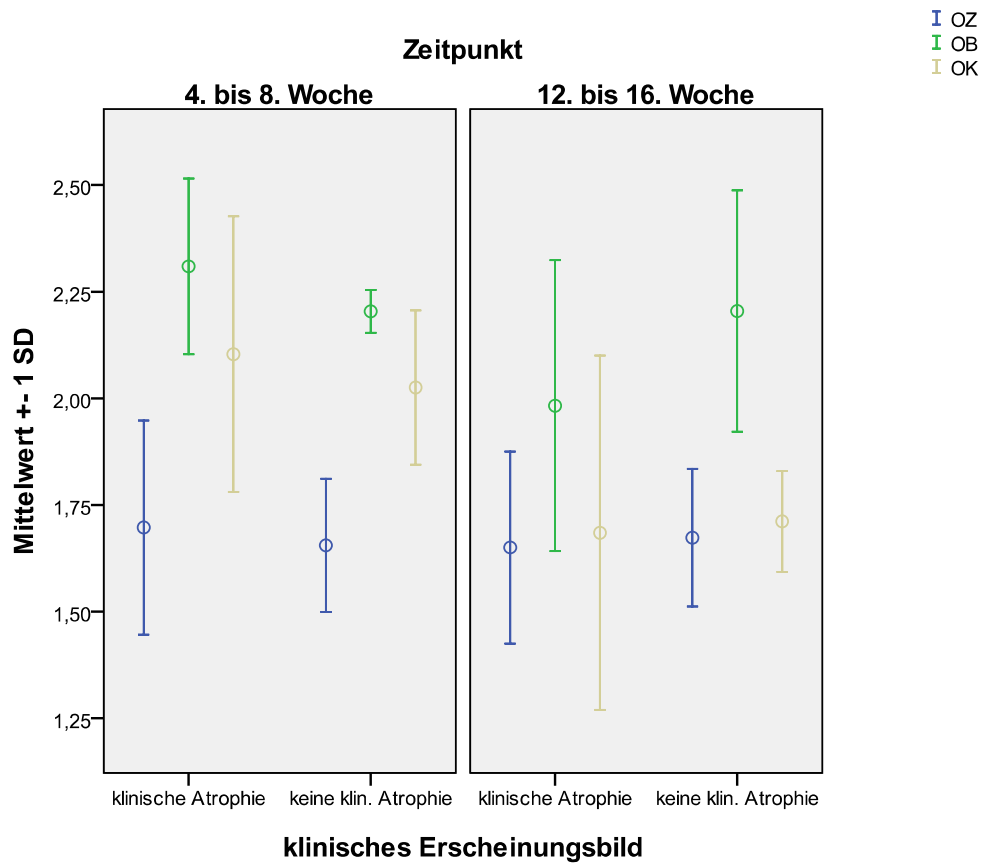


Abbildung 28: Farbtintensität von OZ, OB und OK nach Anfärbung von pAKT. OZ: Osteozyten (blau); OB: Osteoblasten (grün); OK: Osteoklasten (gelb)

Tabelle 4: Zeitpunkt: 4. – 8. Woche. Standardabweichungen und Mittelwerte von OZ, OB und OK nach Anfärbung von pAKT. N: Anzahl der Präparate; OZ: Osteozyten; OB: Osteoblasten; OK: Osteoklasten

	klinisches Erscheinungsbild	N	Mittelwert	Standardabweichung
OZ	klinische Atrophie	24	1,69613	0,245672
	keine klin. Atrophie	6	1,65550	0,156180
OB	klinische Atrophie	24	2,29592	0,212248
	keine klin. Atrophie	6	2,20400	0,050196
OK	klinische Atrophie	23	2,10361	0,323009
	keine klin. Atrophie	6	2,02550	0,180580

Tabelle 5: Zeitpunkt: 12. – 16. Woche. Standardabweichungen und Mittelwerte von OZ, OB und OK nach Anfärbung von pAKT. N: Anzahl der Präparate; OZ: Osteozyten; OB: Osteoblasten; OK: Osteoklasten

	klinisches Erscheinungsbild	N	Mittelwert	Standardabweichung
OZ	klinische Atrophie	19	1,60937	0,229121
	keine klin. Atrophie	4	1,67325	0,161378
OB	klinische Atrophie	19	1,96979	0,334013
	keine klin. Atrophie	4	2,20450	0,282846
OK	klinische Atrophie	16	1,68494	0,415138
	keine klin. Atrophie	4	1,71150	0,118013

3.1.3 Anfärbung von Nitrotyrosin

Beim 1. Zeitpunkt sind die Werte für OK und OB zwischen den beiden Gruppen nahezu gleich. In der 12. – 16. Woche verzeichnen die OZ der Gruppe ohne klinische Atrophie geringere Werte als die Atrophie-Gruppe. OK und OB zum 2. Zeitpunkt und OZ zum 1. Zeitpunkt weisen in der Gruppe ohne Atrophie höhere Werte als die Atrophie-Gruppe auf.

Beim Vergleich der Zeitpunkte bleiben die Werte der OZ in der Atrophie-Gruppe und die Werte der OB der Nicht-Atrophie-Gruppe konstant. OB und OK der Gruppe mit klinischer Atrophie weisen zum Zeitpunkt 2 geringere Werte auf. Gleiches gilt für die OZ der Nicht-Atrophie-Gruppe. Die OK in der Gruppe ohne klinischer Atrophie weisen in der 12. – 16. Woche eine gesteigerte Farbintensität auf.

Die höchsten Farbintensitätswerte erzielen OK, gefolgt von OB und OZ (vgl. Abb. 29). Die deskriptive Statistik kann Tab. 6 und 7 entnommen werden.

Signifikante Unterschiede weisen die OB ($p = 0,001$) und OK ($p = 0,005$) in der 12. – 16. Woche beim Vergleich der beiden Gruppen auf. Betrachten wir die unterschiedlichen Zeitpunkte, so sind in der Gruppe mit klinischer Atrophie die OB mit $p < 0,001$ als hoch signifikant und die OK mit $p = 0,01$ als nicht signifikant zu bezeichnen (s. Anhang).

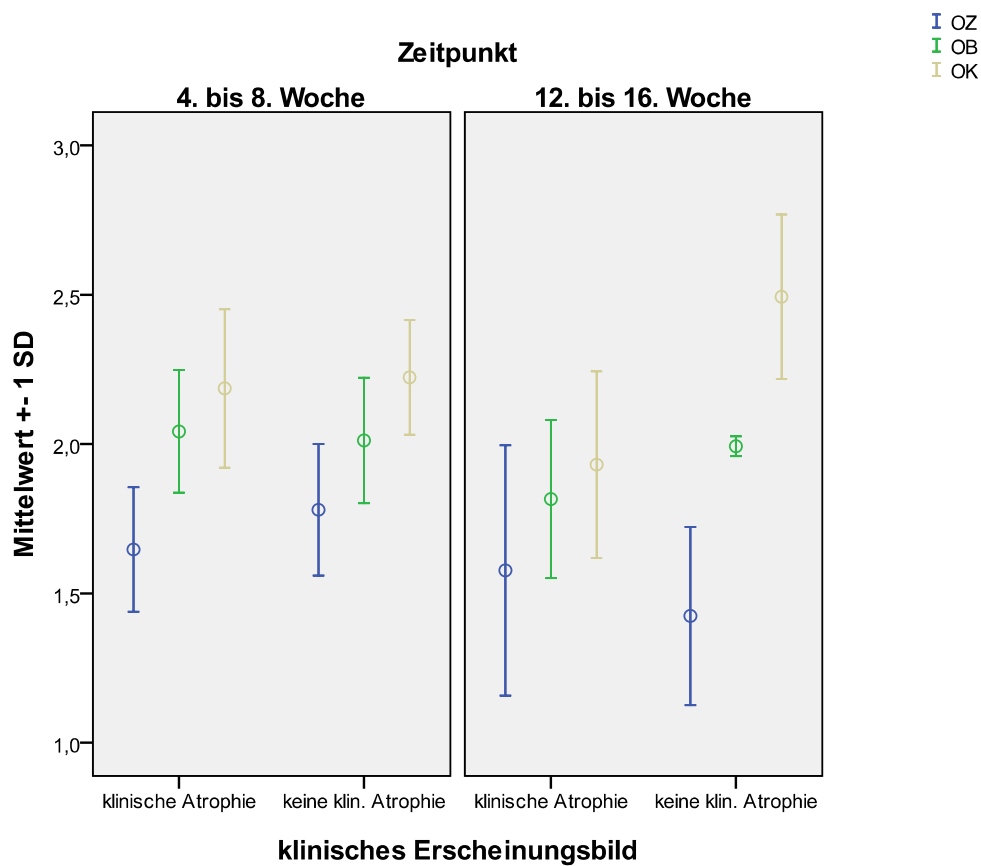


Abbildung 29: Farbintensität von OZ, OB und OK nach Anfärbung von Nitrotyrosin. OZ: Osteozyten (blau); OB: Osteoblasten (grün); OK: Osteoklasten (gelb)

Tabelle 6: Zeitpunkt: 4. – 8. Woche. Standardabweichungen und Mittelwerte von OZ, OB und OK nach Anfärbung von Nitrotyrosin. N: Anzahl der Präparate; OZ: Osteozyten; OB: Osteoblasten; OK: Osteoklasten

	klinisches Erscheinungsbild	N	Mittelwert	Standardabweichung
OZ	klinische Atrophie	24	1,62867	0,222767
	keine klin. Atrophie	6	1,77983	0,220027
OB	klinische Atrophie	24	2,03675	0,202702
	keine klin. Atrophie	6	2,01217	0,209842
OK	klinische Atrophie	23	2,18643	0,265169
	keine klin. Atrophie	6	2,22317	,192061

Tabelle 7: Zeitpunkt: 12. – 16. Woche. Standardabweichungen und Mittelwerte von OZ, OB und OK nach Anfärbung von Nitrotyrosin. N: Anzahl der Präparate; OZ: Osteozyten; OB: Osteoblasten; OK: Osteoklasten

	klinisches Erscheinungsbild	N	Mittelwert	Standardabweichung
OZ	klinische Atrophie	23	1,57365	0,378576
	keine klin. Atrophie	4	1,42425	0,298513
OB	klinische Atrophie	23	1,78804	0,233389
	keine klin. Atrophie	4	1,99250	0,033372
OK	klinische Atrophie	15	1,93107	0,312774
	keine klin. Atrophie	4	2,49300	0,275757

3.1.4 Anfärbung von 8-Isoprostan

Hier ist zu beobachten, dass die Farbintensitätswerte der Gruppe ohne klinische Atrophie für alle Knochenzellen stets über den Werten der Gruppe mit klinischer Atrophie liegt.

Im Vergleich der Zeitpunkte zeigt sich, dass die Werte in der 12. – 16. Woche durchgehend geringer sind als die Werte in der 4. – 8. Woche.

Die höchsten Farbintensitätswerte erzielen die OZ, gefolgt von den OB und den OK (vgl. Abb. 30).

Die deskriptive Statistik kann Tab. 8 und 9 entnommen werden.

Beim Vergleich der beiden Zeitpunkte in der Atrophie-Gruppe weisen die OB ($p = 0,01$) und die OK ($p = 0,008$) nicht signifikante Unterschiede auf. In der Gruppe ohne klinische Atrophie sind die OB zu den verschiedenen Zeitpunkten mit $p = 0,009$ ebenfalls als nicht signifikant zu bezeichnen (s. Anhang).

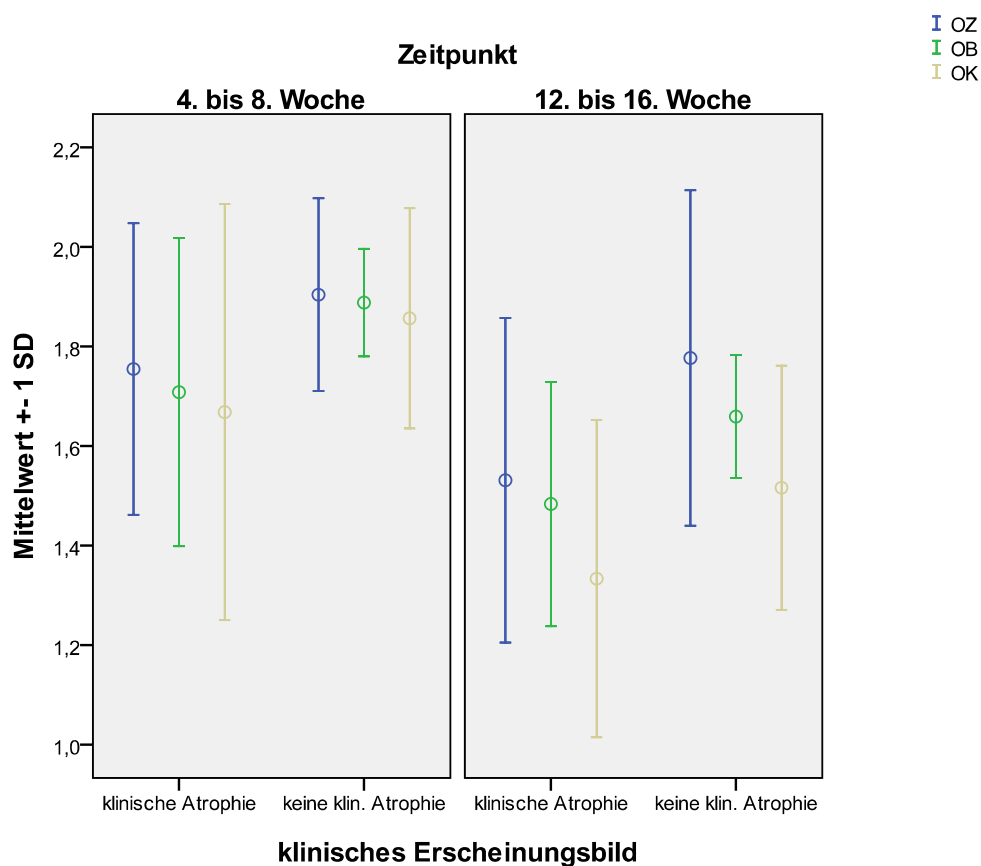


Abbildung 30: Farbintensität von OZ, OB und OK nach Anfärbung von 8-Isoprostan. OZ: Osteozyten (blau); OB: Osteoblasten (grün); OK: Osteoklasten (gelb)

Tabelle 8: Zeitpunkt: 4. – 8. Woche. Standardabweichungen und Mittelwerte von OZ, OB und OK nach Anfärbung von 8-Isoprostan. N: Anzahl der Präparate; OZ: Osteozyten; OB: Osteoblasten; OK: Osteoklasten

	klinisches Erscheinungsbild	N	Mittelwert	Standardabweichung
OZ	klinische Atrophie	24	1,77150	0,297954
	keine klin. Atrophie	6	1,90400	0,193543
OB	klinische Atrophie	24	1,71346	0,303990
	keine klin. Atrophie	6	1,88817	0,108232
OK	klinische Atrophie	23	1,66817	0,417934
	keine klin. Atrophie	6	1,85650	0,221170

Tabelle 9: Zeitpunkt: 12. – 16. Woche. Standardabweichungen und Mittelwerte von OZ, OB und OK nach Anfärbung von 8-Isoprostan. N: Anzahl der Präparate; OZ: Osteozyten; OB: Osteoblasten; OK: Osteoklasten

	klinisches Erscheinungsbild	N	Mittelwert	Standardabweichung
OZ	klinische Atrophie	21	1,60405	0,403687
	keine klin. Atrophie	5	1,77680	0,336839
OB	klinische Atrophie	21	1,48514	0,261958
	keine klin. Atrophie	5	1,65920	0,123354
OK	klinische Atrophie	18	1,33356	0,318464
	keine klin. Atrophie	5	1,51620	0,245176

3.2 Gefäßanzahl in Bindegewebe und Knochen

Bei der Gefäßanzahl in BG und Knochen handelt es sich um nicht-normalverteilte Daten, weshalb die Signifikanz mittels nicht-parametrischer Mann-Whitney-Tests überprüft wurde. Das Signifikanzniveau wurde entsprechend der Anzahl der durchgeführten Tests (Anzahl = 4) auf 0,013 gesenkt.

Während sich die Anzahl der Gefäße zwischen den beiden Gruppen zum 1. Zeitpunkt noch nicht wesentlich unterscheiden, so liegt die Anzahl der Gefäße in der 12. – 16. Woche in der Gruppe ohne klinische Atrophie deutlich höher als in der Atrophie-Gruppe.

Betrachten wir die unterschiedlichen Zeitpunkte, so ist zum 2. Zeitpunkt hin ein deutlicher Abfall der Anzahl der Gefäße im Bindegewebe zu beobachten. Die Anzahl der Gefäße im Knochen bleibt in der Atrophie-Gruppe konstant, während sie in der Nicht-Atrophie-Gruppe zum 2. Zeitpunkt hin zunimmt.

In der 4. – 8. Woche überwiegt die Anzahl der Gefäße im Bindegewebe. Diese Situation ändert sich in der 12. – 16. Woche, hier findet sich die größere Anzahl der Gefäße im Knochen wieder (vgl. Abb. 31).

Die deskriptive Statistik kann Tab. 10 und 11 entnommen werden.

Einen hoch signifikanten Unterschied mit $p < 0,001$ weisen die Gefäße im BG in der Atrophie-Gruppe beim Vergleich der unterschiedlichen Zeitpunkte auf. In der Gruppe ohne klinische Atrophie sind die Gefäße im Knochen zu den verschiedenen Zeitpunkten $p = 0,045$ als nicht signifikant zu erwähnen. Ebenfalls nicht signifikante Unterschiede weisen die Gefäße im BG und die Gefäße im Knochen beim jeweiligen Betrachten der unterschiedlichen Gruppen in der 12. – 16. Woche mit $p = 0,045$ und $p = 0,035$ auf (s. Anhang).

