
TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Klinik für Orthopädie und Sportorthopädie

des Klinikums rechts der Isar

(Direktor: Univ.-Prof. Dr. R. von Eisenhart-Rothe)

**Innovatives Verfahren zur Optimierung der
Osteointegration von Knochentransplantaten mittels
RGD-Peptiden**

Rainer Lorenz Wimmer

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Medizin genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. E. J. Rummeny

Prüfer der Dissertation: 1. Priv.-Doz. Dr. R. H. H. Burgkart

2. Univ.-Prof. Dr. R. von Eisenhart-Rothe

Die Dissertation wurde am 14.09.2012 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 17.07.2013 angenommen.

***So eine Arbeit wird eigentlich nie fertig.
Man muss sie für fertig erklären,
wenn man nach Zeit und Umständen das Mögliche getan hat.***

Johann Wolfgang von Goethe, „Italienreise“ (1787)

Die vorliegende Arbeit ist meiner Familie und besonderen Freunden in Dankbarkeit
gewidmet.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	VI
Abbildungsverzeichnis	VIII
Tabellenverzeichnis	XII
1. Einleitung	1
1.1 Funktion des Endothels.....	4
1.2 Angiogenese.....	5
1.3 Extrazelluläre Matrix.....	5
1.3.1 Basalmembran.....	6
1.3.2 Interstitielles Bindegewebe.....	6
1.4 Aufbau und Funktion der Integrine.....	7
2. Material und Methodik	11
2.1 Geräte und Material.....	11
2.1.1 Geräte.....	11
2.1.2 Verbrauchsmaterial.....	13
2.1.3 Medien, Chemikalien und Reagenzien.....	14
2.2 Methodik.....	18
2.2.1 Knochenchips.....	18
2.2.1.1 Herkunft der Knochen.....	18
2.2.1.2 Vorbereitung der Knochenkuben.....	18
2.2.2 Zellkultur.....	19
2.2.2.1 Herstellung der Kulturmedien.....	19
2.2.2.2 Herstellung von Endothelzellkulturen.....	20
2.2.2.3 Kryokonservierung und Auftauen von Endothelzellen.....	21
2.2.3 Design des RGD-Peptids.....	22
2.2.4 Versuchsaufbau.....	23
2.2.4.1 Adhäsion radioaktiv markierter RGD-Peptide.....	23
2.2.4.2 Adhäsion und Proliferation von Endothelzellen.....	24

Inhaltsverzeichnis

2.2.4.3	Messung der Endothelzelladhäsion und -proliferation mittels Hexosaminidase-Assay.....	27
2.2.5	Färbungen.....	28
2.2.5.1	PMMA-Einbettung.....	28
2.2.5.1.1	Fixation der Knochenpräparate.....	28
2.2.5.1.2	Dehydrierung.....	30
2.2.5.1.3	Entstabilisierung der Basislösung.....	31
2.2.5.1.4	Infiltration und Polymerisation.....	31
2.2.5.2	Anfertigen von Dünnschnitten.....	34
2.2.5.3	Deacrylierung der Schnitte.....	35
2.2.5.4	Färbung der Dünnschnitte.....	36
2.2.5.4.1	Masson-Goldner-Färbung für PMMA.....	36
2.2.5.4.2	Toluidinblau-O-Färbung.....	39
2.2.6	Einbettung der histologischen Schnitte.....	40
2.2.7	Immunhistochemie nach der ABC-Methode.....	40
2.2.7.1	Vorversuche mit Frischpräparaten.....	42
2.2.7.2	Hauptversuche mit PMMA-Schnitten.....	45
2.2.8	Mikroskopie.....	49
2.2.9	Statistik.....	49
3.	Ergebnisse und Auswertung.....	51
3.1	Adhäsion radioaktiv markierter RGD-Peptide.....	51
3.1.1	Vergleich der RGD-Adhäsion auf den unterschiedlich gereinigten Knochenkuben innerhalb einer Konzentration.....	52
3.1.1.1	Konzentration 1 µmol.....	53
3.1.1.2	Konzentration 10 µmol.....	54
3.1.1.3	Konzentration 72 µmol.....	55
3.1.2	Vergleich der RGD-Adhäsion bei unterschiedlichen Konzentrationen innerhalb einer Reinigungsart.....	56
3.1.2.1	Ultraschall.....	56
3.1.2.2	Aceton.....	57
3.1.2.3	Nativ.....	58

Inhaltsverzeichnis

3.2	Hauptversuche Endothelzelladhäsion und -proliferation.....	58
3.2.1	Endothelzelladhäsion der Einzelversuche.....	60
3.2.1.1	Ultraschall.....	60
3.2.1.2	Aceton.....	65
3.2.1.3	Nativ.....	69
3.2.2	Endothelzellproliferation der Einzelversuche.....	72
3.2.2.1	Ultraschall.....	73
3.2.2.2	Aceton.....	78
3.2.2.3	Nativ.....	82
3.2.3	Zusammenfassung Endothelzelladhäsion.....	85
3.2.3.1	Ultraschall.....	86
3.2.3.2	Aceton.....	87
3.2.3.3	Nativ.....	88
3.2.4	Zusammenfassung Endothelzellproliferation.....	88
3.2.4.1	Ultraschall.....	89
3.2.4.2	Aceton.....	90
3.2.4.3	Nativ.....	91
3.2.5	Vergleich der Endothelzelladhäsion und -proliferation auf RGD- beschichteten Knochenkuben bezüglich der unterschiedlichen Reinigungsverfahren.....	91
3.2.5.1	Adhäsion.....	92
3.2.5.2	Proliferation.....	93
3.3	Färbungen.....	94
3.3.1	Masson-Goldner-Färbung für PMMA.....	94
3.3.2	Toluidinblau-O-Färbung.....	99
3.3.3	Immunhistochemie nach der ABC-Methode.....	104

4.	Diskussion.....	107
4.1	Rekonstruktion von Knochendefekten.....	107
4.2	Methodik und Ergebnisse.....	108
4.3	Ausblick.....	120
5.	Zusammenfassung.....	121
6.	Literaturverzeichnis.....	123
7.	Anhang.....	132
7.1	Statistische Ergebnisse.....	132
7.1.1	Vergleich der Radioaktiv-RGD-Adhäsion auf den unterschiedlich gereinigten Knochenkuben innerhalb einer Konzentration.....	132
7.1.1.1	Konzentration 1 μmol	132
7.1.1.2	Konzentration 10 μmol	134
7.1.1.3	Konzentration 72 μmol	135
7.1.2	Vergleich der Radioaktiv-RGD-Adhäsion bei unterschiedlichen Konzentrationen innerhalb einer Reinigungsart.....	137
7.1.2.1	Aceton.....	137
7.1.2.2	Nativ.....	139
7.1.2.3	Ultraschall.....	139
7.1.3	Hauptversuche Endothelzelladhäsion und -proliferation.....	141
7.1.3.1	Messreihen Adhäsion.....	141
7.1.3.2	Messreihen Proliferation.....	144
7.1.3.3	Adhäsion und Proliferation der Endothelzellen auf den ver- schiedenen Knochen.....	146
7.1.3.3.1	Versuch 1 (Ultraschall).....	146
7.1.3.3.2	Versuch 2 (Ultraschall).....	147
7.1.3.3.3	Versuch 3 (Aceton).....	148
7.1.3.3.4	Versuch 4 (Nativ).....	149
7.1.3.3.5	Versuch 5 (Nativ).....	151
7.1.3.3.6	Versuch 6 (Nativ).....	152

Inhaltsverzeichnis

7.1.3.3.7	Versuch 7 (Aceton).....	153
7.1.3.3.8	Versuch 8 (Aceton).....	154
7.1.3.3.9	Versuch 9 (Nativ).....	155
7.1.3.3.10	Versuch 10 (Ultraschall).....	157
7.1.3.3.11	Versuch 11 (Ultraschall).....	158
7.1.3.3.12	Versuch 12 (Aceton).....	159
7.1.3.3.13	Versuch 13 (Ultraschall).....	160
7.1.3.4	Vergleich aller Adhäsionen und Proliferationen innerhalb einer Knochenreinigungsgruppe.....	161
7.1.3.4.1	Ultraschall.....	161
7.1.3.4.2	Aceton.....	162
7.1.3.4.3	Nativ.....	164
7.1.3.5	Vergleich der Endothelzelladhäsion und -proliferation auf RGD-beschichteten Knochenkuben bezüglich der unterschiedlichen Reinigungsverfahren.....	165
7.1.3.5.1	Adhäsion.....	165
7.1.3.5.2	Proliferation.....	167
7.1.3.6	Vergleich der Endothelzellproliferation auf RGD-unbeschichteten Knochenkuben bezüglich der unterschiedlichen Reinigungsverfahren.....	169
7.2	Danksagung.....	170
7.3	Eidesstattliche Erklärung.....	172

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Ahx	6-Aminohexanoic Acid
AK	Antikörper
ALP	Alkalische Phosphatase
Art.	Artikel
Bl	Blankwert
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
Ca ²⁺	Calcium
cf.	confer!
cm	Zentimeter
CPM/g	Counts Per Minute pro Gramm
d.h.	das heißt
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
ECM	Extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiaminotetraessigsäure
FCS	Fetal Calf Serum
g	Gramm
ggf.	gegebenenfalls
h	Stunde/n
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cells
inkl.	inklusive
kHz	Kilohertz
Konz.	Konzentration
L	Liter
mg	Milligramm
µg	Mikrogramm

Abkürzungsverzeichnis

µl	Mikroliter
µM	Mikro-Mol
Min.	Minuten
mm	Millimeter
mM	Milli-Mol
Mw	Mittelwert
NaOH	Natriumhydroxid
Nm	Nanometer
Nr.	Nummer
OD	Optische Dichte
PBS	Phosphated-Buffered Saline
RT	Raumtemperatur
S.	Seite
sog.	sogenannt
Stabw	Standardabweichung
Tab.	Tabelle
u.a.	unter anderem
v.a.	vor allem
VEGF	Vascular Endothel Growth Factor
vs.	versus

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Adhäsion von Zellen auf RGD-beschichteten Titaniumplättchen 7x7 mm	3
Abbildung 2: Zwei-Tage-Wachstum von Endothelzellen auf RGD-beschichtetem Knochen	4
Abbildung 3: Aminosäuresequenz des zyklischen RGD-Peptids RGDfK	7
Abbildung 4: Strukturformel von cyclo(-RGDfK)-Ahx-Ahx-Ahx-K-(K-PPA ₂) ₂	22
Abbildung 5: Stimulierung der Zelladhäsion durch RGD-Peptide	23
Abbildung 6: Radioaktiv markiertes RGD	24
Abbildung 7: Versuchsaufbau Adhäsion/ Proliferation.....	26
Abbildung 8: Leeres Glasfläschchen mit Polymerisationsblock.....	34
Abbildung 9: Objektträgerpresse mit Schnitten.....	35
Abbildung 10: Funktionsschema ABC-Methode	42
Abbildung 11: Pufferbefüllte Kunststoffküvette mit Leerschnitten.....	48
Abbildung 12: Vergleich der Adhäsion radioaktiv markierter RGD (1 µmol) auf unterschiedlich gereinigten Knochenkuben pro Gramm.....	53
Abbildung 13: Vergleich der Adhäsion radioaktiv markierter RGD (10 µmol) auf unterschiedlich gereinigten Knochenkuben pro Gramm.....	54
Abbildung 14: Vergleich der Adhäsion radioaktiv markierter RGD (72 µmol) auf unterschiedlich gereinigten Knochenkuben pro Gramm.....	55
Abbildung 15: Vergleich der Adhäsion radioaktiv markierter RGD bei unter- schiedlichen Konzentrationen auf ultraschallgereinigten Kno- chenkuben pro Gramm.....	56
Abbildung 16: Vergleich der Adhäsion radioaktiv markierter RGD bei unter- schiedlichen Konzentrationen auf acetongereinigten Knochen- kuben pro Gramm	57
Abbildung 17: Vergleich der Adhäsion radioaktiv markierter RGD bei unter- schiedlichen Konzentrationen auf nativen Knochenkuben pro Gramm	58
Abbildung 18: Vergleich der Endothelzelladhäsion mit und ohne RGD-Beschich- tung auf ultraschallgereinigten Knochen (Versuch 1).....	60
Abbildung 19: Vergleich der Endothelzelladhäsion mit und ohne RGD-Beschich- tung auf ultraschallgereinigten Knochen (Versuch 2).....	61
Abbildung 20: Vergleich der Endothelzelladhäsion mit und ohne RGD-Beschich- tung auf ultraschallgereinigten Knochen (Versuch 10).....	62
Abbildung 21: Vergleich der Endothelzelladhäsion mit und ohne RGD-Beschich- tung auf ultraschallgereinigten Knochen (Versuch 11).....	63
Abbildung 22: Vergleich der Endothelzelladhäsion mit und ohne RGD-Beschich- tung auf ultraschallgereinigten Knochen (Versuch 13).....	64
Abbildung 23: Vergleich der Endothelzelladhäsion mit und ohne RGD-Beschich- tung auf acetongereinigten Knochen (Versuch 3)	65