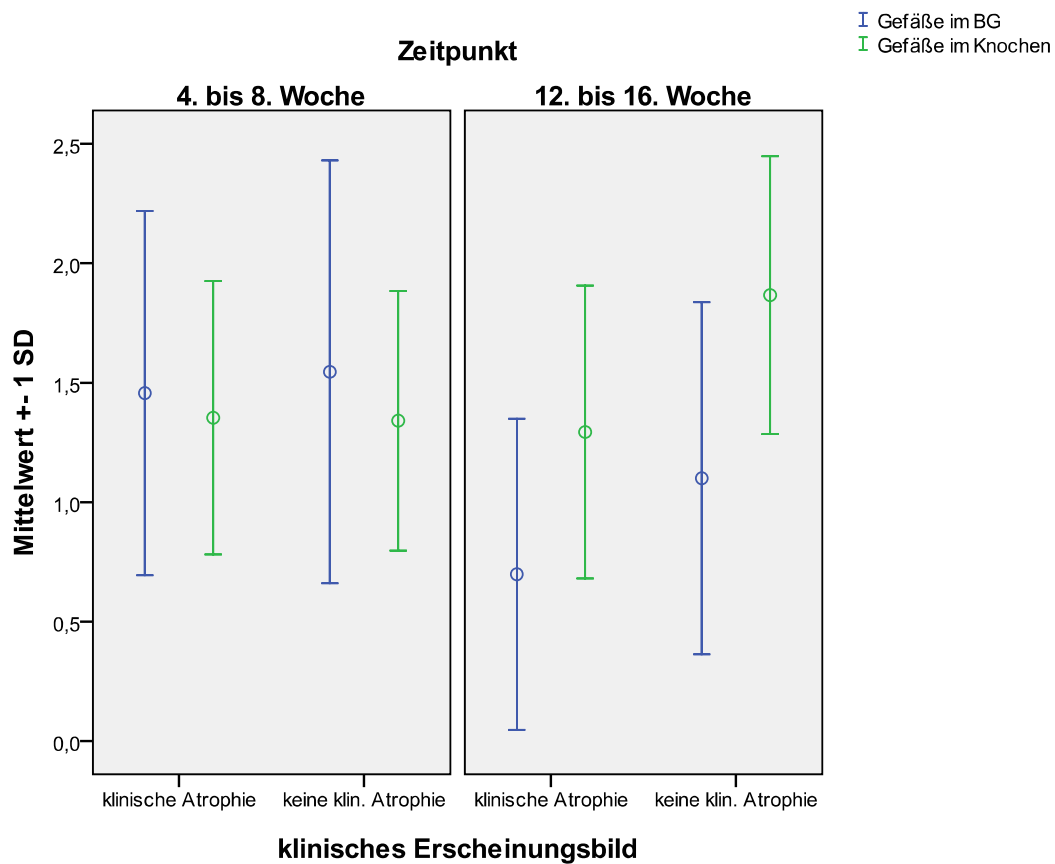


Abbildung 31: Anzahl der Gefäße in BG (blau) und Knochen (grün). BG: Bindegewebe

Tabelle 10: Zeitpunkt: 4. – 8. Woche. Standardabweichungen und Mittelwerte der Anzahl der Gefäße in BG und Knochen. N: Anzahl der Präparate; BG: Bindegewebe

	klinisches Erscheinungsbild	N	Mittelwert	Standardabweichung
Anzahl der Gefäße im BG	klinische Atrophie	93	1,457	0,7578
	keine klin. Atrophie	23	1,565	0,8700
Anzahl der Gefäße im Knochen	klinische Atrophie	94	1,36	0,571
	keine klin. Atrophie	23	1,33	0,535

Tabelle 11: Zeitpunkt: 12. – 16. Woche. Standardabweichungen und Mittelwerte der Anzahl der Gefäße in BG und Knochen. N: Anzahl der Präparate; BG: Bindegewebe

	klinisches Erscheinungsbild	N	Mittelwert	Standardabweichung
Anzahl der Gefäße im BG	klinische Atrophie	64	0,688	0,6516
	keine klin. Atrophie	15	1,100	0,7368
Anzahl der Gefäße im Knochen	klinische Atrophie	81	1,40	0,646
	keine klin. Atrophie	18	1,75	0,600

3.3 Menge an Bindegewebe im Präparat

Bei der Menge an Bindegewebe im Präparat handelt es sich um nicht-normalverteilte Daten, weshalb die Signifikanz mittels nicht-parametrischer Mann-Whitney-Tests überprüft wurde. Das Signifikanzniveau wurde entsprechend der Anzahl der durchgeführten Tests (Anzahl = 2) auf 0,025 gesenkt.

Die Gruppe ohne klinische Atrophie weist zu beiden Zeitpunkten eine etwas größere Menge an Bindegewebe auf als die Gruppe mit klinischer Atrophie.

Betrachten wir die unterschiedlichen Zeitpunkte, so ist in der 12. – 16. Woche bei beiden Gruppen eine Mengenabnahme des Bindegewebes im Präparat zu verzeichnen (vgl. Abb. 32).

Die deskriptive Statistik kann Tab. 12 entnommen werden.

Einen hoch signifikanten Unterschied mit $p < 0,001$ weist die Gruppe mit klinischer Atrophie beim Vergleich der beiden Zeitpunkte auf. Ebenfalls signifikant ist die Gruppe ohne klinische Atrophie zu den verschiedenen Zeitpunkten mit $p = 0,005$ (s. Anhang).



Abbildung 32: Menge des BG im Präparat. BG: Bindegewebe

Tabelle 12: Standardabweichungen und Mittelwerte der Menge des BG im Präparat. N: Anzahl der Präparate; BG: Bindegewebe

Zeitpunkt (in Wochen)	Klinisches Erscheinungsbild	N	Mittelwert	Standard- abweichung
4. – 8.	klinische Atrophie	95	2,521	0,5355
	keine klin. Atrophie	24	2,625	0,5566
12. – 16.	klinische Atrophie	79	1,975	0,6742
	keine klin. Atrophie	18	2,083	0,6697

3.4 Färbungsintensität des Bindegewebes im Präparat

Da es sich bei dieser Auswertungsreihe um nicht-normalverteilte Daten handelt, wurde die Signifikanz mittels nicht-parametrischen Mann-Whitney-Tests überprüft. Das Signifikanzniveau wurde entsprechend der Anzahl der durchgeführten Tests (Anzahl = 2) auf 0,025 gesenkt.

3.4.1 Anfärbung von pERK

Da pERK normalerweise intrazellulär anzutreffen ist, muss davon ausgegangen werden, dass intrazelluläre Signalmoleküle ins umliegende Bindegewebe freigesetzt wurden.

In der 12. – 16. Woche liegt die Farbintensität des Bindegewebes im Präparat der Nicht-Atrophie-Gruppe über der Gruppe mit klinischer Atrophie, während sich die Farbintensitäten der beiden Gruppen zum 1. Zeitpunkt auf gleichem Niveau bewegen.

Zum 2. Zeitpunkt werden geringere Farbintensitätswerte erzielt als zum 1. Zeitpunkt (vgl. Abb.33).

Die deskriptive Statistik kann Tab. 13 entnommen werden.

Einen signifikanten Unterschied mit $p = 0,007$ weist die Gruppe mit klinischer Atrophie beim Vergleich der beiden Zeitpunkte auf (s. Anhang).



Abbildung 33: Farbintensität vom BG im Präparat nach Anfärbung von pERK. BG: Bindegewebe

Tabelle 13: Standardabweichungen und Mittelwerte der Farbintensität des BG im Präparat nach Anfärbung von pERK. N: Anzahl der Präparate; BG: Bindegewebe

Zeitpunkt (in Wochen)	Klinisches Erscheinungsbild	N	Mittelwert	Standard- abweichung
4. – 8.	klinische Atrophie	24	2,396	0,6590
	keine klin. Atrophie	6	2,417	0,7360
12. – 16.	klinische Atrophie	20	1,750	0,7695
	keine klin. Atrophie	5	2,000	0,5000

3.4.2 Anfärbung von pAKT

Da pAKT normalerweise intrazellulär anzutreffen ist, muss hier ebenfalls davon ausgegangen werden, dass intrazelluläre Signalmoleküle ins umliegende Bindegewebe freigesetzt wurden.

In der 12. – 16. Woche liegt die Farbintensität des Bindegewebes im Präparat der Nicht-Atrophie-Gruppe über der Gruppe mit klinischer Atrophie, während zum 1. Zeitpunkt die Atrophie-Gruppe die höheren Farbintensitätswerte aufweist.

Zum 2. Zeitpunkt werden geringere Farbintensitätswerte erzielt als zum 1. Zeitpunkt (vgl. Abb. 34).

Die deskriptive Statistik kann Tab. 14 entnommen werden.

Auch hier zeigt sich ein signifikanter Unterschied mit $p = 0,003$ bei der Gruppe mit klinischer Atrophie beim Vergleich der beiden Zeitpunkte (s. Anhang).

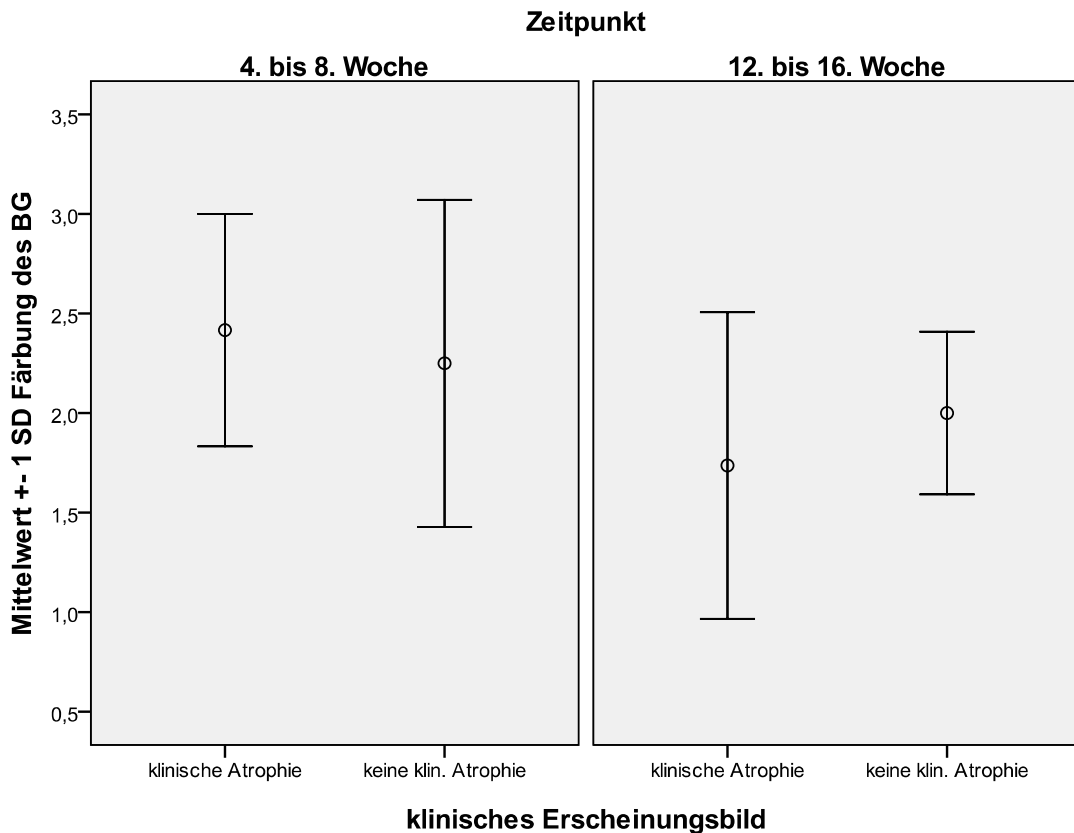


Abbildung 34: Farbintensität vom BG im Präparat nach Anfärbung von pAKT. BG: Bindegewebe

Tabelle 14: Standardabweichungen und Mittelwerte der Farbintensität des BG im Präparat nach Anfärbung von pAKT. N: Anzahl der Präparate; BG: Bindegewebe

Zeitpunkt (in Wochen)	Klinisches Erscheinungsbild	N	Mittelwert	Standard- abweichung
4. – 8.	klinische Atrophie	24	2,417	0,5836
	keine klin. Atrophie	6	2,250	0,8216
12. – 16.	klinische Atrophie	19	1,737	0,7704
	keine klin. Atrophie	4	2,000	0,4082

3.4.3 Anfärbung von Nitrotyrosin

Sowohl zum 1. als auch 2. Zeitpunkt erzielt die Gruppe ohne klinische Atrophie höhere Farbintensitätswerte als die Gruppe mit klinischer Atrophie.

Die Farbintensität der Atrophie-Gruppe ist in der 12. – 16. Woche geringer als in der 4. – 8. Woche, während die Farbintensitätswerte der Gruppe ohne klinische Atrophie nahezu konstant bleiben (vgl. Abb. 35).

Die deskriptive Statistik kann Tab. 15 entnommen werden.

Bei der Anfärbung von Nitrotyrosin konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden (s. Anhang).

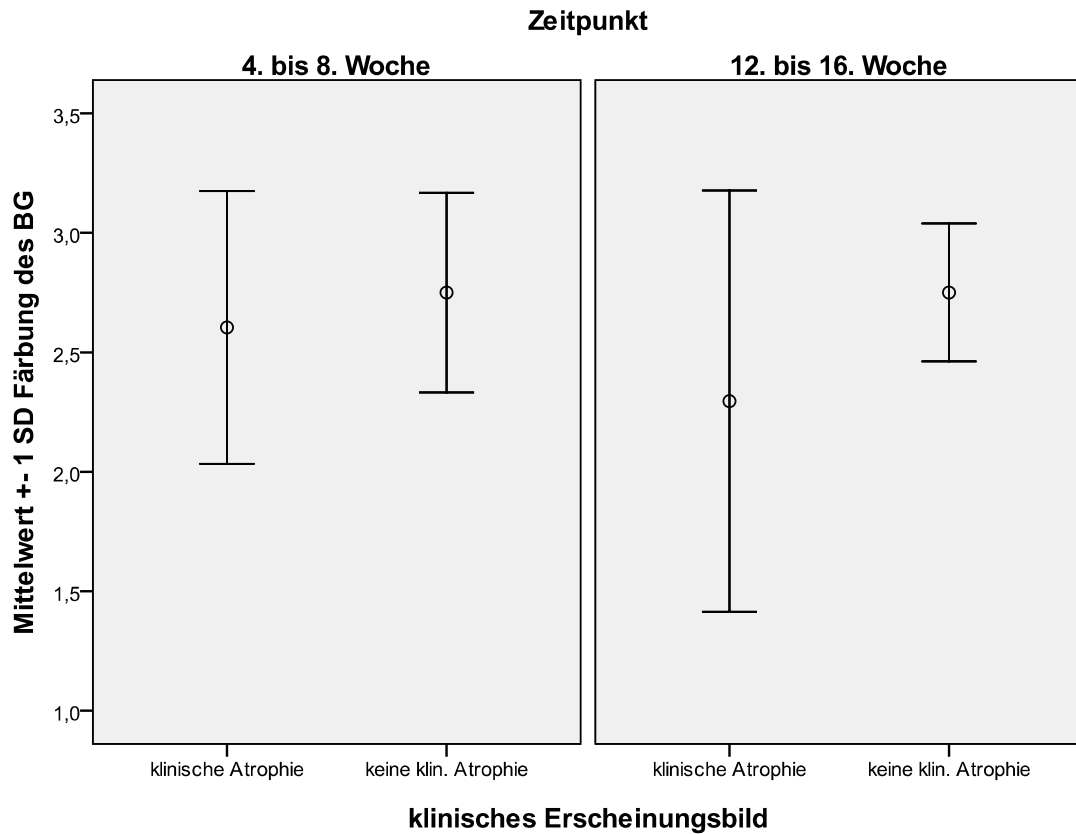


Abbildung 35: Farbintensität vom BG im Präparat nach Anfärbung von Nitrotyrosin. BG: Bindegewebe

Tabelle 15: Standardabweichungen und Mittelwerte der Farbintensität des BG im Präparat nach Anfärbung von Nitrotyrosin. N: Anzahl der Präparate; BG: Bindegewebe

Zeitpunkt (in Wochen)	Klinisches Erscheinungsbild	N	Mittelwert	Standard- abweichung
4. – 8.	klinische Atrophie	24	2,604	0,5706
	keine klin. Atrophie	6	2,750	0,4183
12. – 16.	klinische Atrophie	22	2,295	0,8818
	keine klin. Atrophie	4	2,750	0,2887

3.4.4 Anfärbung von 8-Isoprostan

Zu beiden Zeitpunkten liegen die Farbintensitätswerte der Gruppe ohne klinische Atrophie über denen der Gruppe mit klinischer Atrophie.

Zum 2. Zeitpunkt werden geringere Farbintensitätswerte erzielt als zum 1. Zeitpunkt (vgl. Abb. 36).

Die deskriptive Statistik kann Tab. 16 entnommen werden.

Einen signifikanten Unterschied mit einer Signifikanz von $p = 0,023$ weist die Gruppe mit klinischer Atrophie beim Vergleich der beiden Zeitpunkte auf (s. Anhang).

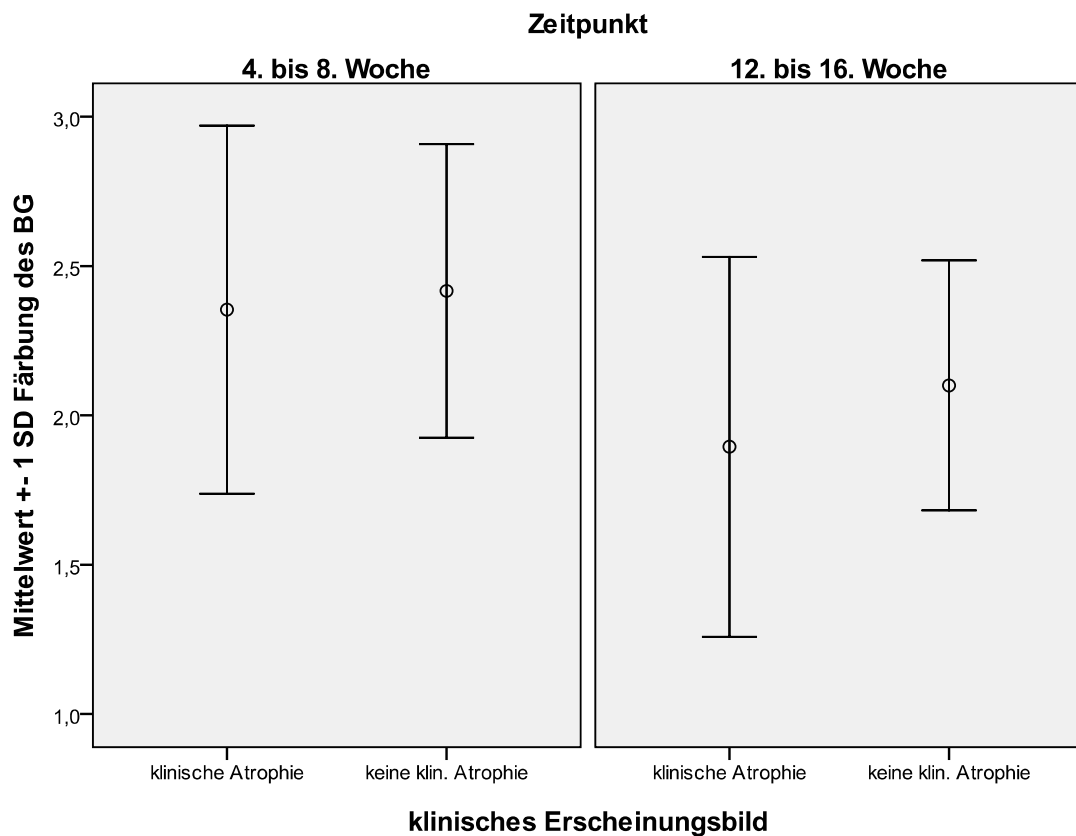


Abbildung 36: Farbintensität vom BG im Präparat nach Anfärbung von 8-Isoprostan. BG: Bindegewebe

Tabelle 16: Standardabweichungen und Mittelwerte der Farbintensität des BG im Präparat nach Anfärbung von 8-Isoprostan. N: Anzahl der Präparate; BG: Bindegewebe

Zeitpunkt (in Wochen)	Klinisches Erscheinungsbild	N	Mittelwert	Standard- abweichung
4. – 8.	klinische Atrophie	24	2,354	0,6164
	keine klin. Atrophie	6	2,417	0,4916
12. – 16.	klinische Atrophie	19	1,895	0,6364
	keine klin. Atrophie	5	2,100	0,4183

4 Diskussion

Seit der 2007 von Reuther publizierten Studie bzgl. der Konditionierung des Transplantatlagers am Schafsunterkiefer ist bekannt, dass nach 16 Wochen Einheilzeit lediglich eine Konditionierung mit Bio-Gide[®]-Membran und Bio-Oss[®] eine fast vollständige Atrophie des Transplantats verhindern kann (157). Wie bereits im Ergebnisteil beschrieben, wurde die Konditionierung mit Bio-Gide[®]-Membran und Bio-Oss[®] als „Nicht-Atrophie-Gruppe“ bezeichnet und den anderen Konditionierungen, welche in einer so genannten „Atrophie-Gruppe“ zusammengefasst wurden, gegenübergestellt. Welche Auswirkungen die unterschiedlichen Konditionierungsgruppen (Nicht-Atrophie-Gruppe vs. Atrophie-Gruppe) und die zeitliche Komponente (4 – 8 Wochen vs. 12 – 16 Wochen) auf die Expression von oxidativem Stress innerhalb der verschiedenen Knochenzellen (OZ, OB und OK) hat, wurde anhand von vier verschiedenen Biomarkern des oxidativen Stresses im Rahmen dieser Dissertation erstmalig untersucht und soll nun diskutiert werden.