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 24: Vergleich der Endothelzelladhäsion mit und ohne RGD-Beschichtung auf acetongereinigten Knochen (Versuch 7)	66
Abbildung 25: Vergleich der Endothelzelladhäsion mit und ohne RGD-Beschichtung auf acetongereinigten Knochen (Versuch 8)	67
Abbildung 26: Vergleich der Endothelzelladhäsion mit und ohne RGD-Beschichtung auf acetongereinigten Knochen (Versuch 12)	68
Abbildung 27: Vergleich der Endothelzelladhäsion mit und ohne RGD-Beschichtung auf nativen Knochen (Versuch 4)	69
Abbildung 28: Vergleich der Endothelzelladhäsion mit und ohne RGD-Beschichtung auf nativen Knochen (Versuch 5)	70
Abbildung 29: Vergleich der Endothelzelladhäsion mit und ohne RGD-Beschichtung auf nativen Knochen (Versuch 6)	71
Abbildung 30: Vergleich der Endothelzelladhäsion mit und ohne RGD-Beschichtung auf nativen Knochen (Versuch 9)	72
Abbildung 31: Vergleich der Endothelzellproliferation mit und ohne RGD-Beschichtung auf ultraschallgereinigten Knochen (Versuch 1)	73
Abbildung 32: Vergleich der Endothelzellproliferation mit und ohne RGD-Beschichtung auf ultraschallgereinigten Knochen (Versuch 2)	74
Abbildung 33: Vergleich der Endothelzellproliferation mit und ohne RGD-Beschichtung auf ultraschallgereinigten Knochen (Versuch 10)	75
Abbildung 34: Vergleich der Endothelzellproliferation mit und ohne RGD-Beschichtung auf ultraschallgereinigten Knochen (Versuch 11)	76
Abbildung 35: Vergleich der Endothelzellproliferation mit und ohne RGD-Beschichtung auf ultraschallgereinigten Knochen (Versuch 13)	77
Abbildung 36: Vergleich der Endothelzellproliferation mit und ohne RGD-Beschichtung auf acetongereinigten Knochen (Versuch 3)	78
Abbildung 37: Vergleich der Endothelzellproliferation mit und ohne RGD-Beschichtung auf acetongereinigten Knochen (Versuch 7)	79
Abbildung 38: Vergleich der Endothelzellproliferation mit und ohne RGD-Beschichtung auf acetongereinigten Knochen (Versuch 8)	80
Abbildung 39: Vergleich der Endothelzellproliferation mit und ohne RGD-Beschichtung auf acetongereinigten Knochen (Versuch 12)	81
Abbildung 40: Vergleich der Endothelzellproliferation mit und ohne RGD-Beschichtung auf nativen Knochen (Versuch 4)	82
Abbildung 41: Vergleich der Endothelzellproliferation mit und ohne RGD-Beschichtung auf nativen Knochen (Versuch 5)	83
Abbildung 42: Vergleich der Endothelzellproliferation mit und ohne RGD-Beschichtung auf nativen Knochen (Versuch 6)	84
Abbildung 43: Vergleich der Endothelzellproliferation mit und ohne RGD-Beschichtung auf nativen Knochen (Versuch 9)	85
Abbildung 44: Zusammenfassung Endothelzelladhäsion mit und ohne RGD-Beschichtung auf ultraschallgereinigten Knochenkuben.....	86

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 45: Zusammenfassung Endothelzelladhäsion mit und ohne RGD-Beschichtung auf acetongereinigten Knochenkuben	87
Abbildung 46: Zusammenfassung Endothelzelladhäsion mit und ohne RGD-Beschichtung auf nativen Knochenkuben	88
Abbildung 47: Zusammenfassung Endothelzellproliferation mit und ohne RGD-Beschichtung auf ultraschallgereinigten Knochenkuben	89
Abbildung 48: Zusammenfassung Endothelzellproliferation mit und ohne RGD-Beschichtung auf acetongereinigten Knochenkuben	90
Abbildung 49: Zusammenfassung Endothelzellproliferation mit und ohne RGD-Beschichtung auf nativen Knochenkuben	91
Abbildung 50: Vergleich der Endothelzelladhäsion auf RGD-beschichteten Knochenkuben bezüglich der unterschiedlichen Reinigungsverfahren..	92
Abbildung 51: Vergleich der Endothelzellproliferation auf RGD-beschichteten Knochenkuben bezüglich der unterschiedlichen Reinigungsverfahren..	93
Abbildung 52: Masson-Goldner-Färbung von Endothelzellen auf RGD-beschichtetem Knochen (nativ), 10fache Vergrößerung	94
Abbildung 53: Masson-Goldner-Färbung von Endothelzellen auf RGD-beschichtetem Knochen (nativ), 32fache Vergrößerung.....	95
Abbildung 54: Masson-Goldner-Färbung von Endothelzellen auf RGD-beschichtetem Knochen (Ultraschall), 20fache Vergrößerung	96
Abbildung 55: Masson-Goldner-Färbung von Endothelzellen auf RGD-unbeschichtetem Knochen (Ultraschall), 20fache Vergrößerung	97
Abbildung 56: Negativprobe Masson-Goldner-Färbung von Endothelzellen auf Knochen (nativ), 20fache Vergrößerung	98
Abbildung 57: Toluidinfärbung von Endothelzellen auf RGD-beschichtetem Knochen (Ultraschall), 32fache Vergrößerung.....	99
Abbildung 58: Toluidinfärbung von Endothelzellen auf RGD-unbeschichtetem Knochen (Ultraschall), 32fache Vergrößerung	100
Abbildung 59: Toluidinfärbung von Endothelzellen auf RGD-beschichtetem Knochen (nativ), 32fache Vergrößerung.....	101
Abbildung 60: Toluidinfärbung von Endothelzellen auf RGD-beschichtetem Knochen (nativ), 20fache Vergrößerung, Phasenkontrastmikroskopaufnahme	102
Abbildung 61: Toluidinfärbung von Endothelzellen auf RGD-unbeschichtetem Knochen (nativ), 32fache Vergrößerung	103
Abbildung 62: Positivkontrolle Endothelzellen, Hämalauengegenfärbung, 20fache Vergrößerung	104
Abbildung 63: Negativkontrolle Osteoblasten, Hämalauengegenfärbung, 20fache Vergrößerung	104
Abbildung 64: Immunhistochemie CD31 von RGD-beschichtetem Knochen (nativ), 10fache Vergrößerung.....	105
Abbildung 65: Immunhistochemie CD31 von RGD-beschichtetem Knochen (nativ), 32fache Vergrößerung.....	105

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 66: Immunhistochemie CD31 von RGD-beschichtetem Knochen (nativ), 10fache Vergrößerung.....	106
Abbildung 67: Vergleich der Endothelzellproliferation auf RGD-unbeschichteten Knochenkuben bezüglich der unterschiedlichen Reinigungsverfahren.....	169

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Adhäsion von Zellen auf RGD-beschichteten Titaniumplättchen 7x7 mm.....	3
Tabelle 2: Dehydrationschema	30
Tabelle 3: Systemkomponenten Technovit 9100 Neu	31
Tabelle 4: Herstellung der Gebrauchslösungen.....	32
Tabelle 5: Schema zur Deacrylierung.....	36
Tabelle 6: Zusammensetzung Ponceau-Xylidine-Säurefuchsinlösung	37
Tabelle 7: Zusammensetzung Phosphorwolframsäure-Orange G.....	38
Tabelle 8: Zusammensetzung Lichtgrün.....	38
Tabelle 9: Schritte der Masson-Goldner-Färbung.....	38
Tabelle 10: Zusammensetzung Toluidinblau-O-Lösung	39
Tabelle 11: Schritte der Toluidinblau-O-Färbung.....	40
Tabelle 12: Schema Zellfixierung	43
Tabelle 13: Schritte der Immunhistologieversuche für Endothelzellen an frischen Präparaten	44
Tabelle 14: Immunhistologie von PMMA-Schnitten	46
Tabelle 15: Adhäsion des radioaktiv markierten RGD auf Knochen nach einem Tag	51
Tabelle 16: Aufstellung aller colorimetrisch gemessener Mittelwerte von Endothel- zelladhäsion und -proliferation auf den unterschiedlich gereinigten Knochenkuben mit und ohne RGD-Beschichtung abzüglich der korrespondierenden Leerwerte.....	59