Des Weiteren wurde die Anzahl der Gefäße in Knochen und Bindegewebe sowie die Menge an Bindegewebe im Präparat ebenfalls bei verschiedenen Konditionierungen und zu verschiedenen Zeitpunkten betrachtet.

Letztlich wurde noch die Farbintensität des Bindegewebes im Präparat, jeweils einzeln für die verschiedenen AK-Färbungen, entsprechend den oben genannten Parametern untersucht.

Auf Grund der teilweise sehr geringen Fallzahlen in der Gruppe „keine klinische Atrophie“ sind die Ergebnisse der Tests nur unter Vorbehalt zu interpretieren.

4.1 Färbungsintensität der Knochenzellen

Wie schon in Kap. 1.7 beschrieben, beeinflusst oxidativer Stress fundamental zelluläre Prozesse. So kann ein Anstieg von RONS (reactive oxygen and nitrogen species) Proteine, Lipide und DNA beschädigen, zum Zelltod führen oder die Aktivierung von spezifischen physiologischen Signalkaskaden triggern (46, 85, 131, 184). Aber auch das

Schicksal von Stammzellen und der Alterungsprozess beziehungsweise damit zusammenhängende altersbedingte Krankheiten, wie z.B. Osteoporose (steht mit oxidativem Stress in Verbindung). Um diese, teils ungewollten, Effekte des oxidativen Stresses zu neutralisieren, stehen dem Organismus eine Vielzahl komplizierter, antioxidativer Abwehrmechanismen zur Verfügung (s. Kap. 1.7.2). Das Überleben der Zelle hängt damit von der Fähigkeit der jeweiligen Zelle ab, sich dem oxidativen Stress zu widersetzen, sich ihm anzupassen oder die Apoptose einzuleiten (110).

Durch die Aktivierung von Signalkaskaden agieren RONS als spezifische Second-Messenger und regulieren die Balance zwischen Zellproliferation, Zelldifferenzierung, Zellzyklusarrest, Zellvergreisung und Zelltod (13). Üblicherweise führen schnelle oder vorübergehende Belastungen von RONS zu mitogenen Signalen und verursachen, wenn überhaupt, dann nur einen minimalen Zellschaden (43, 47, 198). Andauernde Aussetzungen an geringen RONS-Konzentrationen oder kurze Expositionen an hohen RONS-Konzentrationen verursachen schädliche Oxidationen, z.B. an Proteinen und DNA, was eine Zellvergreisung bzw. Apoptose initiiert (43, 46, 162).

Obwohl Almeida eine vorübergehende Stimulation von OB bei akutem ROS-Anstieg und einen Schwund von OB-Progenitorzellen bei einer Langzeit Belastung von ROS beschreibt, bleibt eine genaue quantitative Analyse der Effekte auf Redox-Signale noch aus (6). Sicher ist hingegen, dass die Dauer und das Ausmaß der oxidativen Belastung sowie der involvierte Zelltyp wichtige Faktoren sind, die bestimmen, welche Signalkaskaden aktiviert werden und welches Ergebnis als Resultat der Balance zwischen den jeweiligen Signalkaskaden widerspiegelt wird (112).

Im Hinblick auf die Knochenzellen - vorrangig den OB und OK - finden sich in der Literatur sehr unterschiedliche Ausführungen, wie diese auf oxidativen Stress reagieren. Während manche Quellen davon berichten, dass oxidativer Stress die Differenzierung und Funktion von OK steigert (50, 53) und die Differenzierung von OB unterdrückt (12, 125), zeigen andere Studien gegensätzliche Ergebnisse (vgl. 69 & 190). Erstere Studie beschrieb nach H₂O₂-induziertem oxidativen Stress zudem eine Knochenresorption am Mausschädel (50). Als wahrscheinlich gilt jedoch, dass OK und OB reziprok auf oxidativen Stress (H₂O₂-induziert), aber auch auf TGF- β und NO reagieren. Dies belegen gleich mehrere Studien (24, 44, 45).

Insgesamt bleibt die Rolle von OB und OK bei oxidativem Stress jedoch strittig, da je nach Ausmaß und Dauer der oxidativen Belastung unterschiedliche Ergebnisse zu erwarten sind. Die Beteiligung von oxidativem Stress an der Zellzyklusregulation ist schlichtweg sehr komplex, weil sie von zahlreichen biochemischen und zellulären Faktoren abhängt (29).

Da die Auswirkungen des oxidativen Stresses unter anderem über den MAPK-Weg bzw. den PKB-Signalweg vermittelt werden können, wurde die Aktivierung dieser Signalwege mittels AK gegen pERK und pAKT überprüft. Bei Nitrotyrosin und 8-Isoprostan handelt es sich um stabile Folgeprodukte von freien Radikalen. Sie dienen somit als direkte Biomarker von oxidativem Stress und wurden ebenfalls mit entsprechenden AK immunhistochemisch angefärbt (s. Kap. 1.8). Eine stärkere Anfärbung ist dabei stets mit erhöhtem oxidativen Stress verbunden, da die angefärbten Biomarker schließlich Folgeprodukte bzw. direkte Auswirkungen des oxidativen Stresses darstellen.

4.1.1 Anfärbung von pERK

Wie bereits in Kap. 1.8.1 beschrieben, kann pERK sowohl proliferativ als auch apoptotisch wirken. Eine antiapoptotische Wirkungskomponente ist ebenfalls beschrieben (89, 152, 160) (s. Abb. 12).

Bei der Anfärbung von pERK konnte in der 12. – 16. Woche bei dem Vergleich der beiden Gruppen für die OB der Nicht-Atrophie-Gruppe eine deutlich höhere Farbintensität und für die OK eine deutlich niedrigere Farbintensität bestimmt werden als bei der Gruppe mit klinischer Atrophie (vgl. Abb. 27). Da pERK als ein indirekter Marker für oxidativen Stress anzusehen ist (die Aktivierung von pERK kann auch über andere Signalwege erfolgen), könnte man diese Zu- bzw. Abnahme der Farbintensität in der Nicht-Atrophie-Gruppe mit einer gesteigerten Proliferationsbereitschaft der OB und einer reduzierten Proliferationsbereitschaft der OK in Verbindung bringen. Denn ein erhöhter Knochenabbau der Atrophie-Gruppe (hoher oxidativer Stress für OK) und eine stabile bis positive Knochenbilanz in der Nicht-Atrophie-Gruppe (hoher oxidativer Stress für OB) liegen nahe. Zudem belegen klinische Studien, dass ROS die OK-Aktivität steigert (50, 53). Klinische Ergebnisse von zuvor durchgeführten Studien

festigen diese Aussage (157). Fraglich ist jedoch die Interpretation hinsichtlich der OB, da hier in der Literatur vorrangig Thesen gefunden werden, die eine Inhibition von OB bei erhöhtem oxidativen Stress beschreiben (7, 12, 125). Hier muss jedoch betont werden, dass pERK nicht direkt auf die Höhe des oxidativen Stresses schließen lässt, da es sich lediglich um einen indirekten Marker handelt (s.o.). Die Rolle von ERK bei der Differenzierung von OB ist ebenfalls strittig, da es mehrere Studien gibt, die zeigen, dass ERK essenziell für die frühen Abschnitte der OB-Differenzierung ist (97, 192, 200). Es konnte sogar gezeigt werden, dass ERKs Runx2 phosphorylieren können und auch damit die OB-Differenzierung beeinflussen können (202). Wieder andere Studien hingegen weisen ERK eine negative Rolle in der BMP-2- und Wachstumsfaktor-induzierten OB-Differenzierung zu (69, 132). An dieser Stelle zu einer klaren Aussage zu kommen, ist somit schwierig.

Da bei der Anfärbung von pERK keine signifikanten Werte erzielt werden konnten, dürfen diese Ergebnisse nur unter Vorbehalt interpretiert werden.

4.1.2 Anfärbung von pAKT

Wie bereits in Kap. 1.8.2 beschrieben, werden durch pAKT zumeist proliferative und stark antiapoptotische Eigenschaften vermittelt (57, 89, 160) (s. Abb. 12).

Bei der Anfärbung von pAKT in der Atrophie-Gruppe konnte von der 4. – 8. zur 12. – 16. Woche ein signifikanter Farbintensitätsabfall der OB und OK verzeichnet werden (vgl. Abb. 28). Auf Grund der meist proliferativen und anti-apoptotischen Eigenschaften, kann man spekulieren, dass knöcherne Umbau- bzw. Proliferationsvorgänge, welche ja zumeist von OB und OK getragen werden, in der Gruppe mit klinischer Atrophie nach 12 – 16 Wochen nur noch reduziert stattgefunden haben.

Nicht signifikant war der Farbintensitätsabfall der OK in der Nicht-Atrophie-Gruppe vom 1. zum 2. Zeitpunkt (vgl. Abb. 28). Hier könnte die verminderte Färbereaktion der OK mit einem reduzierten Knochenabbau in der 12. – 16. Woche in Verbindung stehen. Dabei dürfte es auf Grund der nicht vorhandenen oder nur geringen knöchernen Atrophie zu einem verstärkten Knochenanbau kommen.

Gleich mehrere Studien beschreiben eine stimulierende Wirkung von ROS auf OK (6, 15, 111), und auch eine reduzierte OB-Differenzierung sowie erhöhte Bereitschaft von OB zur Apoptose unter ROS-Einwirkung kann in der Literatur gefunden werden (6).

Durch die Farbintensitätsmessung von pAKT in den einzelnen Knochenzellen wurden Signalwege detektiert, die einen Hinweis auf eine verstärkte bzw. reduzierte ROS-Aktivität geben können. Eine verminderte Färbungsintensität der OK in der Nicht-Atrophie-Gruppe zum 2. Zeitpunkt könnte somit eine verringerte ROS-Aktivität vermuten lassen, was wiederum für eine herabgesetzte OK-Aktivität sprechen würde. In Zusammenschau mit den Resultaten aus den klinischen Untersuchungen von Reuther aus dem Jahr 2007 erscheinen diese Schlussfolgerungen logisch und übereinstimmend (157).

4.1.3 Anfärbung von Nitrotyrosin

Wie bereits in Kap. 1.8.3 beschrieben, kann Nitrotyrosin als biologischer Marker für die Präsenz von Peroxynitrit (PN) *in vivo* angesehen werden (187), welches in Abhängigkeit von Stickstoffmonoxid (NO) und dem Superoxid-Anion entsteht (183). NO wiederum kann durch die konstitutiven NO-Synthasen (NOS) eNOS und nNOS oder durch die induzierbare NOS (iNOS) gebildet werden und ist maßgeblich am Knochenmetabolismus beteiligt (19, 151) (s. Kap. 1.7.1). Kleine, aber stetige Mengen NO werden über eNOS und nNOS gebildet und stimulieren OB in Proliferation und Funktion (123), wohingegen iNOS meist unter dem Einfluss von proinflammatorischen Zytokinen in OB exprimiert wird und damit eine große Menge an NO bereitstellt, welche mit einer gesteigerten Knochenresorption einhergeht (150). Ein Anstieg des NO-Gehalts in OB kann somit die OK-Genese und -Differenzierung triggern (31).

Bei der Anfärbung von Nitrotyrosin in der Atrophie-Gruppe konnte von der 4. – 8. zur 12. – 16. Woche ein signifikanter Farbintensitätsabfall der OB und ein nicht signifikanter Farbintensitätsabfall der OK verzeichnet werden (vgl. Abb. 29).

Daraus kann man schlussfolgern, dass knöcherne Umbau- bzw. Proliferationsvorgänge, welche insbesondere von OB und OK getragen werden, in der Gruppe mit klinischer Atrophie nach 12 – 16 Wochen nur noch reduziert stattgefunden haben.

Auch diese Resultate decken sich mit den klinischen Untersuchungen von Reuther (157).

Ebenfalls signifikant war die erhöhte Farbintensität von OB und OK der Nicht-Atrophie-Gruppe im Vergleich zur Gruppe mit klinischer Atrophie zum 2. Zeitpunkt (vgl. Abb. 29). Hier ist die erhöhte Reaktions- bzw. Proliferationsbereitschaft von OK und OB auf die noch vorhandenen Umbauvorgänge im knöchernen Augmentat zurückzuführen, welche nach der 12. – 16. Woche in der Atrophie-Gruppe nur noch sehr reduziert vorzufinden sind.

Vergleichbare Erkenntnisse können in der Literatur nur bedingt belegt werden. So finden wir Quellen, die nitrosativen Stress, also ein erhöhtes Vorkommen von PN, mit einer Inhibition der OB-Proliferation und –Differenzierung sowie mit der Induzierung der Apoptose in Verbindung bringen (32, 36, 84). Andere Quellen haben gezeigt, dass eine verheilende Dentinwunde mit einem synchronen Anstieg von iNOS und Nitrotyrosine vergesellschaftet ist (123). Zugleich wurde betont, dass die Dentinogenese und Osteogenese sehr ähnliche Prozesse seien (204). Kelpke et al konnten 2001 zeigen, dass FGF-1 (fibroblast growth factor) zytotoxische Effekte von PN verhindern konnte (88). Da FGF-1 neben Zytokinen bei Einwirkung von oxidativem bzw. nitrosativem Stress oder nach Wundsetzung freigesetzt wird, ist es somit durchaus wahrscheinlich, dass sowohl OB als auch OB-Vorläuferzellen durch die zytotoxischen Effekte von PN verschont wurden (139, 140, 172). Des Weiteren kann auch eine längerfristige NO-Aussetzung einen protektiven Effekt für OB gegenüber den schädlichen Auswirkungen des oxidativen Stresses haben (25).

4.1.4 Anfärbung von 8-Isoprostan

Bei der Anfärbung von 8-Isoprostan konnte von der 4. – 8. zur 12. – 16. Woche in der Atrophie-Gruppe ein nicht signifikanter Farbintensitätsabfall der OB und OK verzeichnet werden (vgl. Abb. 30). Da 8-Isoprostan als ein sehr spezifischer und stabiler Parameter des oxidativen Stresses gewertet werden kann (s. Kap. 1.8.4), ist auch hier auf Grund des verminderten oxidativen Stresses davon auszugehen, dass knöcherne

Umbau- bzw. Proliferationsvorgänge in der Gruppe mit klinischer Atrophie nach 12 – 16 Wochen nur noch reduziert stattgefunden haben.

Diese Resultate werden wiederum von den klinischen Ergebnissen der von Reuther 2007 durchgeführten Studie gestützt (157).

Nicht signifikant war ebenfalls der Farbintensitätsabfall der OB in der Nicht-Atrophie-Gruppe vom 1. zum 2. Zeitpunkt (vgl. Abb. 30).

Dies erscheint logisch, da man eine erhöhte Belastung von ROS mit einer verringerten Lebens- bzw. Funktionsfähigkeit der OB in Verbindung bringen kann (145). Andere Studien beschreiben ähnliche Auswirkungen, wie einen behinderten Kalzifizierungsprozess der OB, eine Inhibition der Proliferation und Differenzierung von OB-Vorläuferzellen bis hin zur Apoptose von OB (6, 68, 178). Noch konkreter werden Studien von Tintut und Parhami, welche ein erhöhtes Vorkommen von Produkten der Lipid-Peroxidation, sprich 8-Isoprostan, direkt mit einer Inhibierung der OB-Differenzierung in Verbindung bringt und zeitgleich eine gesteigerte OK-Differenzierung beschreibt (144, 181).

Da man in der oben beschriebenen Situation einen Abfall von 8-Isoprostan bei den OB der Nicht-Atrophie-Gruppe zum 2. Zeitpunkt beobachten kann, ist hier mit einer regen Aktivität der OB zu rechnen, d.h. die Knochenanbauvorgänge im Augmentat könnten anhalten.

Ergänzend ist zu erwähnen, dass Advanced glycation end-products (AGEs) ebenfalls als wichtige Marker des oxidativen Stresses zu beachten sind. Hier wird ein ähnliches Verhalten wie bei Produkten der Lipid-Peroxidation beschrieben: AGEs induzieren die Apoptose in OB und haben schädliche Effekte auf OB-Wachstum und Funktion (5, 116, 117).

4.1.5 Vergleich der Antikörper

Vergleichen wir die Färbungsintensität von OZ, OB und OK der jeweiligen AK-Färbung, so können wir teilweise deutliche Unterschiede feststellen.

Die Anfärbungen von pERK und pAKT erscheinen ähnlich, hier weisen jeweils die OB die höchste Färbungsintensität auf, gefolgt von OK und OZ (vgl. Abb. 27 und 28). Dass

die Farbintensitätsreihenfolge bei pERK und pAKT identisch ist, erscheint verständlich, da es sich hier um zwei sehr ähnliche und teilweise sogar vernetzte bzw. identische Signalwege handelt (s. Kap. 1.8.1 und 1.8.2). Trotzdem können pERK und pAKT unterschiedliche Effekte hervorrufen, da ihre jeweiligen Bindungseigenschaften sehr unterschiedlich sein können. Des Weiteren ist gut nachzuvollziehen, dass der oxidative Stress in OB und OK höher ist als in den OZ. Schließlich haben wir es sowohl in der Atrophie- als auch in der Nicht-Atrophie-Gruppe mit knöchernen Umbauvorgängen zu tun, die natürlich primär von OB und OK getragen werden.

Die Anfärbung von Nitrotyrosin zeigt ein anderes Bild. Hier weisen die OK die höchste Färbungsintensität auf, gefolgt von OB und OZ (vgl. Abb. 29). Da hier ein anderer Signalweg vorliegt als bei pERK bzw. pAKT (Nitrotyrosin ist ein stabiles Folgeprodukt von freien Radikalen), ist dies nicht erstaunlich (s. Kap. 1.8.3). Was die höhere Belastung von oxidativem Stress für OK und OB gegenüber den OZ angeht, so gilt hier gleiches wie oben für pERK und pAKT beschrieben.

Die Anfärbung von 8-Isoprostan zeigt ebenfalls ein anderes Muster. Hier weisen die OZ die höchste Färbungsintensität auf, gefolgt von OB und OK (vgl. Abb. 30). Für 8-Isoprostan gilt ähnliches wie für Nitrotyrosin; auch hierbei handelt es sich um ein stabiles Folgeprodukt von freien Radikalen. Im Gegensatz zu Nitrotyrosin, welches aus einer Reaktion mit Peroxynitrit entsteht, werden 8-Isoprostane durch Lipid-Peroxidation gebildet (s. Kap 1.8.3 und 1.8.4). Diese unterschiedlichen Entstehungswege können erklären, weshalb die Färbungsintensitätsreihenfolge bei 8-Isoprostanen anders aussieht als beim Nitrotyrosin, dessen Bildung ja im Gegensatz zum 8-Isoprostan stark NO-abhängig ist. Des Weiteren dürften die am Erhalt des neu gebildeten Knochens beteiligten OZ eine hohe Affinität zu 8-Isoprostanen aufweisen. Generell gilt für OZ nämlich ähnliches wie für OB: Beide reagieren auf einen Anstieg von RONS mit einer erhöhten Apoptoserate (6, 7).

4.2 Gefäßanzahl in Bindegewebe und Knochen

Da das Überleben eines freien Knochentransplantates neben seiner Ernährung durch die Diffusion aus dem knöchernen und weichgewebigen Transplantatlager insbesondere

von dem Ausmaß der Geschwindigkeit der Revaskularisierung abhängt (49), wurde im Rahmen der Auswertung der Paraffinschnitte die Gefäßanzahl in BG und Knochen bestimmt.

Die Revaskularisierung wiederum zeigt sich von der Architektur des Transplantates abhängig. So weisen spongiöse Knochentransplantate zwar eine geringe mechanische Stabilität auf, können jedoch durch die reichlich vorhandenen OB am Empfängerort eine osteogene und osteoinduktive Potenz entfalten (21). Kortikale Transplantate zeigen hingegen bei guter mechanischer Belastbarkeit nur reduzierte osteoinduktive Eigenschaften (136). Da die Knochenneubildung durch Differenzierung von osteogenen Zellen aus mesenchymalen Stammzellen (Osteoinduktion) in der Kompakta nur eingeschränkt möglich ist, muss eine adäquate nutritive Versorgung primär durch Diffusion und/aus dem umgebenden Weichgewebe (Periost) stattfinden (s. Kap. 1.1.2). Um ein möglichst gutes Einheilen der Transplantate zu gewährleisten, wurden die monokortikalen Knochenblöcke (bestehend aus Spongiosa und Kompakta), wie bereits in Kap. 2.2.1.4 beschrieben, spongiosaseitig auf die Kortikalis des Transplantatlagers aufgebracht, da nur so die gewünschte osteogene und osteoinduktive Potenz der (Transplantat-) Spongiosa voll entfaltet werden kann.

Die Tatsache, dass eine enge Interaktion zwischen Gefäßversorgung und Osteogenese besteht, konnte durch den Nachweis, dass bovine Knochenzellen Wachstumsfaktoren synthetisieren (55), welche unter anderem die Angiogenese induzieren (8), deutlich bewiesen werden.

Da besonders der Grad der Vaskularisation für die Osteogenese von Bedeutung ist (79), passt auch der signifikante Abfall der Gefäßanzahl im BG der Atrophie-Gruppe in der 12. – 16. Woche gegenüber Woche 4 – 8 (vgl. Abb. 31).

Ebenfalls logisch erscheinen die nicht signifikanten Unterschiede der Atrophie-Gruppe gegenüber der Nicht-Atrophie-Gruppe zum 2. Zeitpunkt. Hier weist die Gruppe ohne klinische Atrophie eine größere Gefäßanzahl sowohl im BG als auch im Knochen auf. Dies erscheint schlüssig, da man eine ausbleibende Gefäßentwicklung mit der Atrophie in Verbindung bringen kann (vgl. Abb. 31).

Vergleicht man die knöchernen Gefäßanzahl der Gruppe ohne klinische Atrophie, so ist hier in der 12. – 16. Woche im Vergleich zum 1. Zeitpunkt ebenfalls eine nicht signifikante Steigerung der Gefäßanzahl zu vermerken (vgl. Abb. 31), was wiederum

dafür spricht, dass die Vermeidung von knöcherner Atrophie nur mit einer Neovaskularisation, sprich einer Wiederherstellung des Blutflusses, einhergehen kann (102).

Insgesamt scheint es, dass die Präparate der Atrophie-Gruppe nach 12 – 16 Wochen wenig Aktivierung zeigen, was man als fehlende Proliferation und fehlenden Umbau deuten kann, während bei den Präparaten der Nicht-Atrophie-Gruppe noch aktive Umbau- und Wachstumsprozesse des Knochens im und um das Transplantat vorliegen.

Da durch eine selektive Beeinflussung der Vaskularisation die Osteogenese gefördert werden kann, erfolgten bereits Untersuchungen zur gerichteten Stimulation mit Wachstumsfaktoren aus einem Knochenersatzmaterial (94, 159). Dabei stellte sich heraus, dass vor allem das angiogene Protein VEGF₁₆₅ (Vascular epithelial growth factor) im Regelkreis der Knochenbildung eine zentrale Rolle spielt, indem es durch lokale Freisetzung die Gefäßanzahl steigert und die Osteogenese verstärkt (80). VEGF₁₆₅ stellt damit, neben Angiopoietin (hat gemeinsam mit VEGF eine additive Wirkung auf die Angiogenese) und den FGFs (= Fibroblast growth factors; Mitogen für Osteoblasten und Chondrozyten), einen sehr wichtigen Faktor für die Knochenneuf ormation dar (143).

Durch eine externe Zufuhr von angiogenen Faktoren wäre somit das Risiko einer Knochenatrophie auf Grund mangelnder Gefäßeinsprossung zu verhindern bzw. einzuschränken. Voraussetzungen hierfür sind natürlich die Wahl des richtigen Zeitpunktes, der optimalen Konzentration und die Berücksichtigung des Carrier-Freisetzungsmodus (80).

4.3 Menge an Bindegewebe im Präparat

Nach der Auswertung der Paraffinschnitte nimmt die Menge an BG im Präparat vom 1. zum 2. Zeitpunkt hin signifikant ab. Dies trifft gleichermaßen auf die Gruppe mit klinischer Atrophie wie auch auf die Gruppe ohne klinische Atrophie zu (vgl. Abb. 32). Der Bindegewebsabnahme liegen jedoch ziemlich wahrscheinlich unterschiedliche Ursachen zu Grunde. So kann man bei der Atrophie-Gruppe davon ausgehen, dass sich

in Folge der voranschreitenden Atrophie der Augmentate in der 12. – 16. Woche nicht nur die Menge der knöchernen Substanz, sondern damit korrelierend auch die Menge des BG im Präparat verringern. Dies deckt sich auch mit der Erkenntnis aus Kap. 4.2, wo deutlich wurde, dass es in der Atrophie-Gruppe zum 2. Zeitpunkt zu einer signifikanten Abnahme der Gefäße im BG kommt.

Für die Nicht-Atrophie-Gruppe dürfte diese Begründung nicht zutreffen. Hier ist es sinnvoller, die Bindegewebsabnahme mit einer anfänglichen Kompetition zwischen knöcherner Regeneration und einwachsendem BG zu begründen (s. Kap. 1.1.5), welche dann in der 12. – 16. Woche zu Gunsten der knöchernen Regeneration ausfällt (35). Die nicht signifikante Zunahme der Gefäße im Knochen der Nicht-Atrophie-Gruppe zum 2. Zeitpunkt hin dürfte diese Begründung untermauern (s. Kap. 4.2).

Da sowohl die Atrophie- als auch die Nicht-Atrophie-Gruppe zum 1. Zeitpunkt in etwa die gleiche Menge an BG im Präparat aufweisen, kann davon ausgegangen werden, dass hier in den ersten Wochen des Untersuchungszeitraums keine nennenswerten Unterschiede in den beiden Gruppen vorliegen (vgl. Abb. 32).

4.4 Färbungsintensität des Bindegewebes im Präparat

Sowohl die Anfärbung von pERK, pAKT und auch von 8-Isoprostan zeigen in der Atrophie-Gruppe in der 12. – 16. Woche einen signifikanten Abfall der Färbungsintensität des BG im Präparat im Vergleich zur 4. – 8. Woche (vgl. Abb. 33, 34 und 36). Ähnliches trifft auch für die Anfärbung von Nitrotyrosin zu, wenngleich der Färbungsintensitätsunterschied hier nicht signifikant ausfällt (vgl. Abb. 35). Insgesamt ist demnach zu konstatieren, dass die Färbungsintensität des BG im Präparat in der Gruppe mit klinischer Atrophie zum 2. Zeitpunkt hin deutlich abnimmt.

Da die verwendeten AK allesamt indirekte Marker für oxidativen Stress darstellen, liegt die Vermutung nahe, dass im BG der Präparate der Atrophie-Gruppe zum 2. Zeitpunkt ein deutlich reduziertes oxidatives Stresspotenzial gegenüber dem 1. Zeitpunkt vorhanden ist.

Grundsätzlich ist zu sagen, dass sämtliche Umbau-, sprich Proliferationsvorgänge, mit einem erhöhten oxidativen Stresspotenzial vergesellschaftet sind (29, 40, 75). Wie

bereits in Kap. 1.1.5 beschrieben, agieren knöcherner Regeneration und einwachsendes BG kompetitiv. Aus diesem Grund kann hier, auch wenn nur explizit der oxidative Stress im BG des Präparats nachgewiesen wurde, von knöchernen und bindegewebigen Umbauvorgängen gesprochen werden.

Ist, wie in diesem Fall, das oxidative Stresspotenzial deutlich reduziert, so ist davon auszugehen, dass vorhandene (knöcherner und bindegewebige) Umbauvorgänge weitestgehend zum Erliegen gekommen sind. Dies würde auch mit den klinischen Ergebnissen der Untersuchungen von Reuther 2007 übereinstimmen, wo nach Augmentation am Schafskiefer in der 12. – 16. Woche post OP keine nennenswerten Umbauvorgänge in der Atrophie-Gruppe mehr nachgewiesen werden konnten (157).

Es ist also davon auszugehen, dass in der Gruppe mit klinischer Atrophie sowohl knöcherner als auch bindegewebige Umbauvorgänge zum 2. Zeitpunkt auf Grund einer stark vorangeschrittenen Atrophie der Augmentate nur noch reduziert vorhanden sind.

5 Zusammenfassung

Es ist bekannt, dass durch chirurgische Modifikation des Transplantatlagers eine Atrophie des knöchernen Transplantats bzw. Augmentats in der Mund- Kiefer- und Gesichtschirurgie verhindert bzw. verringert werden kann. Dies zeigte auch Reuther 2007 in einer Studie bzgl. der Konditionierung des Transplantatlagers am Schafsinferkiefer. Hier konnte gezeigt werden, dass nach 16 Wochen Einheilzeit lediglich eine Konditionierung mit Bio-Gide[®]-Membran und Bio-Oss[®] eine fast vollständige Atrophie des Transplantats verhindern kann.

Ziel der vorliegenden Untersuchung war es, die Rolle des oxidativen Stresses bei der Einheilung von knöchernen Transplantaten zu verschiedenen Konditionierungen in vivo im Schafmodell anhand von immunhistochemisch angefärbten Knochenschnitten zu untersuchen.

Zu diesem Zweck wurde die Konditionierung mit Bio-Gide[®]-Membran und Bio-Oss[®] als „Nicht-Atrophie-Gruppe“ bezeichnet, da klinisch keine Atrophie des autologen Knochentransplantates zu erkennen war, und der „Atrophie-Gruppe“ gegenübergestellt, welche sich aus vier anderen Konditionierungen zusammensetzte: Konditionierung I: Kortikospongiosa + Schraubenfixation; Konditionierung II: Perforation des Transplantatlagers + Schraubenfixation; Konditionierung III: Schraubenfixation + Periostexzision; Konditionierung IV: Schraubenfixation + Membran. Nach klinischer Auswertung wurden Paraffinschnitte hergestellt und immunhistochemisch angefärbt, um die Auswirkungen der unterschiedlichen Konditionierungsgruppen (Nicht-Atrophie-Gruppe vs. Atrophie-Gruppe) und der zeitlichen Komponente (4 – 8 Wochen vs. 12 – 16 Wochen Einheilzeit) auf die Expression von oxidativem Stress innerhalb der verschiedenen Knochenzellen (Osteozyten (OZ), Osteoblasten (OB) und Osteoklasten (OK)) zu untersuchen. Da sich die Auswirkungen des oxidativen Stresses über den MAPK-Weg bzw. den PKB-Signalweg manifestieren können, wurde die Aktivierung dieser Signalwege mittels Antikörper gegen pERK und pAKT überprüft. Bei Nitrotyrosin und 8-Isoprostan handelt es sich um stabile Folgeprodukte von freien Radikalen. Sie dienen somit als direkte Biomarker von oxidativem Stress und wurden ebenfalls mit entsprechenden Antikörpern immunhistochemisch angefärbt.

Bei der Anfärbung von pAKT und Nitrotyrosin in der Atrophie-Gruppe konnte vom frühen Einheilzeitpunkt (4 – 8 Wochen) zum späten Einheilzeitpunkt (12 – 16 Wochen) hin ein signifikanter Farbintensitätsabfall der OB und OK (bei Nitrotyrosin nicht signifikant) verzeichnet werden. Daraus kann man schlussfolgern, dass knöcherne Umbau- bzw. Proliferationsvorgänge, welche insbesondere von OB und OK getragen werden, in der Gruppe mit klinischer Atrophie nach 12 – 16 Wochen nur noch reduziert stattgefunden haben. Ebenfalls signifikant war die erhöhte Farbintensität von OB und OK der Nicht-Atrophie-Gruppe im Vergleich zur Gruppe mit klinischer Atrophie in der 12. – 16. Woche. Hier könnte die erhöhte Reaktions- bzw. Proliferationsbereitschaft von OK und OB auf die noch vorhandenen Umbauvorgänge im knöchernen Augmentat zurückzuführen sein, welche nach der 12. – 16. Woche in der Atrophie-Gruppe nur noch sehr reduziert vorzufinden sind. Bei den Anfärbungen von pERK und 8-Isoprostan konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Unter Berücksichtigung der Literatur kann übereinstimmend mit den vorliegenden Ergebnissen gesagt werden, dass oxidativer Stress fundamental zelluläre Prozesse beeinflusst. Ferner gilt es als wahrscheinlich, dass OK und OB reziprok auf oxidativen Stress reagieren. Gleich mehrere Studien beschreiben eine stimulierende Wirkung von ROS auf OK. OB scheinen hingegen unter ROS-Einwirkung ihre Differenzierung zu reduzieren und ihre Apoptosebereitschaft zu erhöhen. Für OZ gilt ähnliches wie für OB: Auch sie reagieren auf einen Anstieg von RONS mit einer erhöhten Apoptoserate. Insgesamt bleibt die Rolle von OB, OK und OZ bei oxidativem Stress jedoch strittig, da je nach Ausmaß und Dauer der oxidativen Belastung unterschiedliche Ergebnisse zu erwarten sind. Ursache hierfür ist möglicherweise, dass die Beteiligung von oxidativem Stress an der Zellzyklusregulation sehr komplex ist; sie hängt von zahlreichen biochemischen und zellulären Faktoren ab.

Des Weiteren wurde die Anzahl der Gefäße in Knochen und Bindegewebe (BG) sowie die Menge an Bindegewebe im Präparat ebenfalls bei verschiedenen Konditionierungen und zu verschiedenen Zeitpunkten betrachtet. Hier konnte ein signifikanter Abfall der Gefäßanzahl im BG der Atrophie-Gruppe zur 12. – 16. Woche hin beobachtet werden, da besonders der Grad der Vaskularisation für die Osteogenese von Bedeutung ist. Ebenfalls logisch erscheinen die nicht signifikanten Unterschiede der Atrophie-Gruppe gegenüber der Nicht-Atrophie-Gruppe zum späten (Einheil-) Zeitpunkt. Hier weist die

Gruppe ohne klinische Atrophie eine größere Gefäßanzahl sowohl im BG als auch im Knochen auf. Dies erscheint schlüssig, da man eine ausbleibende Gefäßentwicklung mit der Atrophie in Verbindung bringen kann. Insgesamt scheint es, dass die Präparate der Atrophie-Gruppe nach 12 – 16 Wochen wenig Aktivierung zeigen, was man als fehlende Proliferation und fehlenden Umbau deuten kann, während bei den Präparaten der Nicht-Atrophie-Gruppe noch aktive Umbau- und Wachstumsprozesse des Knochens im und um das Transplantat vorliegen. Bei der Menge an BG im Präparat konnte vom frühen zum späten Zeitpunkt in beiden Gruppen ein signifikanter Abfall verzeichnet werden. Der Bindegewebsabnahme liegen jedoch vermutlich unterschiedliche Ursachen zu Grunde. So kann man bei der Atrophie-Gruppe davon ausgehen, dass sich in Folge der voranschreitenden Atrophie der Augmentate in der 12. – 16. Woche nicht nur die Menge der knöchernen Substanz, sondern damit korrelierend auch die Menge des BG im Präparat verringern. Dies deckt sich auch mit der signifikanten Abnahme der Gefäße im BG der Atrophie-Gruppe zum späten Einheilzeitpunkt. Bei der Nicht-Atrophie-Gruppe liegt die Bindegewebsabnahme wohl an einer anfänglichen Kompetition zwischen knöcherner Regeneration und einwachsendem BG, welche dann in der 12. – 16. Woche zu Gunsten der knöchernen Regeneration ausfällt.

Letztlich wurde noch die Farbintensität des Bindegewebes im Präparat, jeweils einzeln für die verschiedenen AK-Färbungen, entsprechend den oben genannten Parametern untersucht. Insgesamt ist hier zu beobachten, dass die Färbungsintensität des BG im Präparat in der Gruppe mit klinischer Atrophie zum späten Zeitpunkt hin signifikant abnimmt. Dies lässt darauf schließen, dass im BG der Atrophie-Gruppe zum späten Zeitpunkt ein deutlich reduziertes oxidatives Stresspotenzial gegenüber dem frühen Zeitpunkt vorhanden ist. Da sämtliche Umbau- bzw. Proliferationsvorgänge mit einem erhöhten oxidativen Stresspotenzial vergesellschaftet sind, ist davon auszugehen, dass in der Gruppe mit klinischer Atrophie sowohl knöcherne als auch bindegewebige Umbauvorgänge zum späten Einheilzeitpunkt auf Grund einer stark vorangeschrittenen Atrophie der Augmentate nur noch reduziert vorhanden sind.

Zusammenfassend kann davon ausgegangen werden, dass nach 12 – 16 Wochen in der Atrophie-Gruppe knöcherne Umbauvorgänge im Vergleich zu Nicht-Atrophie-Gruppe nur noch sehr reduziert stattfinden. Die histologischen Erkenntnisse der aktuellen Untersuchung decken sich mit den klinischen Ergebnissen von Reuther aus dem Jahre

2007. Auf Grund der teilweise sehr geringen Fallzahlen in der Gruppe „keine klinische Atrophie“ sind weitere Untersuchungen nötig, um diese Ergebnisse zu untermauern.