1. Einleitung

Fester therapeutischer Bestandteil ausgedehnter tumor- oder traumabedingter sowie chronisch infektiöser Defekte des Skelettsystems ist die Knochentransplantation, da sich dort ansonsten lediglich ein Bindegewebiger Ersatz mit ungenügender Stabilität ausbilden würde, falls keine Auffüllung mit geeignetem Material stattfände. So geht man in der Bundesrepublik Deutschland von etwa 75 000 autogenen und 30 000 allogenen Knochentransplantationen jährlich aus [Europäisches Parlament und Europäischer Rat 2004]. Das bedeutet, dass bei rund 15% der Operationen im Rahmen der Wiederherstellungschirurgie der Bewegungsorgane Knochentransplantate zum Einsatz kommen [Bundesärztekammer 1990, S. A59]. In den USA belief sich 2001 die Zahl der jährlichen Knochentransplantationen mit Allografts sogar auf etwa 875 000 [Kainer 2004]. Die Anwendungsgebiete erstrecken sich dabei von der Frakturversorgung [Stevenson 1998] über die Tumorchirurgie [Farid 2006; Sarkar 2003] bis hin zur Revisionsendoprothetik [Bezwada 2006; Gamradt 2003]. Aufgrund des zunehmenden Anteils älterer Menschen sowie eines erweiterten Indikationsbereichs ist eine Zunahme des Bedarfes an Knochenersatzmaterialien anzunehmen. Prinzipiell eignet sich autogenes Knochenmaterial zur Defektauffüllung am besten. Als Goldstandard zählt daher derzeit autologer spongiöser Knochen des Beckenkammes [Flören 2007], der gut einheilt und im allgemeinen Knochenstoffwechsel umgebaut wird [Rueger 1998]. Autogener Knochen steht allerdings nur in begrenztem Umfang zur Verfügung und stellt zudem bei der Entnahme im Rahmen eines Zweiteingriffes ein zusätzliches Risiko bzgl. Blutung, Infektion, Thromboembolie etc. dar [von Garrel 1998]. Alternativ stehen deshalb allogene Knochentransplantate aus Knochenbanken zur Verfügung [Winter 1994], deren Spongiosa zwar optimale Bedingungen für eine rasche Gefäßeinsprossung und somit eine hohe osteokonduktive Potenz besitzen [von Garrel 1998], jedoch eine geringere Wertigkeit im Vergleich zum autogenen Transplantat als auch ein erhöhtes Risiko bzgl. der Übertragung von Krankheitserregern aufweisen [Aebi 1991], wie James im Falle der Übertragung von Tuberkulose [James 1953] oder Shutkin mit der Übertragung von Hepatitis durch konservierte Knochentransplantate belegen

konnten [Shutkin 1954]. Später wurde auch über HIV-Übertragungen durch allogene Knochentransplantate berichtet [Schratt 1996].

Um demnach Allografts überhaupt verwenden zu können, bedarf es zur Senkung des Infektionsrisikos zunächst einer Sterilisation des Knochens, wofür es unterschiedliche Möglichkeiten, wie beispielsweise Bestrahlung oder Autoklavierung gibt. Dadurch kommt es jedoch zu einer Verschlechterung biologischer und biomechanischer Eigenschaften der Allografts [Araki 1999; Böhm 1998, 2003], die folglich zur verzögerten Einheilung oder gar zu Ermüdungsfrakturen führen können [Hornicek 2001; Sorger 2001; Sugimoto 1991; Zoricic 2002]. Diese Devitalisierungsverfahren induzieren einen mehr oder minder großen Verlust der osteoinduktiven Fähigkeit, wodurch die Osteoneogenesewirksamkeit herabgesetzt wird [von Garrel 1998]. Aus diesem Grund ist eine Biofunktionalisierung sterilisierter autogener oder allogener Transplantate mit osteoinduktiven Substanzen wie der RGD-Peptide durchaus sinnvoll. Vor diesem Hintergrund besteht das Interesse, auf Basis der etablierten Präparationsprozesse der Knochenmaterialien [Hofmann 2000] mittels Biofunktionalisierung eine Optimierung der Osteointegration solcher Allografts zu erreichen.

In Untersuchungen konnte bereits gezeigt werden, dass durch Biofunktionalisierung, oder konkreter gesagt durch die Beschichtung mit RGD-Peptiden, von Implantatoberflächen das Einwachsverhalten durch Stimulierung der Osteoblasten verbessert werden kann [Kantlehner 2000].

Steinhauser et al. konnten zudem zeigen, dass auch bei *In-vivo*-Versuchen am Schaf die Implantation von RGD-beschichtetem metallischem Prothesenmaterial zu verbessertem Einwachsen führt [Steinhauser 2005].

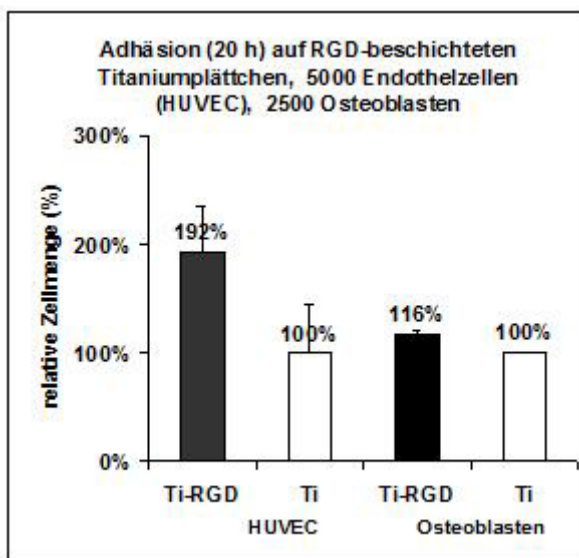
Im Gegensatz zu Metallen handelt es sich jedoch beim Knochen um eine biologische Oberfläche, die durch Reinigungs- und Sterilisationsprozesse verändert wird, so dass bereits gewonnene Erkenntnisse durch Beschichtung metallischer Implantate nicht auf Knochen übertragbar sind. Auch wenn in einer Untersuchung durch Magdolen et al. erstmals gezeigt werden konnte, dass durch Biofunktionalisierung von sterilisiertem Knochen mit RGD-Peptiden *in vitro* das Wachstum von Osteoblasten stimuliert und signifikant beschleunigt, die Adhäsionsrate jedoch nicht verbessert werden kann [Magdolen 2006], ist beim verzögerten Einwachsen von sterilisiertem Knochenmaterial eine unzureichende Gefäßneubildung als das zentrale Problem anzusehen. Denn neben den Osteoblasten haben auch Endothelzellen eine

Einleitung

Schlüsselfunktion für das Einwachsverhalten der Auto- und Allografts. Da auch Endothelzellen an RGD-Peptide binden [Holland 1996], könnte die RGD-Beschichtung der Transplantatoberfläche ebenfalls einen positiven Effekt auf das Endothelzellwachstum und somit auf die Neovaskularisierung des Reimplantates haben, wodurch der Einheilungsprozess insgesamt positiv beeinflusst werden könnte.

Unveröffentlichte Vorversuche der Arbeitsgruppe des Verfassers konnten im Vergleich zu unbeschichteten Titaniumplättchen neben einer vermehrten Adhäsion von Osteoblasten auch eine vermehrte Adhäsion von Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVEC) auf RGD-beschichteten Titaniumplättchen nachweisen (Abbildung 1, Tabelle 1).