6 Literaturverzeichnis

- 1 Adeyemo WL, Reuther T, Bloch W, Korkmaz Y, Fischer JH, Zöller JE, Kübler AC; 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* 2008 (37): 651-659
- 2 Adeyemo WL, Reuther T, Bloch W, Korkmaz Y, Fischer JH, Zöller JE, Kübler AC; Influence of host periosteum and recipient bed perforation on the healing of onlay mandibular bone graft: an experimental pilot study in the sheep; *Oral Maxillofac Surg* 2008 (12): 19-28
- 3 Aldinger G, Beyer A, Schmid U, Herr G; Grundsätzliche Aspekte der osteoinduktiven Aktivität von Knochengewebe und Möglichkeiten ihrer klinischen Anwendung; *Z Orthop* 1996 (134): 205-209
- 4 Alfassi; ZB (Hrsg): *General Aspects of the Chemistry of Radicals*; John Wiley & Sons Inc., Chichester 1999
- 5 Alikhani M, Alikhani Z, Boyd C, MacLellan CM, Raptis M, Liu R; Advanced glycation endproducts stimulate osteoblast apoptosis via the MAP kinase and cytosolic apoptotic pathways; *Bone* 2007 (40): 345-353
- 6 Almeida M, Han L, Martin-Millan M, O'Brien CA, Manolagas SC; Oxidative Stress antagonizes Wnt Signaling in Osteoblast Precursors by diverting β -Catenin from T Cell Factor – to Forkhead Box O – mediated Transcription; *J of Biol Chem* Vol 282 (37): 27298-27305; 2007
- 7 Almeida M, Han L, Martin-Millan M, Plotkin LI, Stewart SA, Roberson PK, Kousteni S, O'Brien CA, Bellido T, Parfitt AM, Weinstein RS, Jilka RL, Manolagas SC; Skeletal Involution by Age-associated Oxidative Stress and its Acceleration by Loss of Sex Steroids; *J Biol Chem* Vol 282 (37): 27285-27297; 2007
- 8 Arnold F, West DC; Angiogenesis in wound healing; *Pharmacol Ther* 1991 (52): 407-422
- 9 Aruoma OI; Free radicals and antioxidant strategies in sports (review); *J Nutr Biochem* 5 (1994): 370-381
- 10 Asmus KD, Bonifac M; Free Radical chemistry; Sen CK, Packer L, Hanninen (Hrsg): *Handbook of oxidants and antioxidants in exercise*; Elsevier, Amsterdam 2000: 3-54

- 11 Axhausen C; Die histologischen und klinischen Gesetze der freien Osteoplastik auf Grund von Tierversuchen; Langenbecks Arch Klein Chir 88: 23-145; 1908
- 12 Bai X, Lu D, Bai J, Zheng H, Ke Z, Li X, Luo S; Oxidative Stress inhibits osteoblastic differentiation of bone cells by ERK and NF- κ B; Biochem and Biophys Res Com 2004 (314): 197-207
- 13 Bauer TW, Muschler GF; Bone graft materials - An overview of the basic science; Clin Orthop Relat Res (371): 10-27; 2000
- 14 Beckmann JS, Koppenol WH; Nitric oxide, superoxide and peroxynitrite: the good, the bad and the ugly; Am J Physiol 271 (1996): 1424-1437
- 15 Behl C; Estrogen can protect neurons: modes of action; J. Steroids Biochem. Mol. Biol. 2003 (83): 195-197
- 16 Bloch W, Renner RR; Freie Radikale und oxidativer Stress - Peroxiredoxin als Radikalenpuffer im Myokard und Skelettmuskel unter körperlicher Belastung; Dissertation, Köln 2008
- 17 Boyne PJ, Mikels TE; Restauration of alveolar ridges by intramandibular transposition osseous grafting; J Oral Surg 26 (9): 569-576; 1968
- 18 Boyne PJ; Restauration of osseous defects in maxillofacial casualties; J Am Dent Assoc 78 (4): 767-776; 1969
- 19 Brandi ML, Hukkanen M, Umeda T, Moradi-Bidhendi N, Bianchi S, Gross SS, Polak JM, MacIntyre I; Bidirectional regulation of osteoclast function by nitric oxide synthase isoforms; Proc Natl Acad Sci USA 1995 (92): 2954-2958
- 20 Bullon P, Morillo JM, Ramirez-Tortosa MC, Quiles JL, Newman HN, Battino M; Metabolic Syndrome and Periodontitis: Is Oxidative Stress a Common Link?; J Dent Res 2009 (88): 503-519
- 21 Burchardt H; The biology of bone graft repair; Clin Orthop Relat Res 1983 (174): 28-42
- 22 Caballero-Alias AM, Loveridge N, Lyon A, Das-Gupta V, Pitsillides A, Reeve J; NOS isoforms in adult human osteocytes: multiple pathways of NO regulation?; Calcif Tissue Int 75 (1): 78-84; 2004
- 23 Ceconi C, Curello S, Cargnoni A, Ferrari R, Albertini A, Visioli O; The role of glutathione status in the protection against aschemic and reperfusion damage: effects of N-acetylcysteine; J Mol Cell Cardiol 1988 (20): 5-13
- 24 Chae HJ, Park RK, Chung HT, Kang JS, Kim MS, Choi DY, Bang BG, Kim HR; Nitric oxide is a regulator of bone remodeling; J. Pharm. Pharmacol 1997 (49): 897-902

- 25 Chang C, Liao Y, Lin Y, Chen R; Nitric Oxide Protects Osteoblasts from Oxidative Stress-Induced Apoptotic Insults via a Mitochondria-Dependent Mechanism; *J Orthop Res* 2006 (Oct): 1917-1925
- 26 Chen EY, Mazure NM, Cooper JA, Giaccia AJ; Hypoxia activates a platelet-derived growth factor receptor/phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway that results in glycogen synthase kinase-3 inactivation; *Cancer Res* 2001 (61): 2429-2433
- 27 Claes L, Wolf S, Augat P; Mechanische Einflüsse auf die Callusheilung; *Der Chirurg* 2000 (71): 989-994
- 28 Coffey PJ, Jin J, Woodgett JR; Protein kinase B (c-Akt): a multifunctional mediator of phosphatidylinositol 3-kinase activation; *Biochem J* 1998 (Pt 1): 1-13
- 29 Cotgreave IA, Gerdes RG; Recent trends in glutathione biochemistry - glutathione-protein interactions: A molecular link between oxidative stress and cell proliferation?; *Biochem Biophys Res Com* 1998 (242): 1-9
- 30 Crossthwaite AJ, Hasan S, Williams RJ; Hydrogen peroxide-mediated phosphorylation of ERK1/2, Akt/PKB and JNK in cortical neurones: dependence on Ca²⁺ and PI3-kinase; *J Neurochem* 2002 (80): 24-35
- 31 Cuzzocrea S, Mazzon E, Dugo L, Genovese T, Di Paola R, Ruggeri Z, Vegeto E, Caputi AP, van de Loo FAJ, Puzzolo D, Maggi A; Inducible Nitric Oxide Synthase Mediates Bone Loss in Ovariectomized Mice; *Endocrinology* 144 (3): 1098-1107; 2003
- 32 da Rocha FAC, de Brum-Fernandes AJ; Evidence that Peroxynitrite affects human Osteoblast proliferation and differentiation; *J of Bone and Mineral Res* Vol 17 (23): 434-442; 2002
- 33 Dahlin C, Alberius P, Linde A; Osteopromotion for cranioplasty - An experimental study in rats using a membrane technique; *J Neurosurg* 74 (3): 487-491; 1991
- 34 Dahlin C, Gottlow J, Linde A, Nyman S; 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; 1990
- 35 Dahlin C, Linde A, Gottlow J, Nyman S; Healing of Bone Defects by Guided Tissue Regeneration; *American Society of Plastic Surgeons* 1988 (Vol 81): Issue 5
- 36 Damoulis PD, Hauschka PV; Nitric oxide acts in conjunction with proinflammatory cytokines to promote cell death in osteoblasts; *J Bone Miner Res* 1997 (12): 412-421

- 37 Datta SR, Brunet A, Greenberg ME; Cellular survival: a play in three Akts; *Genes Dev* 1999: 2905-2927
- 38 Davies KJA; Oxidative stress: The paradox of aerobic life; *Biochem Soc Symp* 61 (1995): 1-31
- 39 De Boer H; Early Research on bone transplantation - In: Aebiund M, Regazzoni P, eds; *Bone Transplantation*; Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, pp. 7-19; 1998
- 40 Dong F, Zhang X, Wold LE, Ren Q, Zhang Z, Ren J; Endothelin-1 enhances oxidative stress, cell proliferation and reduces apoptosis in human umbilical vein endothelial cells: role of ETB receptor, NADPH oxidase and caveolin-1; *Br J Pharmacol* 2005 (145): 323-333
- 41 Dröge W; Free radicals in the physiological control of cell function; *Physiol Rev* 2002 (47): 47-95
- 42 Ducrocq C, Blanchard B, Pignatelli B, Ohshima H; Peroxynitrite: An endogenous oxidizing and nitrating agent; *Cell Mol Life Sci* 55 (1999): 1068-1077
- 43 Dypbukt JM, Ankarcrona M, Burkitt M, Sjöholm A, Ström K, Orrenius S, Nicotera P; *J Biol Chem* 1994 (269): 30553-30560
- 44 Erlebacher A, Filvaroff EH, Ye J, Derynck R; Osteoblastic responses to TGF- β during bone remodeling; *Mol. Biol. Cell* 1998 (9): 1903–1918
- 45 Filvaroff E, Erlebacher A, Ye J, Gitelman SE, Lotz J, Heilman M, Derynck R; Inhibition of TGF- β receptor signaling in osteoblasts leads to decreased bone remodeling and increased trabecular bone mass; *Development* 1999 (126): 4267–4279
- 46 Finkel T, Holbrook NJ; Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing; *Nature* 2000 (408): 239-247
- 47 Fiorani M, Cantoni O, Tasinto A, Boscoboinik D, Azzi A; *Biochim Biophys Acta* 1995 (1269): 98-104
- 48 Flohe L; Glutathione peroxidase brought into focus; Pryor W (Hrsg): *Free Radical in Biology and Medicine*; Academic Press, New York 1982: 223-253
- 49 Fonseca RJ, Clark PJ, Burkes EJ Jr., Baker RD; Revascularization and healing of onlay particulate autologous bone grafts in primats; *J Oral Surg* 38 (8): 572-577; 1980

- 50 Fraser JHE, Helfrich MH, Wallace HM, Ralston SH; Hydrogen peroxide, but not superoxide, stimulates bone resorption in mouse calvariae, *Bone* 1996 (19): 223–226
- 51 Frei B, England I, Ames BN; Ascorbate is an outstanding antioxidant in human blood plasma; *Proc Natl Acad Sci* 86 (1989): 6377-6381
- 52 Fröhlich JC, Mevius I; Erfassung des oxidativen Stresses und des L-Arginin/NO-Metabolismusweges bei Reperfusion unter Lebertransplantation am Menschen; Dissertation, Hannover 2003
- 53 Garrett IR, Boyce BF, Oreffo ROC, Bonewald L, Poser J, Mundy GR; Oxygen-derived free radicals stimulate osteoclastic bone resorption in rodent bone in vitro and in vivo; *J. Clin. Invest.* 1990 (85): 632–639
- 54 Girotti AW; Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems - Review; *J Lipid Res* 39 (1998): 1529-1542
- 55 Globus RK, Poulet J, Gospodarowicz D; Cultured bovine bone cells synthesize basic fibroblast growth factor and store it in their extracellular matrix; *Endocrinology* 1989 (124): 1539-1547
- 56 Goldberg VM, Stevenson S; Natural history of autografts and allografts; *Clin Orthop Relat Res* (225): 7-16; 1987
- 57 Grico N; Regulation der Stress-aktivierten Proteinkinasen durch den genotoxischen Benzo[a]pyren-Metaboliten BPDE; Dissertation, Mainz 2007
- 58 Haas NP, Südkamp NP, Mittlmeier T, Toben D; Einfluss pluripotenter mesenchymaler Zellen auf die Knochenheilung im atrophien Pseuarthrosemodell der Ratte - Biomechanische Untersuchung; Dissertation, Berlin 2008
- 59 Halliwell B; Free radicals and oxidative damage in biology and medicine: An introduction; Rea (Hrsg): *Oxidative stress in skeletal muscle*; Birkhaeuser Verlag, Basel/Schweiz, 1998
- 60 Halliwell B; Free radicals, proteins and DNA: oxidative damage versus redox regulation; *Biochem Soc Trans* 24 (1996): 1023-1027
- 61 Halliwell B; Oxidative stress, nutrition and health: Experimental strategies of optimization of nutritional antioxidant intake in humans; *Free Radical Res* 25 (1996): 57-74
- 62 Hardwick R, Hayes BK, Flynn C; Devices for dentoalveolar regeneration: an up-to-date literature review; *J Periodontol* 66 (6): 495-505; 1995

- 63 Hartmann A, Niess AM; DNA damage in exercise; Sen CK, Packer L, Hanninen O (Hrsg): Handbook of Oxidants and Antioxidants in Exercise; Elsevier, Amsterdam 2000: 195-217
- 64 Hausladen A, Privalle CT, Keng T, DeAngelo J, Stamler JS; Nitrosative stress: activation of the transcription factor OxyR; Cell 1996 (Vol. 86): 719-729
- 65 Hazzalin CA, Mahadevan LC; MAPK-regulated transcription: a continuously variable gene switch?; Nat Rev Mol Cell Biol 2002 (3): 30-40
- 66 Hilger RA, Scheulen ME, Strumberg D; The Ras-MEK-ERK pathway in the treatment of cancer; Onkologie 2002 (25): 511-518
- 67 Hock JM, Krishnan V, Onyia JE, Bidwell JP, Milas J, Stanislaus D; Osteoblast apoptosis and bone turnover; J Bone Miner Res 16 (6): 975-984; 2001
- 68 Hosoya S, Suzuki H, Yamamoto M, Kobayashi K, Abiko Y; Alkaline phosphatase and type I collagen gene expressions were reduced by hydroxyl radical-treated fibronectin substratum; Mol Genet Metab 1998 (65): 31-34
- 69 Hu Y, Chan E, Wang SX, Li B; Activation of p38 mitogen-activated protein kinase is required for osteoblast differentiation; Endocrinology 2003 (144): 2068-2074
- 70 Huang TT, Carlson EJ, Raineri I, Gillespie AM, Kozy H, Epstein CJ; The Use of Transgenic and Mutant Mice to Study Oxygen Free Radical Metabolism; Annals of the New York Academy of Sciences 1999 (893): 95-112
- 71 Hughes MN; Relationship between nitric oxide, nitroxyl ion, nitrosonium cation and peroxynitrite; Biochem Biophys Acta 1411 (1999): 263-272
- 72 Ilizarov GA; Clinical application of the tension-stress effect for limb lengthening; Clin Orthop Relat Res (250): 8-26; 1990
- 73 Ilizarov GA; The tension-stress effect on the genesis and growth of tissues: Part I - The influence of stability of fixation and soft-tissue-preservation; Clin Orthop Relat Res (238): 249-281; 1989
- 74 Ilizarov GA; The tension-stress effect on the genesis and growth of tissues: Part II - The influence of the rate and frequency of distraction; Clin Orthop Relat Res (239): 263-285; 1989
- 75 Immenschuh S, Baumgart-Vogt E; Peroxiredoxins, Oxidative Stress, and Cell Proliferation; Antioxidants & Redox Signaling 2005 (Vol 7): 768-777
- 76 Jacob RF, Reece GP, Taylor TD, Miller MJ; Mandibular restoration in the cancer patient: microvascular surgery and implant prostheses; Tex Dent J 109 (6): 23-26; 1992

- 77 Jacobi GH; Anti-Aging für Männer: Strategien für den ganzen Mann; Thieme Verlag Stuttgart 2004, Kapitel: Mechanismen des zellulären Alterns (S. 9-14)
- 78 Ji LL; Exercise and oxidative stress: Role of the cellular antioxidant systems; Holloszy JO (Hrsg): Exercise and Sport Sciences Reviews; Williams & Wilkins, Baltimore 1995: 135-166
- 79 Joos U, Bölükbasi E; Der Einfluß von Vascular endothelial growth factor auf die Knochenregeneration im Unterkiefer durch Beeinflussung der Angiogenese - lichtmikroskopische und histomorphometrische Untersuchung; Inaugural-Dissertation, Münster 2004
- 80 Joos U, Kleinheinz J, Stamm T, Lunatschek CIB; Einfluß des Vascular Endothelial Growth Factors bei der Vaskulogenese in der Knochenregeneration - Eine in-vivo basierte Analyse am Unterkiefer-Defekt Modell des Kaninchens; Inaugural-Dissertation, Münster 2007
- 81 Karapetian VE, Neugebauer J, Severin RM, Zöller JE; Einsatz von Knochenersatzmaterialien bei der Periimplantitistherapie; Implant J 2004 (4): 30-34
- 82 Karring T, Nyman S, Gottlow J, Laurell L; Development of the biological concept of guided tissue regeneration - animal and human studies; Periodontol 2000 1 (1): 26-35; 1993
- 83 Kelly GS; Clinical application of N-acetylcysteine; Altern Med Rev 1998 (3): 14-27
- 84 Kelpke SS, Reiff D, Prince CW, Thompson JA; Acidic Fibroblast Growth Factor Signaling Inhibits Peroxynitrite-Induced Death of Osteoblasts and Osteoblast Precursors; J of Bone and Mineral Res Vol 16 (10): 1917-1925; 2001
- 85 Kenyon C; A conserved regulatory system for aging; Cell 2001 (105): 165-168
- 86 Kloner RA, Przyklenk K, Whittaker P; Deleterious effects of oxygen radicals in ischemia/reperfusion - Resolved and unresolved issues; Circulation 1989 (47): 1115-1127
- 87 Kloner RA; Does reperfusion exist in humans?; JACC 1993 (21): 537-545
- 88 Klotz LO, Beier JIHA; Modulation des Signaltransduktion über Rezeptoren der ErbB-Familie durch reaktive Sauerstoffspezies; Dissertation, Düsseldorf 2005
- 89 Klotz LO, von Montfort C; Regulation des EGF-Rezeptors durch Tyrosinphosphatasen in der zellulären Antwort auf reaktive Sauerstoffspezies; Dissertation, Düsseldorf 2004