Abbildung 1: Adhäsion von Zellen auf RGD-beschichteten Titaniumplättchen 7x7 mm

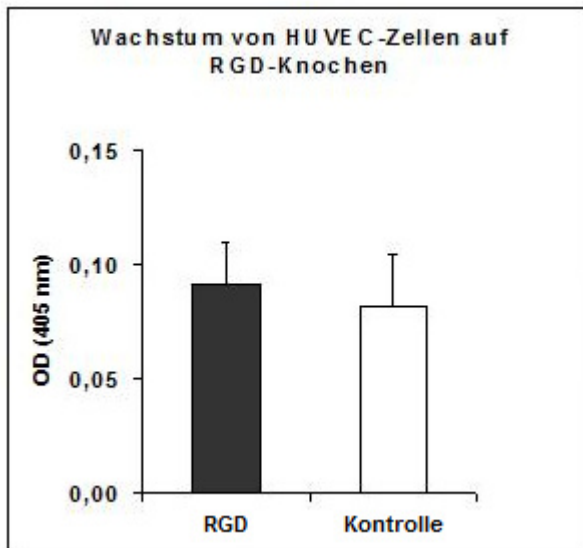


Zellart	Oberfläche	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Mw - BI	Stabw	Adhäsion %	Stabw %
HUVEC	Titan-RGD	0,207	0,273	0,286	0,188	0,042	192%	43%
	Titan	0,12	0,208	0,166	0,098	0,044	100%	45%
Osteoblasten	Titan-RGD	0,625	0,638	0,660	0,574	0,018	116%	4%
	Titan	0,564	0,558		0,494	0,004	100%	1%

Tabelle 1: Adhäsion von Zellen auf RGD-beschichteten Titaniumplättchen 7x7 mm

Auch bei einem Proliferationsvorversuch der oben genannten Arbeitsgruppe über zwei Tage war in einer *In-vitro*-Besiedelung auf gereinigten, humanen Knochenfragmenten ein positiver Effekt durch die Biofunktionalisierung der Oberfläche mit RGD zu verzeichnen, so dass die Methode erfolgversprechend erscheint (Abb. 2).

Abbildung 2: Zwei-Tage-Wachstum von Endothelzellen auf RGD-beschichtetem Knochen



Um die komplexen Zusammenhänge und Interaktionen der Angiogenese zu verstehen, wird diese nachstehend in groben Zügen erläutert, insbesondere im Hinblick auf die Funktion der RGD-Peptide.

1.1 Funktion des Endothels

Der menschliche Körper wird von einem fein verästelten und dichten System von Blutgefäßen durchzogen. Das Endothel als Barriere zwischen strömendem Blut und Gefäßwand hat viele Funktionen. Seine Aufgabe besteht z.B. darin, jede Zelle des Körpers mit Sauerstoff und Nährstoffen zu versorgen und den Abtransport der Stoffwechselprodukte zu gewährleisten. Es kontrolliert den Stoffaustausch zwischen Intra- und Extravasalraum, die Hämostase und die Beteiligung an immunologischen Prozessen wie Entzündungsreaktionen [Wu 1996]. Je nach Gefäßtyp bestehen die Wände der Blutgefäße aus mehreren, unterschiedlich stark ausgeprägten Schichten. Ihre Innenseite ist mit einer Endothelzellschicht ausgekleidet, welche u.a. die Blutgerinnung verhindert. Aufgrund der langen Lebensdauer von mehreren Monaten bis Jahren [Harris 1994, S. 1152] ist der Anteil proliferierender Zellen des Endothels

mit ca. einem Prozent *in vivo* gering. Im Rahmen der Gefäßneubildung, Wundheilung oder Tumorentstehung kann dieser Wert jedoch deutlich ansteigen [Lemarchand 1992].

1.2 Angiogenese

Den Prozess der Aussprossung neuer Blutkapillaren aus bereits bestehenden Blutgefäßen nennt man Angiogenese oder Neovaskularisation. Sie spielt neben der Embryonalentwicklung und dem Aufbau der Gebärmutterschleimhaut eine wichtige Rolle bei der Wundheilung [Kim 2000] und ist nicht nur von Wachstumsfaktoren sondern auch von bestimmten molekularen Interaktionen zwischen Endothelzellen und Komponenten der extrazellulären Matrix (ECM) abhängig. Die Angiogenese, die von den Endothelzellen der Kapillaren ausgeht, wird bei Sauerstoffmangel oder Verletzung durch stimulierende Signale des angrenzenden Gewebes induziert. Die aktivierten Endothelzellen sezernieren dabei Proteasen, wie beispielsweise den Plasminogenaktivator. Nach Auflösung der umgebenden subendothelialen Basallamina und einsetzender Proliferation ermöglicht ihnen dies die Ausbildung eines Zellstranges, der dem zu durchblutenden Gewebe entgegenwächst [Folkman 1987; Ware 1999, S. 30ff.]. Die Migration der Endothelzellen, die während dieses Vorgangs zu beobachten ist, beruht auf Wechselwirkungen zwischen $\alpha_v\beta_3$ -Integrinen und Komponenten der ECM wie Vitronectin oder Laminin, weshalb $\alpha_v\beta_3$ auch als Marker der Angiogenese bezeichnet wird [Sheu 1997].

1.3 Extrazelluläre Matrix

In der Regel besteht die ECM aus zwei Kompartimenten, nämlich der Basalmembran und dem interstitiellen Bindegewebe, die sich in Aufbau und Funktion unterscheiden [Liotta 1986]. Neben Funktionen wie Adhäsion und Migration von Zellen hat die ECM einen wesentlichen Einfluss auf das Zellwachstum und die Differenzierung der mit ihr kommunizierenden Zellen, die überwiegend über Integrine gesteuert wird [Weaver 1997]. Eines der Hauptmoleküle der ECM ist das Laminin, das an solche Integrine bindet und auf diese Weise wie eingangs erwähnt Adhäsion, Migration, Differenzierung und Zellwachstum vermittelt [Malinda 1996; Timpl 1979].

1.3.1 Basalmembran

Die Basalmembran ist eine zellarme und kollagenfaserreiche Membran, die Endothelien und Epithelien vom interstitiellen Bindegewebe trennt und als makromolekularer Filter dient. Als Barriere soll sie die Zellinfiltration verhindern.

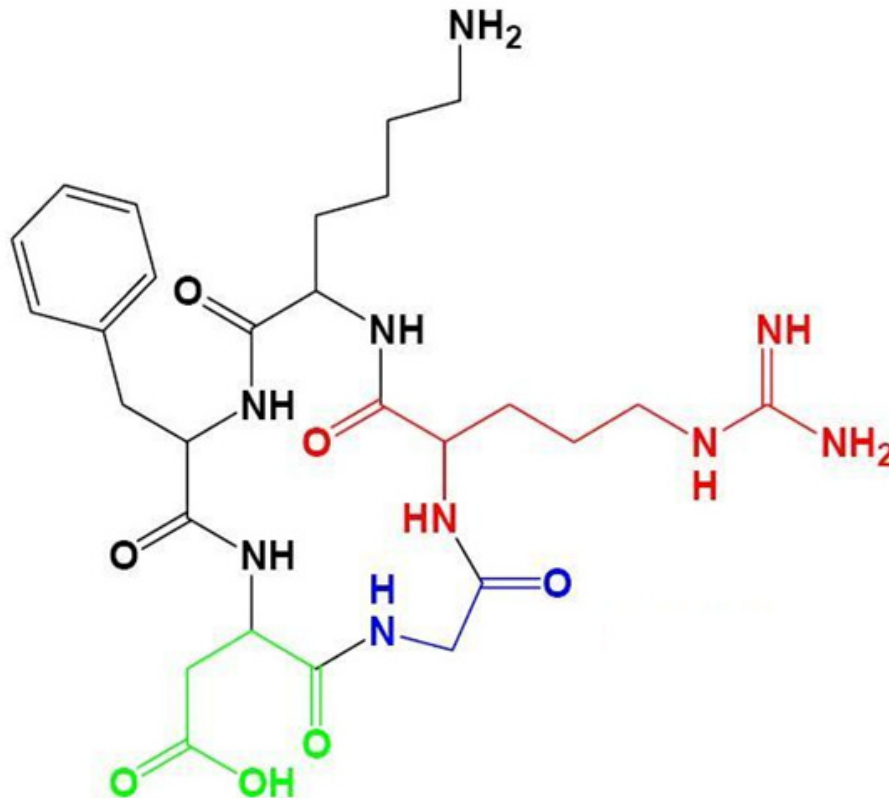
1.3.2 Interstitielles Bindegewebe

Das interstitielle Bindegewebe besteht aus Kollagenfasern, Elastin, Glykosaminoglykanen und Glykoproteinen. Die beiden bedeutsamsten Glykoproteine sind Vitronektin und Fibronektin.

Vitronektin gehört zur Gruppe der Plasmaglykoproteine, ist in der ECM mit elastischen Fasern assoziiert und funktionell an der Hämostase und Wundheilung beteiligt [Schvartz 1999].

Fibronektin ist ein wichtiges Glykoprotein für die Steuerung der zellulären Organisation [Danen 2001]. Der Kontakt zu Zellen findet über eine spezielle Zellbindungsdomäne statt, die von Pierschbacher und Rouslahti als die minimale essentielle Adhäsionssequenz (in Fibronektin) identifiziert werden konnte [Pierschbacher 1984]. Es handelt sich dabei um das Tripeptid Arginin, Glycin und Asparaginsäure, genannt RGD (cf. Abb. 3), das von spezifischen Integrinrezeptoren der Zellmembran gebunden wird. Außer der Adhäsion wird von Fibronektin im Verlauf von Morphogenese und Wundheilung auch die Zellmigration vermittelt [Chen 1993]. Es scheint zudem wesentlich an der Kontrolle des Zellwachstums beteiligt zu sein [Mortarini 1992]. Über $\alpha_v\beta_3$ -Integrine aktiviert Fibronektin Signalwege, die ihrerseits zur Aktivierung der Zellproliferation führen [Illario 2005].

Abbildung 3: Aminosäuresequenz des zyklischen RGD-Peptids RGDfK [Engelhard 2005, S.16]
(rot=Arginin, blau=Glycin, grün=Asparaginsäure, fK=d-Phenylalanin-Lysin)



1.4 Aufbau und Funktion der Integrine

Bei Integrinen handelt es sich um transmembranäre heterodimere Glykoproteine, die als Zelloberflächenrezeptoren bei der Vermittlung der Zell-Zell- sowie Zell-Matrix-Adhäsion eine wichtige Rolle spielen [Ruoslahti 1987; Hynes 1992] und aus einer α - und einer β -Untereinheit aufgebaut sind. Bislang sind 18 verschiedene α - und acht verschiedene β -Einheiten bekannt [Rupp 2001]. Das RGD-Tripeptid interagiert mit der α -Untereinheit der Integrine, die, wie bereits oben erwähnt, als multifunktionale Transmembranproteine zelluläre Prozesse wie Migration, Adhäsion, Proliferation und Differenzierung von Zellen steuern [Ruoslahti 1996]. Auf einer Zelle gibt es in etwa 100.000 solcher Integrine [Akiyama 1985]. Unter den Integrinen ist speziell das $\alpha_v\beta_3$ bei der Entstehung neuer Blutgefäße im Gewebe von großer Bedeutung [Brooks 1994] und spielt zudem auch im Knochen-Remodelling eine maßgebliche Rolle [Hynes 2002].

So konnte zum Beispiel in einem Tiermodell gezeigt werden, dass $\alpha_v\beta_3$ -Antagonisten die Ausbildung des Blutgefäßsystems von Embryonen sowie die pathologische Angiogenese mit lediglich sehr geringen Auswirkungen auf das bereits bestehende Gefäßsystem unterbinden können [Eliceiri 2001]. Auch Brooks et al. konnten belegen, dass es sich beim Integrin mit der Untereinheit $\alpha_v\beta_3$ um einen Adhäsionsrezeptor mit maßgeblicher Beteiligung an der Angiogenese handelt, da durch einen gegen $\alpha_v\beta_3$ gerichteten monoklonalen Antikörper die Angiogenese gehemmt wird [Brooks 1994].

Analog dazu konnten Lorger et al. nachweisen, dass durch aktiviertes $\alpha_v\beta_3$ vermehrt VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) exprimiert und so das Wachstum von Hirnmetastasen gefördert wird [Lorger 2009], was ohne entsprechende Blutversorgung nicht möglich wäre.

Das $\alpha_v\beta_3$ wird sowohl von Endothelzellen als auch von Osteoklasten und glatten Muskelzellen exprimiert. Für gewöhnlich exprimieren es die Endothelzellen nur in geringem Maße. Im Verlauf der physiologischen als auch pathologischen Angiogenese [Colombo 2010] findet jedoch eine verstärkte Expression dieser statt [Sepp 1994]. Die integrinvermittelte Adhäsion führt zu intrazellulären Signaltransduktionen, die so u.a. die Proliferation und Migration regulieren [Aplin 1998]. $\alpha_v\beta_3$ bindet beispielsweise an die Tripeptidsequenz RGD extrazellulärer Liganden wie Vitronectin, Fibronectin [Akiyama 1996], Osteopontin und dem Von-Willebrand-Faktor [Clyman 1992; Shattil 1995] und ist demnach an vielen biologischen Prozessen wie Adhäsion von Osteoklasten an die Knochenmatrix sowie Migration von glatten Muskelzellen und Endothelzellen beteiligt. Am Beispiel der Endothelzellen führt die Bindung des Endothelzell- $\alpha_v\beta_3$ -Integrins an die RGD-Sequenz zur Bildung von Integrinclustern [Miyamoto 1995]. Hierdurch wird eine intrazelluläre Signalkaskade angeregt, die für die Proliferation der Endothelzellen sowie deren Migration in Richtung des angiogenen Stimulus zuständig ist. Zusätzlich wird die Apoptose verhindert [Strömblad 1996], die automatisch eintreten würde, wenn der Kontakt zur spezifischen Matrix unterbunden wäre. Die Spezifität und Affinität der RGD-Integrin-Wechselwirkung wird durch die unterschiedliche Kombination der α - und β -Einheiten der einzelnen Integrine, durch Variation der RGD-Konformation in verschiedenen Proteinen sowie durch Wechselwirkungen der Integrine mit Sequenzen in der Nähe der RGD-Bindungsstelle gewährleistet [Ruoslahti 1987].