- 90 Konishi H, Matsuzaki H, Tanaka M, Ono Y, Tokunaga C, Kuroda S, Kikkawa U; Activation of RAC-protein kinase by heat shock and hyperosmolarity stress through a pathway independent of phosphatidylinositol 3-kinase; *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996 (93): 7639-7643
- 91 Koppenol KW; The basic chemistry of nitrogen monoxide and peroxy nitrite; *Free Radical Biol Med* 25 (1998): 385-391
- 92 Kromer BM, Tippins JR; Actions of 8-epi prostaglandin F₂α on isolated rat aorta; *J Cardiovasc Pharmacol* 1998 (32): 471-478
- 93 Kromer BM, Tippins JR; Coronary artery constriction by the isoprostane 8-epi prostaglandin F₂α; *Br J Pharmacol* 1996 (116): 1276-1280
- 94 Kübler NR, Würzler KK, Biebl S, Käding C, Faller G, Sieber E, Kirchner T, Sebald W, Lagercrantz J, Farnebo F, Larsson C, Tvrdik T, Weber G, Piehl F; A comparative study of the expression patterns for VEGF, VEGF-B/VRF and VEGF-C in the developing and adult mouse; *Biochem Biophys Acta* 1998 (1398): 157-163
- 95 Kübler NR; Osteoinduction and -reparation; *Mund Kiefer Gesichtschir* 1997 (1): 2-25
- 96 Kullich W; Gesundheitsmodulation durch Nahrungsinhaltsstoffe; Springer Verlag: Nichtmedikamentöse Schmerztherapie; Wien 2007: 461-477
- 97 Lai CF, Chaudhary L, Fausto A, Halstead LR, Ory DS, Avioli LV, Cheng SL; Erk is essential for growth, differentiation, integrin expression, and cell function in human osteoblastic cells; *J. Biol. Chem.* 2001 (276): 14443–14450
- 98 Laursen M, Christensen FB, Bungert C, Lind M; Optimal handling of fresh cancellous bone graft: different preoperative storing techniques evaluated by in vitro osteoblast-like cell metabolism; *Acta Orthop Scand* 74 (4): 490-496; 2003
- 99 Lawson JA, Rokach J, FitzGerald GA; *J. Biol. Chem.* 1999 (274): 24441–24444
- 100 Leblanc AD, Schneider VS, Evans HJ, Engelbretson DA, Krebs JM; Bone mineral loss and recovery after 17 weeks of bed rest; *J Bone Miner Res* 5 (8): 843-850; 1990
- 101 Lehnig M; Radical mechanisms of the decomposition of peroxy nitrite and the peroxy nitrite-CO₂ adduct and of reactions with L-tyrosine and related compounds as studied by ¹⁵N-chemically induced dynamic nuclear polarization; *Arch Biochem Biophys* 368 (1999): 303-318
- 102 Leuning M, Yuan F, Berk DA, Gerweck LE, Jain RK; Angiogenesis and growth of isografted bone: quantitative in vivo assay in nude mice; *Lab Invest* 1994 (71): 300-307

- 103 Lexer E; Die Verwendung der freien Knochenplastik nebst Versuchen über die Gelenkversteifung und Gelenktransplantation; Arch Klein Chir 1908 (86): 939-954
- 104 Liu TZ, Stern A, Morrow JD; J. Biomed. Sci.1998 (5): 415–420
- 105 Longmire AW, Roberts LJ, Morrow JD; Actions of the E2-Isoprostane 8-iso-PGE2 on the platelet thromboxane/endoperoxide receptor in humans and rats: additional evidence for the existence of a unique isoprostane receptor; Prostaglandines 1994 (48): 247-256
- 106 Longmire AW, Swift LL, Roberts II LJ, Awad JA, Burk RF, Morrow JD; Effect of oxygen tension on the generation of F2-isoprostanes and malondialdehyde in peroxidizing rat liver microsomes; Biochem Pharmacol 47 (1994): 1173-1177
- 107 Lüllmann-Rauch R; Histologie - Verstehen, Lernen, Nachschlagen; Thieme (Hrsg), Stuttgart 2003 (1. Aufl): 129-134
- 108 Maehama T, Dixon JE; The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate; J Biol Chem 1998 (273): 13375-13378
- 109 Maines MD; The heme oxygenase system: A regulator of second messenger gases; Annu Rev Pharmacol Toxicol 37 (1997): 517-554
- 110 Manolagas SC, Almeida M; Gone with the Wnts: β -Catenin, T-Cell Factor, Forkhead Box O, and Oxidative Stress in Age-Dependent Diseases of Bone, Lipid, and Glucose Metabolism - Minireview; Molecular Endocrinology 21 (11): 2605-2614; 2007
- 111 Manolagas SC, Jilka RL; Bone marrow, cytokines, and bone remodeling. Emerging insights into the pathophysiology of osteoporosis; N. Engl. J. Med. 1995 (332): 305–311
- 112 Martindale JL, Holbrook NJ; Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival; J Cell Physiol 2002 (192): 1-15
- 113 Mashima R, Witting PK, Stocker R; Oxidants and antioxidants in atherosclerosis; Curr Opin Lipidol 2001 (12): 411-418
- 114 Mathews WR, McKenna R, Guido DM, Petry TW, Jolly RA, Morrow JD, Roberts II LJ; A comparison of gas chromatography-mass spectrometry assays for in vivo lipid peroxidation; Proc 41th ASMS Conf Mass Spectrometry and Allied Topics 1993: 865a-865b
- 115 Mayr-Wohlfart U, Waltenberger J, Hausser H, Kessler S, Gunther KP, Dehio C, Puhl W, Brenner RE; Vascular endothelial growth factor stimulates chemotactic migration of human osteoblasts; Bone 30 (3): 472-477; 2002

- 116 McCarthy AD, Etcheverry SB, Bruzzone L, Cortizo AM; Effects of advanced glycation end-products on the proliferation and differentiation of osteoblast-like cells; *Mol Cell Biochem* 1997 (170): 43-51
- 117 McCarthy AD, Etcheverry SB, Bruzzone L, Lettieri G, Barrio DA, Cortizo AM; Non-enzymatic glycosylation of a type I collagen matrix: effects on osteoblastic development and oxidative stress; *BMC Cell Biology* 2001 (2): 16ff
- 118 McCarthy JG, Stelnicki EJ, Grayson BH; Distraction osteogenesis of the mandible: a ten-year experience; *Semin Orthod* 5 (1): 3-8; 1999
- 119 McCarthy JG, Stelnicki EJ, Mehrara BJ, Longaker MT; Distraction osteogenesis of the craniofacial skeleton; *Plast Reconstr Surg* 107 (7): 1812-1827; 2001
- 120 McCarthy JG; Sutural Expansion Osteogenesis for Management of the Bony-Tissue Defect in Cleft Palate Repair: Experimental Studies in Dogs; *Plast Reconstr Surg* 105 (6): 2026-2027; 2000
- 121 McCarthy JG; The role of distraction osteogenesis in the reconstruction of the mandible in unilateral craniofacial microsomia; *Clin Plast Surg* 21 (4): 625-631; 1994
- 122 Mees K; Free microvascular tissue transfer - Clinical significance in reconstructive surgery of the head and neck; *Laryngorhinootologie* 68 (1): 12-18; 1989
- 123 Mei YF, Yamaza T, Atsuta I, Danjo A, Yamashita Y, Kido MA, Goto M, Akamine A, Tanaka T; Sequential expression of endothelial nitric oxide synthase, inducible nitric oxide synthase, and nitrotyrosine in odontoblasts and pulp cells during dentin repair after tooth preparation in rat molars; *Cell Tissue Res* 2007 (328): 117-127
- 124 Meydani M; Vitamin E; *Lancet* 345 (1995): 170-175
- 125 Mody N, Parhami F, Sarafian TA, Demer LL; Oxidative Stress modulates osteoblastic differentiation of vascular and bone cells; *Free Radical Biology & Medicine* 2001 (Vol. 31, No. 4): 509-519
- 126 Morrow JD, Awad JA, Boss HJ, Blair IA, Roberts LJ; Non-cyclooxygenase-derived prostanoids (F2-isoprostanes) are formed in situ on phospholipids; *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992 (89): 10721-10725
- 127 Morrow JD, Hill KE, Burk RF, Nammour TM, Badr KF, Roberts II LJ; A series of prostaglandin F2-like compounds are produced in vivo in humans by a non-cyclooxygenase, free radical-catalyzed mechanism; *Proc Natl Acad Sci* 87 (1990): 9383-9387

- 128 Morrow JD, Minton TA, Badr KL, Roberts II LJ; Evidence that the F2-isoprostane, 8-epi-prostaglandin F2alpha, is formed in vivo; *Biochem Biophys Acta* 1994 (1210): 244-248
- 129 Morrow JD, Minton TA, Roberts II LJ; The F2-isoprostane, 8-epi-PGF2alpha, a potent agonist of the vascular thromboxane/endoperoxide receptor, is a platelet thromboxane/endoperoxide receptor antagonist; *Prostaglandines* 1992 (44): 155-163
- 130 Myers MP, Tonks NK; PTEN: sometimes taking it off can be better than putting it on [editorial]; *Am J Hum Genet* 1997 (61): 1234-1238
- 131 Nakamura H, Nakamura K, Yodoi J; Redox regulation of cellular activation; *Annu Rev Immunol* 1997 (15): 351-369
- 132 Nakayama K, Tamura Y, Suzawa M, Harada S, Fukumoto S, Kato M, Miyazono K, Rodan GA, Takeuchi Y, Fujita YT; Receptor tyrosine kinases inhibit bone morphogenetic protein-Smad responsive promoter activity and differentiation of murine MC3T3-E1 osteoblast-like cells; *J. Bone Miner. Res.* 2003 (18): 827-835
- 133 Neugebauer J, Oh JH, Scheer M, Kübler AC; Wirkung von Knochenersatzmaterialien auf die Osteoblastenproliferation; *ZWR* 2003 (112): 311-318
- 134 Niess AM, Fehrenbach E, Northoff H, Dickhuth HH; Freie Radikale und oxidativer Stress bei körperlicher Belastung und Trainingsanpassung - Eine aktuelle Übersicht; *Deutsche Zeitschrift für Sportmedizin* 2002 (12): 345-353
- 135 Nilsson OS, Urist MR; Immune inhibition of repair of canine skull trephine defects implanted with partially purified bovine morphogenetic protein; *Int Orthop* 15 (3): 257-263; 1991
- 136 Nystrom E, Legrell PE, Forssell A, Kahnberg KE; Combined use of bone grafts and implants in the severely resorbed maxilla - Postoperative evaluation by computed tomography; *Int J Oral Maxillofac Surg* 24 (1 Pt 1): 20-25; 1995
- 137 Ogunsalu C; 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; 2005
- 138 Ohtsubo S, Matsuda M, Takekawa M; Angiogenesis after sintered bone implantation in rat parietal bone; *Histol Histopathol* 18 (1): 153-163; 2003
- 139 Opalenik SR, Ding Q, Mallery SR, Thompson JA; Glutathione depletion associated with the HIV-1 TAT protein mediates the extracellular appearance of acidic fibroblast growth factor; *Arch Biochem Biophys* 1998 (351): 17-26

- 140 Opalenik SR, Shin JT, Wehby JN, Mahesh VK, Thompson JA; The HIV-1 TAT protein induces the expression and extracellular appearance of acidic fibroblast growth factor; *J Biol Chem* 1995 (270): 17457–17468
- 141 Owen M; The origin of bone cells in the postnatal organism; *Arthritis Rheum* 23 (10): 1073-1080; 1980
- 142 Pan JS, Hong MZ, Ren JL; Reactive oxygen species: A double-edged sword in oncogenesis; *World J Gastroenterol* 2009 (15): 1702-1707
- 143 Paralkar VM, Vukicevic S, Reddi AH; Transforming growth factor b type I binds to collagen IV of basement membrane matrix: implication for development; *Dev Biol* 1991 (143): 303-308
- 144 Parhami F, Morrow AD, Balucan J, Leitinger N, Watson AD, Tintut Y, Berliner JA, Demer LL; *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1997 (17): 680–687
- 145 Park YH, Han DW, Suh H, Ryu GH, Hyon SH, Cho BK, Park JC; Protective effects of green tea polyphenol against reactive oxygen species-induced oxidative stress in cultured rat calvarial osteoblast; *Cell Biol Toxic* 2003 (19): 325-337
- 146 Poulsen HE, Loft S, K. V; Extreme Exercise and Oxidative DNA Modification; *J Sports Sci* 14 (1996): 343-346
- 147 Powers SK, Hamilton K; Antioxidants and Exercise; *Clin Sports Med* 18 (1999): 525-536
- 148 Preville X, Salvemini S, Giraud S, Chaufour S, Paul C, Stepien G, Ursini MV, Arrigo AP; Mammalian small stress proteins protect against oxidative stress through their ability to increase glucose-6-phosphatase dehydrogenase activity and by maintaining optimal cellular detoxifying machinery; *Exp Cell Res* 247 (1999): 61-78
- 149 Radak Z, Nakamura A, Nakamoto H, Asano K, Ohno H, Goto S; A period of anaerobic exercise increases the accumulation of reactive carbonyl derivatives in the lungs of rats; *Pflüg Arch* 435 (1998): 439-441
- 150 Ralston SH, Ho L-P, Helfrich M, Grabowski PS, Johnston PW, Benjamin N; Nitric oxide: A cytokine-induced regulator of bone resorption; *J Bone Miner Res* 1995 (10): 1040–1049
- 151 Ralston SH, Todd D, Helfrich M, Benjamin N, Grabowski PS; Human osteoblast like cells produce nitric oxide and express nitric oxide synthase; *Endocrinology* 1994 (135): 330–336
- 152 Rapp UR, Hartkamp J, Krohne G; Regulation vom MAPK Signalwegen durch Serin/Threonin Kinase MLK3; Dissertation, Würzburg 2001

- 153 Reddi AH, Wientroub S, Muthukumaran N; Biologic principles of bone induction; *Orthop Clin North Am* 18 (2): 207-212; 1987
- 154 Reddi AH; Bone and Cartilage differentiation; *Curr Opin Genet Dev* 4 (5): 737-744; 1994
- 155 Reddy SV; Regulatory Mechanisms operative in osteoclasts; *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 14 (4): 255-270; 2004
- 156 Rensing L, Koch M, Rippe B, Rippe V; Mensch in Stress, Psyche, Körper, Moleküle; Spektrum/Elsevier, Heidelberg 2005 (6): 187-198
- 157 Reuther T; Untersuchungen zur Qualität des autologen Knochentransplantates und des Transplantatlagers in der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie; Habilitationsschrift - Universität Würzburg 2007
- 158 Rimbach G, Hohler D, Fischer A, Roy S, Virgili F, Pallauf J, Packer L; Methods to assess free radicals and oxidative stress in biological systems; *Arch Anim Nutr* 52 (1999): 203-222
- 159 Ripamonti U, Ma SS, van den Heever B, Reddi A; Osteogenin, a bone morphogenic protein, adsorbed on porous hydroxyapatite substrata, induces rapid bone differentiation in calvarial defects of adult primates; *Plast Reconstr Surg* 1992 (90): 382-393
- 160 Roth J, Noll T, Holl M; Transiente Hypoxie schützt Endothelzellen vor Apoptose über MEK/ERK-vermittelte Bad-Phosphorylierung; Dissertation, Gießen 2008
- 161 Ruedi TP, Bassett CA; Repair and remodeling in Millipore-isolated defects in cortical bone; *Acta Anat (Basel)* 68 (4): 509-531; 1967
- 162 Sauer H, Wartenberg M, Hescheler J; Reaction Oxygen Species as Intracellular Messengers During Cell Growth and Differentiation; *Cell Physiol Biochem* 2001 (11): 173-186
- 163 Schenk RK, Buser D, Hardwick WR, Dahlin C; 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; 1994
- 164 Schenk RK, Willenegger HR; 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; 1977
- 165 Scheper T, Schwedhelm E; Isoprostane und 3-Nitrotyrosin als neue Indexparameter des oxidativen Stresses in vivo: Analytik, Bildung, Metabolismus und biologische Bedeutung; Dissertation, Hannover 2000

- 166 Schlegel J, Neff F; Charakterisierung der Aktivierung des antiapoptotischen Phosphatidylinositol-3'-Kinase-abhängigen Signalwegs durch den neuroprotektiven Faktor Glial cell line derived neurotrophic factor (GDNF); Dissertation, Marburg 2002
- 167 Schlegel KA, Fichtner G, Schulzke-Mosgau S, Wiltfang J; Histologic findings in sinus augmentation with autogenous bone chips versus a bovine bone substitute; Int J Oral Maxillofac Implants 18 (1): 53-58; 2003
- 168 Schopf P; Curriculum Kieferorthopädie, Band 1; Quintessenz (Hrsg), Berlin 2000 (3. Auflage): 29f
- 169 Schwenzer N, Ehrenfeld M; Zahn-Mund-Kiefer-Heilkunde, Band 1, Allgemeine Chirurgie; Georg Thieme Verlag 2000 (3. Auflage): 12-13
- 170 Shaw M, Cohen P, Alessi DR; The activation of protein kinase B by H₂O₂ or heat shock is mediated by phosphoinositide 3-kinase and not by mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase-2; Biochem J 1998 (336): 241-246
- 171 Shigenaga MK, Lee HH, Blunt, BC, Christen S, Shigeno ET, Yip H, Ames BN; Inflammation and Nox-induced nitration: Assay for 3-nitrotyrosine by HPLC with electrochemical detection; Proc Natl Acad Sci 1997 (94): 3211-3321
- 172 Shin JT, Opalenik SR, Wehby JN, Mahesh VK, Jackson A, Tarantini F, Maciag T, Thompson JA; Serum-starvation induces the extracellular appearance of FGF-1; Biochim Biophys Acta 1996 (1312): 27-38
- 173 Sies H; Biochemie des oxidativen Stress; Angew Chem 98 (1986): 1061-1075
- 174 Sies H; Oxidative Stress: From basic research to clinical application; Am J Med 91 (1991): 31-38
- 175 Skinner KA, Crow JP, Skinner HB, Chandler RT, Thompson JA, Parks DA; Free and protein-associated nitrotyrosine formation following rat liver preservation and transplantation; Arch Biochem Biophys 1997 (342): 282-288
- 176 Street J, Bao M, deGuzman L, Bunting S, Peale FV Jr, Ferrara N, Steinmetz H, Hoeffel J, Cleland JL, Daughtery A, van Bruggen N, Redmond HP, Carano RA, Filvaroff EH; Vascular endothelial growth factor stimulates bone repair by promoting angiogenesis and bone turnover; Proc Natl Acad Sci U S A 99 (15): 9656-9661; 2002
- 177 Sümnick W, Zimmer S; Lavageflüssigkeitsuntersuchungen im Zusammenhang mit der Kiefergelenksarthroskopie bei Patienten mit Cranio-Mandibulärer-Dysfunktion (CMD); Dissertation, Greifswald 2006

- 178 Suzuki H, Hayakawa M, Kobayashi K, Takiguchi H, Abiko Y; H₂O₂-derived derived free radicals treated fibronectin substratum reduces the bone nodule formation of rat calvarial osteoblast; *Mech Ageing Dev* 1997 (98): 113-125
- 179 Talmage RV, Stinnett SS, Landwehr JT, Vincent LM, McCartney WH; Age-related loss of bone mineral density in non-athletic and athletic woman; *Bone Miner* 1 (2): 115-125; 1986
- 180 Tilton FE, Degioanni JJ, Schneider VS; Long-term follow-up of Skylab bone demineralization; *Aviat Space Environ Med* 51 (11): 1209-1213; 1980
- 181 Tintut Y, Parhami F, Tsingotjidou A, Tetradis S, Territo M, Demer LL; 8-Isoprostaglandin E₂ Enhances Receptor-activated NFκB Ligand (RANKL)-dependent Osteoclastic Potential of Marrow Hematopoietic Precursors via the cAMP Pathway; *J Biol Chem* Vol 277 (16): 14221-14226; 2002
- 182 Tonna EA, Cronkite EP; The periosteum - Autoradiographic studies in cellular proliferation and transformation utilizing tritiated thymidine; *Clin Orthop Relat Res* 1991 (265): 302-305
- 183 Tossios P, Mehlhorn U; Freie Radikale und Antioxidantien in der Herzchirurgie; *Blickpunkt DER MANN* 2004 - 2 (3): 36-39
- 184 Tuma R; The two faces of oxygen; *Sci Aging Knowledge Environ* 2001: oa5
- 185 Uppu RM, Squadrito GL, Pryor WA; Acceleration of peroxynitrite oxidations by carbon dioxide; *Arch Biochem Biophys* 327 (1996): 335-343
- 186 Urken ML, Vickery C, Weinberg H, Buchbinder D, Biller HF; The internal oblique-iliac crest osseomyocutaneous microvascular free flap in head and neck reconstruction; *J Reconstr Microsurg* 5 (3): 203-214; Discussion 215-216; 1989
- 187 van der Vliet A, Eiserich JP, Kaur H, Cross CE, Halliwell B; Nitrotyrosine as a biomarker for reactive nitrogen species; *Methods Enzymol* 1996 (269): 175-184
- 188 Vile GF, Tyrell RM; Oxidative stress resulting from ultraviolet A irradiation of human skin fibroblasts leads to a heme oxygenase-dependent increase in ferritin; *J Biol Chem* 268 (1993): 14678-14681
- 189 Vina J, Gomez-Cabrera M, Lloret A, Marquez R, Minana JB, Pallardo FV, Sastre J; Free radicals in exhaustive physical exercise: mechanism of production, and protection by antioxidants; *Life* 2000 (50): 271-277
- 190 Vinals F, Lopez-Rovira T, Rosa JL, Ventura F; Inhibition of PI3K/p70 S6K and p38 MAPK cascades increases osteoblastic differentiation induced by BMP-2; *FEBS* 2002 (510): 99-104