Viele Zelltypen wie z.B. Epithelzellen, Osteoklasten und auch Endothelzellen exprimieren neben $\alpha_v\beta_3$ - auch $\alpha_v\beta_5$ -Integrine [Samanen 1997]. Gemäß Friedlander et al. lassen sich dabei auf angiogenetischen Endothelzellen besonders hohe Level von $\alpha_v\beta_3$ - und $\alpha_v\beta_5$ -Integrinen finden [Friedlander 1995]. Das RGD-Peptid wird von beiden Integrinen erkannt [Hynes 2002].

Auch eine Antagonisierung des $\alpha_v\beta_5$ -Integrins bewirkte in Studien eine Hemmung der Wachstumsfaktoren (VEGF) sowie der tumorinduzierten Angiogenese [Kumar 2001], so dass neben $\alpha_v\beta_3$ auch das Integrin $\alpha_v\beta_5$ eine wichtige Rolle in der Angiogenese zu spielen scheint.

Zur Aufrechterhaltung der funktionalen Struktur des intakten Knochens als auch bei Reparaturvorgängen nach Verletzungen hat die Interaktion von Zellen mit extrazellulären Matrixproteinen via Integrin-RGD-Bindung auch im Knochen große Bedeutung [Danen 2005]. Abgesehen von $\alpha_v\beta_3$ ist ebenso $\alpha_v\beta_5$ an der Knochenfunktion und RGD-Sequenzbindung beteiligt. Beide Varianten binden spezifisch an die multifunktionalen ECM-Proteine Vitronektin und Fibronektin, die eine maßgebliche Funktion im Knochenstoffwechsel besitzen, wodurch das für die Versuche vorgesehene RGD-Peptid spezifisch für die Bindung an diese beiden Integrine ist [Schaffner 2003]. Knochenzellen und Endothelzellen binden an diese Proteine in der Knochenmatrix und könnten somit für die Gefäßneubildung nach Verletzung von großer Bedeutung sein. Somit könnte eine vermehrte Stimulierung der $\alpha_v\beta_3$ - und $\alpha_v\beta_5$ -Integrine die Angiogenese und damit auch den Transport von Nährstoffen in ossären Substanzdefekten fördern und so die Einheilung beschleunigen.

Pierschbacher und Ruoslahti wiesen nach, dass analog zu ECM-Proteinen immobilisierte RGD-Peptide integrinvermittelte Zelladhäsion induzieren, während die löslichen RGD-Peptide in antagonistischer Weise dazu adhären Zellen ablösen [Pierschbacher 1984]. Bei Zellen, die durch RGD-Peptid-Sequenzen zur Zelladhäsion stimuliert werden, bleibt auch die Fähigkeit zur Proliferation erhalten [Kantlehner 2000].

Da, wie bereits beschrieben, auch Endothelzellen an die Peptidsequenz RGD binden, soll nun analog zu den Osteoblastenversuchen auch die Adhäsion und Proliferation von Endothelzellen auf Knochenkuben anhand von *In-vitro*-Experimenten erforscht werden.

Es wäre demnach zu erwarten, dass durch die Knochenbeschichtung mit RGD-Peptiden die Osteoinduktivität gesteigert und die Gewebeintegration beschleunigt

werden kann, da *in vivo* die Knochenfunktion maßgeblich von der Angiogenese und den Blutgefäßen abhängig ist [Schaffner 2003].

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es also, durch Beschichtung mit den sogenannten RGD-Peptiden, die meist verzögerte Einheilung sterilisierter Knochentransplantate zu verbessern. Es stellen sich dabei konkret folgende Fragen:

- Ist die Knochenmatrix aufgrund des teilweise noch vorhandenen Fettes ausreichend zugänglich für die Bindung der RGD-Peptide?
- Hat die zusätzliche Reinigung durch Ultraschall oder Aceton einen positiven Effekt auf die Beschichtungseffizienz?
- Welche Peptidkonzentrationen sind ausreichend bzw. optimal?
- Können Aussagen hinsichtlich der Stabilität getroffen werden?
- Hat die RGD-Beschichtung sterilisierter Knochenoberflächen einen positiven Einfluss auf die Adhäsion und Proliferation von Endothelzellen?

2. Material und Methodik

2.1 Geräte und Material

2.1.1 Geräte

Im Folgenden werden sämtliche Geräte aufgeführt, die im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen verwendet worden sind.

- Ascent Software (Version 2.4.2 für Multiskan Ascent®, Art. 1507 550, Thermo Labsystems, Research Technologies, Helsinki, Finnland)
- Automatic Gamma Counter (WALLAC 1480, Wizard 3", PerkinElmer Inc., Boston, USA)
- Bildprogramm (AxioVision Vs40, V.4.7.1.0, Carl Zeiss Imaging Solutions GmbH, Jena, Deutschland)
- Brutschrank (Hera Cell 150 Thermo scientific, Heraeus, Hanau, Deutschland)
- Brutschrank (Hera Cell, Heraeus, Hanau, Deutschland)
- Chromatographiesäule mit Stativ (Typ Y675.1, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland)
- Computer (Intel® Core™ 2 Duo CPU, 2 GHz, Betriebssystem Microsoft® Windows Vista™, Software: Microsoft® Office Word 2007)
- Dampfsterilisator (VARIOKLAV Typ 250 T, H+P, Oberschleißheim, Deutschland)
- Eismaschine (Ziegra Eismaschinen GmbH, Isernhagen, Deutschland)
- Exsikkator (Glaswerk Wertheim, Wertheim, Deutschland)
- Feinwaage (Typ SBC32, Scaltec Instruments, Heiligenstadt, Deutschland)
- Gefrierschrank (Typ 6483, GFL®, Burgwedel, Deutschland)
- Handsäge mit Sägeblättern, handelsüblich (autoklaviert)
- Hartschnittmikrotom (Polycut E, Reichert-Jung, Heidelberg, Deutschland)
- Kompressor (Typ BEK 63 bx-4, ABN Apparatebau Nittenau GmbH, Nittenau, Deutschland)
- Kühlschrank (Premium frost-free, Liebherr, Ochsenhausen, Deutschland)

- Magnetrührer (Ikamag® RCT basic, IKA® Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland)
- Marburger Knochenbank-System (Lobator sd-2, Telos, Marburg, Deutschland)
- Mikroskop (Axiovert 25, Carl Zeiss, Jena, Deutschland)
- Mikroskop (Wilovert S, Hund, Wetzlar, Deutschland)
- Mikroskopkamera (AxioCam MRc, Carl Zeiss, Jena, Deutschland)
- Mikrowelle (Micromat Duo 22M, Typ GK21EU CR/B, AEG Electric Tools GmbH, Winnenden, Deutschland)
- Neubauer-Zählkammer (Superior, Marienfeld, Deutschland)
- pH-Elektrode (Typ SenTix 41, WTW Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH, Weilheim, Deutschland)
- Photometer (Multiskan Ascent® Version 1.3.1, Art. 1507 540, Thermo Labsystems, Research Technologies, Helsinki, Finnland)
- Pipettierhilfe (easypet®, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland)
- Schüttler (Typ MS2 minishaker, IKA® Works, Inc., Wilmington, North Carolina, USA)
- Sterile Werkbank (Hera safe Typ HS12, Heraeus, Hanau, Deutschland)
- Stickstofftank (Arpege 75, AIR LIQUIDE Medical GmbH, Düsseldorf, Deutschland)
- Taumel-Schüttler (Typ 4010, Köttermann, Hänigsen, Deutschland)
- Tiefkühlschrank (Premium, Liebherr, Ochsenhausen, Deutschland)
- Ultraschallbad (Typ TK52, PSI Service, Hemsbach, Deutschland)
- Wärmeplatte (Ikamag® RCT basic, IKA® Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland)
- Wasserbad (Typ SUB14, Grant Instruments Ltd., Cambridge, England)
- Zentrifuge (ROTIXA/A, Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland)