- 191 Wagner RS, Weare C, Jin N, Mohler ER, Rhoades RA; Characterization of signal transduction events stimulated by 8-epi-prostaglandin (PG) F2alpha in rat aortic rings; *Prostaglandins* 1997 (54): 581-599
- 192 Wang FS, Wang CJ, Sheen-Chen SM, Kuo YR, Chen RF, Yang KD; Superoxide mediates shock wave induction of ERK-dependent osteogenic transcription factor (RUNX2) and mesenchymal cell differentiation toward osteoprogenitors; *J. Biol. Chem.* 2002 (277): 10931–10937
- 193 Widmann C, Gibson S, Jarpe MB, Johnson GL; Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human; *Physiol Rev* 1999 (79): 143-180
- 194 Wilke A, Rothmund M, Jones D, Herzberger C; Vergleichende in vitro-Analyse von allogenen Knochentransplantaten - Telos versus autolog; Inaugural-Dissertation, Marburg 2009
- 195 Wolff J; *Das Gesetz der Transformation der Knochen*; Berlin: August Hirshwald; 1892
- 196 Würzeler KK, Heisterkamp M, Böhm H, Kübler NR, Sebal W, Reuther JF; Unterkieferrekonstruktion mit autologem Knochen und einem induktiven Implantat beim Göttinger Minischwein; *Mund Kiefer GesichtsChir* 2004 (8): 75-82
- 197 Xiao G, Jiang D, Gopaladrishnan R, Franceschi RT; Fibroblast growth factor 2 induction of the osteocalcin gene require MAPK activity and phosphorylation of the osteoblast transcription factor, Runx2/Runx2; *J. Biol. Chem.* 2002 (277): 36181–36187
- 198 Yang M, Nazat NB, Jiang X, Kelsey SM, Blake DR, Newland AC, Morris CJ; *Br J Haematol* 1996 (95): 339-344
- 199 Yokose S, Kadokura H, Tajima Y, Fujieda K, Katayama I, Matsuoka T, Katayama T; Establishment and characterization of a culture system for enzymatically released rat dental pulp cells; *Calcif Tissue Int* 2000 (66): 139–144
- 200 Ziros PG, Gil APR, Georgakopoulos T, Habeos I, Kletsas D, Basdra EK, Papavassiliou AG; The bone-specific transcriptional regulator Runx2 is a target of mechanical signals in osteoblastic cells; *J. Biol. Chem.* 2002 (277): 13934–23941
- 201 Zuker RM, Rosen IB, Palmer JA, Sutton FR, McKee NH, Manktelow RT; Microvascular free flaps in head and neck reconstruction; *Can J Surg* 23 (2): 157-162; 1980

7 Anhang

Signifikanztests

(T-Test für AK-Färbungen des oxidativen Stressses von OZ, OB und OK)

Beim T-Test wurde erst ein Levene-Test auf Varianzgleichheit durchgeführt. Sollte dieser Wert größer als 0,05 sein, muss für das Ergebnis des T-Tests in der Zeile „Varianzen sind gleich“ geschaut werden; ist der Wert kleiner als 0,05, muss in der Zeile „Varianzen sind nicht gleich“ geschaut werden. Die jeweils relevanten Ergebnisse des T-Tests sind unterstrichen. Da sehr viele Tests durchgeführt wurden (multiples Testen), muss außerdem das Signifikanzniveau angepasst werden. Es wurden pro Färbung 6 Tests durchgeführt; das Signifikanzniveau muss deshalb auf 0,008 ($0,05 / 6$) korrigiert werden. Die Werte in der Spalte „Sig. (2-seitig)“, auch p-Wert genannt, muss also nicht mit 0,05, sondern stattdessen mit dem korrigierten Wert 0,008 verglichen werden. Wenn der p-Wert kleiner als 0,008 ist, ist der Unterschied zwischen den Gruppen signifikant. Ist der p-Wert kleiner als 0,001 wird der Unterschied als hoch signifikant angesehen. Die hoch signifikanten Werte sind grau hinterlegt.

Färbung: pERK

Zeitpunkt: 4. – 8. Woche

Test bei unabhängigen Stichproben

	Levene-Test der Varianzgleichheit		T-Test für die Mittelwertgleichheit						
	F	Signifikanz	T	df	Sig. (2-seitig)	Mittlere Differenz	Standardfehler der Differenz	95% Konfidenzintervall der Differenz	
								Untere	Obere
OZ	,026	,873	-0,021	28	,983	-,002333	,109594	-,226827	,222160
Varianzen sind nicht gleich			-0,021	7,602	,984	-,002333	,110878	-,260366	,255699
OB	1,986	,170	-1,131	28	,268	-,101083	,089364	-,284138	,081971
Varianzen sind nicht gleich			-,878	6,126	,413	-,101083	,115094	-,381305	,179139
OK	,474	,497	-0,562	27	,579	-,068094	,121216	-,316809	,180620
Varianzen sind nicht gleich			-,680	10,638	,511	-,068094	,100066	-,289256	,153068

Zeitpunkt: 12. – 16. Woche

Test bei unabhängigen Stichproben

	Levene-Test der Varianzgleichheit		T-Test für die Mittelwertgleichheit						
	F	Signifikanz	T	df	Sig. (2-seitig)	Mittlere Differenz	Standardfehler der Differenz	95% Konfidenzintervall der Differenz	
								Untere	Obere
OZ Varianzen sind gleich	,302	,588	-,346	23	,732	-,059900	,172881	-,417531	,297731
			-,317	5,612	,762	-,059900	,188706	-,529487	,409687
OB Varianzen sind gleich	,725	,404	-1,482	21	,153	-,145622	,098258	-,349962	,058717
			-1,939	10,639	,079	-,145622	,075092	-,311584	,020339
OK Varianzen sind gleich	,001	,980	1,384	15	,187	,154769	,111853	-,083640	,393179
			1,383	5,006	,225	,154769	,111940	-,132884	,442423

Gruppe: klinische Atrophie

Test bei unabhängigen Stichproben

	Levene-Test der Varianzgleichheit		T-Test für die Mittelwertgleichheit						
								95% Konfidenzintervall der Differenz	
	F	Signifikanz	T	df	Sig. (2-seitig)	Mittlere Differenz	Standardfehler der Differenz	Untere	Obere
OZ	,606	,441	,556	42	<u>,581</u>	,048400	,086996	-,127166	,223966
Varianzen sind gleich									
			,540	33,481	,593	,048400	,089697	-,133991	,230791
OB	,068	,796	,146	40	<u>,885</u>	,008639	,059221	-,111052	,128330
Varianzen sind gleich									
			,143	33,256	,888	,008639	,060618	-,114653	,131931
OK	,641	,429	,975	34	<u>,337</u>	,084970	,087184	-,092210	,262150
Varianzen sind gleich									
			1,072	32,115	,292	,084970	,079228	-,076390	,246330

Gruppe: keine klinische Atrophie

Test bei unabhängigen Stichproben

	Levene-Test der Varianzgleichheit		T-Test für die Mittelwertgleichheit							
								95% Konfidenzintervall der Differenz		
	F	Signifikanz	T	df	Sig. (2-seitig)	Mittlere Differenz	Standardfehler der Differenz	Untere	Obere	
OZ	Varianzen sind gleich	1,393	,268	-,048	9	,963	-,009167	,191085	-,441431	,423098
	Varianzen sind nicht gleich			-,046	6,514	,965	-,009167	,199645	-,488487	,470154
OB	Varianzen sind gleich	2,948	,120	-,273	9	,791	-,035900	,131390	-,333124	,261324
	Varianzen sind nicht gleich			-,291	7,410	,779	-,035900	,123332	-,324296	,252496
OK	Varianzen sind gleich	,033	,861	2,402	8	,043	,307833	,128170	,012273	,603394
	Varianzen sind nicht gleich			2,414	6,688	,048	,307833	,127541	,003368	,612299

Färbung: pAKT

Zeitpunkt: 4. – 8. Woche

Test bei unabhängigen Stichproben

	Levene-Test der Varianzgleichheit		T-Test für die Mittelwertgleichheit						
	F	Signifikanz	T	df	Sig. (2-seitig)	Mittlere Differenz	Standardfehler der Differenz	95% Konfidenzintervall der Differenz	
								Untere	Obere
OZ Varianzen sind gleich	1,080	,308	,383	28	<u>,704</u>	,040625	,106000	-,176506	,257756
			,501	12,093	<u>,625</u>	,040625	,081118	-,135966	,217216
OB Varianzen sind gleich	6,395	,017	1,041	28	,307	,091917	,088335	-,089029	,272862
			1,918	27,997	<u>,065</u>	,091917	,047927	-,006258	,190091
OK Varianzen sind gleich	1,258	,272	,565	27	<u>,577</u>	,078109	,138326	-,205713	,361931
			,782	14,530	,447	,078109	,099856	-,135330	,291548

Zeitpunkt: 12. – 16. Woche

Test bei unabhängigen Stichproben

	Levene-Test der Varianzgleichheit		T-Test für die Mittelwertgleichheit						
	F	Signifikanz	T	df	Sig. (2-seitig)	Mittlere Differenz	Standardfehler der Differenz	95% Konfidenzintervall der Differenz	
								Untere	Obere
OZ	2,440	,133	- ,526	21	<u>,604</u>	-,063882	,121422	-,316393	,188630
Varianzen sind nicht gleich			- ,663	5,909	,532	-,063882	,096300	-,300400	,172637
OB	,611	,443	-1,304	21	<u>,206</u>	-,234711	,179996	-,609032	,139611
Varianzen sind nicht gleich			-1,459	4,949	,205	-,234711	,160849	-,649470	,180049
OK	3,022	,099	- ,124	18	<u>,902</u>	-,026562	,213554	-,475224	,422099
Varianzen sind nicht gleich			- ,222	17,252	,827	-,026562	,119386	-,278165	,225040

Gruppe: klinische Atrophie

Test bei unabhängigen Stichproben

	Levene-Test der Varianzgleichheit		T-Test für die Mittelwertgleichheit							
								95% Konfidenzintervall der Differenz		
	F	Signifikanz	T	df	Sig. (2-seitig)	Mittlere Differenz	Standardfehler der Differenz	Untere	Obere	
OZ	Varianzen sind gleich	,131	,719	1,184	41	,243	,086757	,073253	-,061181	,234694
	Varianzen sind nicht gleich			1,194	39,845	,239	,086757	,072648	-,060088	,233602
OB	Varianzen sind gleich	5,659	,022	3,897	41	,000	,326127	,083677	,157139	,495115
	Varianzen sind nicht gleich			3,705	29,026	,001	,326127	,088028	,146097	,506157
OK	Varianzen sind gleich	,986	,327	3,541	37	,001	,418671	,118233	,179109	,658234
	Varianzen sind nicht gleich			3,384	27,027	,002	,418671	,123724	,164823	,672519

Gruppe: keine klinische Atrophie

Test bei unabhängigen Stichproben

	Levene-Test der Varianzgleichheit		T-Test für die Mittelwertgleichheit						
								95% Konfidenzintervall der Differenz	
	F	Signifikanz	T	df	Sig. (2-seitig)	Mittlere Differenz	Standardfehler der Differenz	Untere	Obere
OZ	,000	,998	-,174	8	,866	-,017750	,102085	-,253159	,217659
Varianzen sind gleich									
			-,173	6,415	,868	-,017750	,102840	-,265494	,229994
OB	6,569	,033	-,004	8	,997	-,000500	,114701	-,265002	,264002
Varianzen sind gleich									
			-,003	3,126	,997	-,000500	,142900	-,445039	,444039
OK	2,315	,167	3,040	8	,016	,314000	,103286	,075822	,552178
Varianzen sind gleich									
			3,325	7,992	,010	,314000	,094428	,096210	,531790

Färbung: Nitrotyrosin

Zeitpunkt: 4. – 8. Woche

Test bei unabhängigen Stichproben

	Levene-Test der Varianzgleichheit		T-Test für die Mittelwertgleichheit						
	F	Signifikanz	T	df	Sig. (2-seitig)	Mittlere Differenz	Standardfehler der Differenz	95% Konfidenzintervall der Differenz	
								Untere	Obere
OZ	,003	,956	-1,490	28	,147	-,151167	,101457	-,358991	,056658
Varianzen sind nicht gleich			-1,501	7,780	,173	-,151167	,100679	-,384482	,082148
OB	,105	,749	,264	28	,794	,024583	,093111	-,166145	,215312
Varianzen sind nicht gleich			,258	7,516	,803	,024583	,095137	-,197286	,246453
OK	1,461	,237	-,316	27	,754	-,036732	,116084	-,274916	,201452
Varianzen sind nicht gleich			-,383	10,613	,709	-,036732	,095943	-,248845	,175381

Zeitpunkt: 12. – 16. Woche

Test bei unabhängigen Stichproben

	Levene-Test der Varianzgleichheit		T-Test für die Mittelwertgleichheit						
	F	Signifikanz	T	df	Sig. (2-seitig)	Mittlere Differenz	Standardfehler der Differenz	95% Konfidenzintervall der Differenz	
								Untere	Obere
OZ	,152	,700	,746	25	,463	,149402	,200380	-,263289	,562093
Varianzen sind gleich			,885	4,861	,418	,149402	,168846	-,288386	,587190
OB	4,892	,036	-1,721	25	,098	-,204457	,118772	-,449072	,040159
Varianzen sind gleich			-3,974	24,948	,001	-,204457	,051446	-,310423	-,098490
OK	,008	,930	-3,257	17	,005	-,561933	,172515	-,925907	-,197959
Varianzen sind gleich			-3,517	5,278	,016	-,561933	,159788	-,966252	-,157614

Gruppe: klinische Atrophie

Test bei unabhängigen Stichproben

	Levene-Test der Varianzgleichheit		T-Test für die Mittelwertgleichheit							
								95% Konfidenzintervall der Differenz		
	F	Signifikanz	T	df	Sig. (2-seitig)	Mittlere Differenz	Standardfehler der Differenz	Untere	Obere	
OZ	Varianzen sind gleich	2,819	,100	,610	45	,545	,055014	,090142	-,126540	,236569
	Varianzen sind nicht gleich			,604	35,304	,550	,055014	,091099	-,129869	,239898
OB	Varianzen sind gleich	,574	,452	3,905	45	,000	,248707	,063683	,120443	,376970
	Varianzen sind nicht gleich			3,894	43,540	,000	,248707	,063877	,119932	,377481
OK	Varianzen sind gleich	,010	,919	2,703	36	,010	,255368	,094463	,063788	,446948
	Varianzen sind nicht gleich			2,609	26,496	,015	,255368	,097872	,054372	,456364

Gruppe: keine klinische Atrophie

Test bei unabhängigen Stichproben

	Levene-Test der Varianzgleichheit		T-Test für die Mittelwertgleichheit							
								95% Konfidenzintervall der Differenz		
	F	Signifikanz	T	df	Sig. (2-seitig)	Mittlere Differenz	Standardfehler der Differenz	Untere	Obere	
OZ	Varianzen sind gleich	,315	,590	2,183	8	,061	,355583	,162882	-,020024	,731191
	Varianzen sind nicht gleich			2,041	5,160	,095	,355583	,174202	-,088060	,799226
OB	Varianzen sind gleich	9,304	,016	,182	8	,860	,019667	,107894	-,229138	,268471
	Varianzen sind nicht gleich			,225	5,374	,830	,019667	,087278	-,200075	,239409
OK	Varianzen sind gleich	,954	,357	-1,841	8	,103	-,269833	,146587	-,607863	,068196
	Varianzen sind nicht gleich			-1,701	4,944	,150	-,269833	,158614	-,678959	,139293

Färbung: 8-Isoprostan

Zeitpunkt: 4. – 8. Woche

Test bei unabhängigen Stichproben

	Levene-Test der Varianzgleichheit		T-Test für die Mittelwertgleichheit						
	F	Signifikanz	T	df	Sig. (2-seitig)	Mittlere Differenz	Standardfehler der Differenz	95% Konfidenzintervall der Differenz	
								Untere	Obere
OZ Varianzen sind gleich	1,966	,172	-1,029	28	,312	-,132500	,128787	-,396308	,131308
			-1,329	11,781	,209	-,132500	,099710	-,350199	,085199
OB Varianzen sind gleich	7,094	,013	-1,371	28	,181	-,174708	,127475	-,435830	,086413
			-2,293	23,933	,031	-,174708	,076176	-,331951	-,017466
OK Varianzen sind gleich	3,401	,076	-1,056	27	,300	-,188326	,178359	-,554289	,177637
			-1,501	15,581	,153	-,188326	,125487	-,454930	,078277

Zeitpunkt: 12. – 16. Woche

Test bei unabhängigen Stichproben

	Levene-Test der Varianzgleichheit		T-Test für die Mittelwertgleichheit						
	F	Signifikanz	T	df	Sig. (2-seitig)	Mittlere Differenz	Standardfehler der Differenz	95% Konfidenzintervall der Differenz	
								Untere	Obere
OZ	,267	,610	-,883	24	,386	-,172752	,195729	-,576717	,231212
Varianzen sind gleich									
			-,990	7,039	,355	-,172752	,174506	-,584930	,239425
OB	2,967	,098	-1,431	24	,165	-,174057	,121606	-,425040	,076926
Varianzen sind gleich									
			-2,191	13,979	,046	-,174057	,079442	-,344467	-,003647
OK	,131	,721	-1,181	21	,251	-,182644	,154620	-,504195	,138906
Varianzen sind gleich									
			-1,375	8,204	,206	-,182644	,132878	-,487742	,122453

Gruppe: klinische Atrophie

Test bei unabhängigen Stichproben

	Levene-Test der Varianzgleichheit		T-Test für die Mittelwertgleichheit							
								95% Konfidenzintervall der Differenz		
	F	Signifikanz	T	df	Sig. (2-seitig)	Mittlere Differenz	Standardfehler der Differenz	Untere	Obere	
OZ	Varianzen sind gleich	1,308	,259	1,596	43	,118	,167452	,104916	-,044130	,379035
	Varianzen sind nicht gleich			1,564	36,416	,126	,167452	,107048	-,049564	,384469
OB	Varianzen sind gleich	1,278	,265	2,679	43	,010	,228315	,085223	,056446	,400185
	Varianzen sind nicht gleich			2,706	42,994	,010	,228315	,084369	,058168	,398463
OK	Varianzen sind gleich	2,649	,112	2,814	39	,008	,334618	,118895	,094130	,575106
	Varianzen sind nicht gleich			2,909	38,984	,006	,334618	,115016	,101973	,567263

Gruppe: keine klinische Atrophie

Test bei unabhängigen Stichproben

	Levene-Test der Varianzgleichheit		T-Test für die Mittelwertgleichheit							
								95% Konfidenzintervall der Differenz		
	F	Signifikanz	T	df	Sig. (2-seitig)	Mittlere Differenz	Standardfehler der Differenz	Untere	Obere	
OZ	Varianzen sind gleich	1,491	,253	,787	9	<u>,451</u>	,127200	,161618	-,238405	,492805
	Varianzen sind nicht gleich			,748	6,132	,482	,127200	,170103	-,286859	,541259
OB	Varianzen sind gleich	,036	,854	3,282	9	<u>,009</u>	,228967	,069756	,071168	,386766
	Varianzen sind nicht gleich			3,240	8,109	,012	,228967	,070680	,066359	,391574
OK	Varianzen sind gleich	,211	,657	2,421	9	<u>,039</u>	,340300	,140571	,022305	,658295
	Varianzen sind nicht gleich			2,396	8,235	,043	,340300	,142039	,014378	,666222

Signifikanztests

(für die Gefäße in BG und Knochen wurde ein nichtparametrischer Mann-Whitney-Test durchgeführt)

Beim Mann-Whitney-Test muss in der Zeile „Asymptotische Signifikanz (2-seitig)“ geschaut werden (Werte unterstrichen). Da hier 4 Tests durchgeführt wurden, muss das Signifikanzniveau auf 0,013 (0,05 / 4) korrigiert werden. Bei Werten die kleiner als 0,013 sind, ist der Unterschied zwischen den Gruppen signifikant. Ist der p-Wert kleiner als 0,001 wird der Unterschied als hoch signifikant angesehen (Werte grau hinterlegt).

Zeitpunkt: 4. – 8. Woche

Ränge

	klinisches Erscheinungsbild	N	Mittlerer Rang	Rangsumme
Gefäße im BG	klinische Atrophie	93	57,42	5340,50
	keine klin. Atrophie	23	62,85	1445,50
	Gesamt	116		
Gefäße im Knochen	klinische Atrophie	94	59,01	5547,00
	keine klin. Atrophie	23	58,96	1356,00
	Gesamt	117		

Statistik für Test^a

	Gefäße im BG	Gefäße im Knochen
Mann-Whitney-U	969,500	1080,000
Wilcoxon-W	5340,500	1356,000
Z	-,705	-,007
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	<u>,481</u>	<u>,994</u>

a. Gruppenvariable: klinisches Erscheinungsbild

Zeitpunkt: 12. – 16. Woche

Ränge

	klinisches Erscheinungsbild	N	Mittlerer Rang	Rangsumme
Gefäße im BG	klinische Atrophie	64	37,57	2404,50
	keine klin. Atrophie	15	50,37	755,50
	Gesamt	79		
Gefäße im Knochen	klinische Atrophie	81	47,21	3824,00
	keine klin. Atrophie	18	62,56	1126,00
	Gesamt	99		

Statistik für Test^a

	Gefäße im BG	Gefäße im Knochen
Mann-Whitney-U	324,500	503,000
Wilcoxon-W	2404,500	3824,000
Z	-2,000	-2,111
Asymptotische Signifikanz (2- seitig)	<u>.045</u>	<u>.035</u>

a. Gruppenvariable: klinisches Erscheinungsbild

Gruppe: klinische Atrophie

Ränge

	Zeitpunkt	N	Mittlerer Rang	Rangsumme
Gefäße im BG	4. bis 8. Woche	93	96,61	8985,00
	12. bis 16. Woche	64	53,41	3418,00
	Gesamt	157		
Gefäße im Knochen	4. bis 8. Woche	94	87,07	8185,00
	12. bis 16. Woche	81	89,07	7215,00
	Gesamt	175		

Statistik für Test^a

	Gefäße im BG	Gefäße im Knochen
Mann-Whitney-U	1338,000	3720,000
Wilcoxon-W	3418,000	8185,000
Z	-5,955	-,269
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	.000	.788

a. Gruppenvariable: Zeitpunkt

Gruppe: keine klinische Atrophie

Ränge

	Zeitpunkt	N	Mittlerer Rang	Rangsumme
Gefäße im BG	4. bis 8. Woche	23	21,87	503,00
	12. bis 16. Woche	15	15,87	238,00
	Gesamt	38		
Gefäße im Knochen	4. bis 8. Woche	23	17,78	409,00
	12. bis 16. Woche	18	25,11	452,00
	Gesamt	41		

Statistik für Test^b

	Gefäße im BG	Gefäße im Knochen
Mann-Whitney-U	118,000	133,000
Wilcoxon-W	238,000	409,000
Z	-1,666	-2,007
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	.096	.045
Exakte Signifikanz [2*(1-seitig Sig.)]	,107 ^a	

a. Nicht für Bindungen korrigiert.

b. Gruppenvariable: Zeitpunkt

Signifikanztests

(für die Menge an BG im Präparat wurde ein nichtparametrischer Mann-Whitney-Test durchgeführt)

Beim Mann-Whitney-Test muss in der Zeile „Asymptotische Signifikanz (2-seitig)“ geschaut werden (Werte unterstrichen). Da hier 2 Tests durchgeführt wurden, muss das Signifikanzniveau auf 0,025 (0,05 / 2) korrigiert werden. Bei Werten die kleiner als 0,025 sind, ist der Unterschied zwischen den Gruppen signifikant. Ist der p-Wert kleiner als 0,001 wird der Unterschied als hoch signifikant angesehen (Werte grau hinterlegt).

Zeitpunkt: 4. – 8. Woche

Ränge

		N	Mittlerer Rang	Rangsumme
	klinisches Erscheinungsbild			
BG im Präparat	klinische Atrophie	95	58,53	5560,50
	keine klin. Atrophie	24	65,81	1579,50
	Gesamt	119		

Statistik für Test^a

	BG im Präparat
Mann-Whitney-U	1000,500
Wilcoxon-W	5560,500
Z	-,988
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	<u>.323</u>

a. Gruppenvariable: klinisches Erscheinungsbild

Zeitpunkt: 12. – 16. Woche

Ränge

	Klinisches Erscheinungsbild	N	Mittlerer Rang	Rangsumme
BG im Präparat	klinische Atrophie	79	48,27	3813,00
	keine klin. Atrophie	18	52,22	940,00
	Gesamt	97		

Statistik für Test^a

	BG im Präparat
Mann-Whitney-U	653,000
Wilcoxon-W	3813,000
Z	-,551
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	<u>,581</u>

a. Gruppenvariable: klinisches
Erscheinungsbild

Gruppe: klinische Atrophie

Ränge

	Zeitpunkt	N	Mittlerer Rang	Rangsumme
BG im Präparat	4. bis 8. Woche	95	105,89	10060,00
	12. bis 16. Woche	79	65,38	5165,00
	Gesamt	174		

Statistik für Test^a

	BG im Präparat
Mann-Whitney-U	2005,000
Wilcoxon-W	5165,000
Z	-5,444
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	.000

a. Gruppenvariable: Zeitpunkt

Gruppe: keine klinische Atrophie

Ränge

	Zeitpunkt	N	Mittlerer Rang	Rangsumme
BG im Präparat	4. bis 8. Woche	24	25,92	622,00
	12. bis 16. Woche	18	15,61	281,00
	Gesamt	42		

Statistik für Test^a

	BG im Präparat
Mann-Whitney-U	110,000
Wilcoxon-W	281,000
Z	-2,829
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	.005

a. Gruppenvariable: Zeitpunkt

Signifikanztests

(für die Färbung des BG im Präparat wurde ein nichtparametrischer Mann-Whitney-Test durchgeführt)

Beim Mann-Whitney-Test muss in der Zeile „Asymptotische Signifikanz (2-seitig)“ geschaut werden (Werte unterstrichen). Da hier 2 Tests durchgeführt wurden, muss das Signifikanzniveau auf 0,025 (0,05 / 2) korrigiert werden. Bei Werten die kleiner als 0,025 sind, ist der Unterschied zwischen den Gruppen signifikant (Werte grau hinterlegt).

Färbung: pERK

Zeitpunkt: 4. – 8. Woche

Ränge

	klinisches Erscheinungsbild	N	Mittlerer Rang	Rangsumme
Färbung des BG	klinische Atrophie	24	15,44	370,50
	keine klin. Atrophie	6	15,75	94,50
	Gesamt	30		

Statistik für Test^b

	Färbung des BG
Mann-Whitney-U	70,500
Wilcoxon-W	370,500
Z	-,081
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	<u>,935</u>
Exakte Signifikanz [2*(1-seitig Sig.)]	,940 ^a

a. Nicht für Bindungen korrigiert.

b. Gruppenvariable: klinisches Erscheinungsbild

Zeitpunkt: 12. – 16. Woche

Ränge

	klinisches Erscheinungsbild	N	Mittlerer Rang	Rangsumme
Färbung des BG	klinische Atrophie	20	12,38	247,50
	keine klin. Atrophie	5	15,50	77,50
	Gesamt	25		

Statistik für Test^b

	Färbung des BG
Mann-Whitney-U	37,500
Wilcoxon-W	247,500
Z	-,873
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	<u>,383</u>
Exakte Signifikanz [2*(1-seitig Sig.)]	,408 ^a

a. Nicht für Bindungen korrigiert.

b. Gruppenvariable: klinisches
Erscheinungsbild

Gruppe: klinische Atrophie

Ränge

	Zeitpunkt	N	Mittlerer Rang	Rangsumme
Färbung des BG	4. bis 8. Woche	24	27,17	652,00
	12. bis 16. Woche	20	16,90	338,00
	Gesamt	44		

Statistik für Test^a

	Färbung des BG
Mann-Whitney-U	128,000
Wilcoxon-W	338,000
Z	-2,709
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,007

a. Gruppenvariable: Zeitpunkt

Gruppe: keine klinische Atrophie

Ränge

Zeitpunkt	N	Mittlerer Rang	Rangsumme
Färbung des BG 4. bis 8. Woche	6	7,17	43,00
12. bis 16. Woche	5	4,60	23,00
Gesamt	11		

Statistik für Test^b

	Färbung des BG
Mann-Whitney-U	8,000
Wilcoxon-W	23,000
Z	-1,347
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,178
Exakte Signifikanz [2*(1-seitig Sig.)]	,247 ^a

a. Nicht für Bindungen korrigiert.

b. Gruppenvariable: Zeitpunkt

Färbung: pAKT

Zeitpunkt: 4. – 8. Woche

Ränge

klinisches Erscheinungsbild		N	Mittlerer Rang	Rangsumme
Färbung des BG	klinische Atrophie	24	15,69	376,50
	keine klin. Atrophie	6	14,75	88,50
	Gesamt	30		

Statistik für Test^b

	Färbung des BG
Mann-Whitney-U	67,500
Wilcoxon-W	88,500
Z	-,247
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	<u>,805</u>
Exakte Signifikanz [2*(1-seitig Sig.)]	,820 ^a

a. Nicht für Bindungen korrigiert.

b. Gruppenvariable: klinisches Erscheinungsbild

Zeitpunkt: 12. – 16. Woche

Ränge

klinisches Erscheinungsbild		N	Mittlerer Rang	Rangsumme
Färbung des BG	klinische Atrophie	19	11,47	218,00
	keine klin. Atrophie	4	14,50	58,00
	Gesamt	23		

Statistik für Test^b

	Färbung des BG
Mann-Whitney-U	28,000
Wilcoxon-W	218,000
Z	-,832
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	<u>,405</u>
Exakte Signifikanz [2*(1-seitig Sig.)]	,456 ^a

a. Nicht für Bindungen korrigiert.

b. Gruppenvariable: klinisches Erscheinungsbild

Gruppe: klinische Atrophie

Ränge

	Zeitpunkt	N	Mittlerer Rang	Rangsumme
Färbung des BG	4. bis 8. Woche	24	26,88	645,00
	12. bis 16. Woche	19	15,84	301,00
	Gesamt	43		

Statistik für Test^a

	Färbung des BG
Mann-Whitney-U	111,000
Wilcoxon-W	301,000
Z	-2,927
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	<u>,003</u>

a. Gruppenvariable: Zeitpunkt

Gruppe: keine klinische Atrophie

Ränge

Zeitpunkt	N	Mittlerer Rang	Rangsumme
Färbung des BG 4. bis 8. Woche	6	6,08	36,50
12. bis 16. Woche	4	4,63	18,50
Gesamt	10		

Statistik für Test^b

	Färbung des BG
Mann-Whitney-U	8,500
Wilcoxon-W	18,500
Z	-,763
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	<u>,446</u>
Exakte Signifikanz [2*(1-seitig Sig.)]	,476 ^a

a. Nicht für Bindungen korrigiert.

b. Gruppenvariable: Zeitpunkt

Färbung: Nitrotyrosin

Zeitpunkt: 4. – 8. Woche

Ränge

klinisches Erscheinungsbild	N	Mittlerer Rang	Rangsumme
Färbung des BG klinische Atrophie	24	15,21	365,00
keine klin. Atrophie	6	16,67	100,00
Gesamt	30		

Statistik für Test^b

	Färbung des BG
Mann-Whitney-U	65,000
Wilcoxon-W	365,000
Z	-,426
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	<u>,670</u>
Exakte Signifikanz [2*(1-seitig Sig.)]	,743 ^a

a. Nicht für Bindungen korrigiert.

b. Gruppenvariable: klinisches
Erscheinungsbild

Zeitpunkt: 12. – 16. Woche

Ränge

	klinisches Erscheinungsbild	N	Mittlerer Rang	Rangsumme
Färbung des BG	klinische Atrophie	22	13,14	289,00
	keine klin. Atrophie	4	15,50	62,00
	Gesamt	26		

Statistik für Test^b

	Färbung des BG
Mann-Whitney-U	36,000
Wilcoxon-W	289,000
Z	-,611
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	<u>,541</u>
Exakte Signifikanz [2*(1-seitig Sig.)]	,607 ^a

a. Nicht für Bindungen korrigiert.

b. Gruppenvariable: klinisches
Erscheinungsbild

Gruppe: klinische Atrophie

Ränge

Zeitpunkt	N	Mittlerer Rang	Rangsumme
Färbung des BG 4. bis 8. Woche	24	25,50	612,00
12. bis 16. Woche	22	21,32	469,00
Gesamt	46		

Statistik für Test^a

	Färbung des BG
Mann-Whitney-U	216,000
Wilcoxon-W	469,000
Z	-1,171
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	<u>,242</u>

a. Gruppenvariable: Zeitpunkt

Gruppe: keine klinische Atrophie

Ränge

Zeitpunkt	N	Mittlerer Rang	Rangsumme
Färbung des BG 4. bis 8. Woche	6	5,67	34,00
12. bis 16. Woche	4	5,25	21,00
Gesamt	10		

Statistik für Test^b

	Färbung des BG
Mann-Whitney-U	11,000
Wilcoxon-W	21,000
Z	-,244
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	<u>,807</u>
Exakte Signifikanz [2*(1-seitig Sig.)]	,914 ^a

a. Nicht für Bindungen korrigiert.

b. Gruppenvariable: Zeitpunkt

Färbung: 8-Isoprostan

Zeitpunkt: 4. – 8. Woche

Ränge

	klinisches Erscheinungsbild	N	Mittlerer Rang	Rangsumme
Färbung des BG	klinische Atrophie	24	15,42	370,00
	keine klin. Atrophie	6	15,83	95,00
	Gesamt	30		

Statistik für Test^b

	Färbung des BG
Mann-Whitney-U	70,000
Wilcoxon-W	370,000
Z	-,108
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	<u>,914</u>
Exakte Signifikanz [2*(1-seitig Sig.)]	,940 ^a

a. Nicht für Bindungen korrigiert.

b. Gruppenvariable: klinisches
Erscheinungsbild

Zeitpunkt: 12. – 16. Woche

Ränge

	klinisches Erscheinungsbild	N	Mittlerer Rang	Rangsumme
Färbung des BG	klinische Atrophie	19	11,95	227,00
	keine klin. Atrophie	5	14,60	73,00
	Gesamt	24		

Statistik für Test^b

	Färbung des BG
Mann-Whitney-U	37,000
Wilcoxon-W	227,000
Z	-,769
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	<u>,442</u>
Exakte Signifikanz [2*(1-seitig Sig.)]	,489 ^a

a. Nicht für Bindungen korrigiert.

b. Gruppenvariable: klinisches
Erscheinungsbild

Gruppe: klinische Atrophie

Ränge

Zeitpunkt		N	Mittlerer Rang	Rangsumme
Färbung des BG	4. bis 8. Woche	24	25,77	618,50
	12. bis 16. Woche	19	17,24	327,50
Gesamt		43		

Statistik für Test^a

	Färbung des BG
Mann-Whitney-U	137,500
Wilcoxon-W	327,500
Z	-2,270
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,023

a. Gruppenvariable: Zeitpunkt

Gruppe: keine klinische Atrophie

Ränge

Zeitpunkt		N	Mittlerer Rang	Rangsumme
Färbung des BG	4. bis 8. Woche	6	7,08	42,50
	12. bis 16. Woche	5	4,70	23,50
Gesamt		11		

Statistik für Test^b

	Färbung des BG
Mann-Whitney-U	8,500
Wilcoxon-W	23,500
Z	-1,301
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	<u>,193</u>
Exakte Signifikanz [2*(1-seitig Sig.)]	,247 ^a

a. Nicht für Bindungen korrigiert.

b. Gruppenvariable: Zeitpunkt

Danksagung

Herzlichen Dank...

- an meinen Doktorvater Priv.-Doz. Dr. Dr. T. Reuther, Leitender Oberarzt der Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie, für die Überlassung dieses Themas und für die jederzeit hervorragende fachliche und menschliche Betreuung,
- an Prof. Dr. W. Bloch, Leiter des Institutes für Sportphysiologie der deutschen Sporthochschule Köln, für die gute Zusammenarbeit und die stets zeitnahe fachliche Unterstützung,
- an Ulrike Kriegebaum & Margit Schleyer für die engagierte und kompetente Zusammenarbeit im MKG-Forschungslabor,
- meinen Eltern für die jederzeit selbstlose Unterstützung, Hilfe und Beratung,
- an Birte Alsmeier für die fleißige Zweitauszählung der abfotografierten Präparate,
- an Frau Sauer für die konstruktive Zusammenarbeit bzgl. der Statistik,
- an Lennart Henny für die Hilfestellung in Zusammenhang mit der Formatierung,
- und zu guter letzt meinen Geschwistern und allen meinen Freunden.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name Jörg Siebers
Geboren 25. September 1983 in Achim

Schulbildung:


1990 – 1994 Grundschule am Roggenkamp, Nordhorn
1994 – 1996 Orientierungsstufe Deegfeld, Nordhorn
1996 – 2003 Gymnasium am Stadtring, Nordhorn
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Studium:

2003 – 2008 Studium der Zahnmedizin an der Julius-
Maximilians-Universität in Würzburg
Nov 2008 Staatsexamen

Zahnärztliche Tätigkeit:

Seit Juli 2009 Assistenz Zahnarzt im Zentrum für Zahnheilkunde Moers



Jörg Siebers