2.1.2 Verbrauchsmaterial

- Braune Glasfläschchen (neoLab, Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH, Heidelberg, Deutschland)
- Deckgläser (18x18 mm, Menzel GmbH & Co. KG, Braunschweig, Deutschland)
- Einfriergefäß (Cryo 1 C Freezing Container Nalgene™, Nalge Company, Rochester, NY, USA)
- Einmal-Mikroliterpipettenspitzen (2,5 µl, 10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl Biozym® Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland)
- Filterpapier (Whatman, Maidstone, England)
- Kryokonservierungsröhrchen (Nalgene® Cryoware™ cryogenic vials, Nalge Company, Rochester, NY, USA)
- Küvetten
- Malpinsel (Pelikan Haarpinsel Sorte 25/11, Pelikan Vertriebsgesellschaft mbH & Co. KG, Hannover, Deutschland)
- Mullbindensäckchen
- Objektträger (SuperFrost®Plus, Menzel GmbH & Co. KG, Braunschweig, Deutschland)
- Objektträger mit unterteilten Kulturkammern (Art.Nr. 354104, BD Falcon 4-well Culture slides, BD Europe, Erembodegem, Belgien)
- Objektträgerpresse (Heraeus-Kulzer GmbH, Hanau, Deutschland)
- Pipetten (Eppendorf reference, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland)
- Polyethylenfolien (Heraeus-Kulzer GmbH, Hanau, Deutschland)
- Reaktionsgefäße (0,6 ml, 1,6 ml Biozym® Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland)
- SlideFlask (Art.Nr. 170920, Nunc™, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA)
- Sterile Einmal-Glaspipetten (2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml Falcon® serological pipets, Becton Dickinson Labware Company, Franklin Lakes, NJ, USA)
- Sterile Einmal-Mikroliterpipettenspitzen (10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl safeseal tips premium, Biozym® Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland)

- Sterile Röhrrchen (15 ml Falcon® Blue Max™, Becton Dickinson Labware Company, Franklin Lakes, NJ, USA)
- Sterile Röhrrchen (50 ml, Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland)
- Zellkulturflaschen (BD Falcon 250 ml, Becton Dickinson Labware Company, Franklin Lakes, NJ, USA)
- Zellkulturplatten (96 well Falcon® Microtest™, Becton Dickinson Labware Company, Franklin Lakes, NJ, USA)
- Zellkulturplatten (48 well Falcon® Multiwell™, Becton Dickinson Labware Company, Franklin Lakes, NJ, USA)

2.1.3 Medien, Chemikalien und Reagenzien

- (2-Methoxyethyl)-acetat (Art.Nr. 8.06061.1000, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)
- 1-Propanol (Art.Nr. 1.00997.1000, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)
- Aceton (Art.Nr. 1.00014.1000, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)
- AEC+Substrate-Chromogen, ready to use (Art.Nr. K3469, Dako, Glostrup, Dänemark)
- Al₂O₃ (Aluminiumoxid, Art.Nr. 1076, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)
- Albumin from bovine serum (minimum 96% electrophoresis, Art.Nr. A2153, Sigma-Aldrich Inc., Taufkirchen, Deutschland)
- Antibody CD31, endothelial cell (monoclonal mouse anti-human, Art.Nr. M0823, Dako, Glostrup, Dänemark)
- Antibody diluent, background reducing (Dako cytation antibody diluent with background reducing components, Art.Nr. S3022, Dako, Glostrup, Dänemark)
- Aqua injectabile (Aqua Spüllösung, Delta Select GmbH, Dreieich, Deutschland)
- Biotinylated horse anti-mouse IgG antibody (H+L), (Art.Nr. BA-2000, Vector Laboratories Inc., Burlingame, Kalifornien, USA)
- Brij 35 Solution (Art.Nr. 430AG-6, Sigma-Aldrich Inc., Taufkirchen, Deutschland)
- ECGS (Endothelial cell growth supplement, Art.Nr. 356006, BD, Franklin Lakes, New Jersey, USA)

- EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure, Art.Nr. E 7889, Sigma-Aldrich Inc., Taufkirchen, Deutschland)
- Einfriermedium (mit 10% DMSO, Art.Nr. 11101-011, Gibco, Paisley, Schottland, Vereinigtes Königreich)
- Eisessig 100% (Art.Nr. 1.00063.1000, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)
- Ethanol 70% (Apotheke des Klinikums rechts der Isar der Technischen Universität München, München, Deutschland)
- Ethanol 80% (Apotheke des Klinikums rechts der Isar der Technischen Universität München, München, Deutschland)
- Ethanol 96% (Apotheke des Klinikums rechts der Isar der Technischen Universität München, München, Deutschland)
- Ethanol absolut 99,8% (Apotheke des Klinikums rechts der Isar der Technischen Universität München, München, Deutschland)
- Eukitt (Lot-No. A116, O. Kindler GmbH & Co., Freiburg, Deutschland)
- FBS Superior (fetales Kälberserum, Art.Nr. S 0615, Biochrom AG, Berlin, Deutschland)
- Heparin (Art.Nr. H3149-25 KU, Sigma-Aldrich Inc., Taufkirchen, Deutschland)
- HEPES-Buffer (Hydroxyethylpiperazin-Ethansulfonsäure-Puffer, Art.Nr. L 1613, Biochrom AG, Berlin, Deutschland)
- Hexoseamidasereagenz:
 - 4-Nitrophenyl-N-acetyl-beta-D-glucosaminide (Art.Nr. N 9376, Sigma-Aldrich Inc., Taufkirchen, Deutschland)
 - Triton X-100 (Art.Nr. T 9284, Sigma-Aldrich Inc., Taufkirchen, Deutschland)
 - Tri-Natriumcitrat-Dihydrat (Art.Nr. 12005, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)
 - Citronensäure wasserfrei (Art.Nr. 27488, Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz)
 - PBS
 - Aqua injectabile
- HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cells, Art.Nr. AA-1001, Clonetics®, Cambrex Bio Science, Walkersville, Maryland, USA)
- Kaiser's Glyceringelatine (Art.Nr. 1.09242.0100, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)

- KH_2PO_4 (Kaliumdihydrogenphosphat, Art.Nr. 3904.1, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland)
- L-Glutamine (Art.Nr. K 0283, Biochrom AG, Berlin, Deutschland)
- Lichtgrün SF gelblich (Art.Nr. 15941, Certistain®, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)
- Medium 199 EARLE (Art.Nr. F 0615, Biochrom AG, Berlin, Deutschland)
- MEM-Vitamine (100x) (Art.Nr. K 0373, Biochrom AG, Berlin, Deutschland)
- Methanol (Art.Nr. 4627.1, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland)
- Mouse IgG1 (ISO-Antikörper, negative control mouse, Art.Nr. X0931, Dako, Glostrup, Dänemark)
- Na_2CO_3 (Natriumcarbonat, Art.Nr. 1.06395.0500, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)
- Na_2HPO_4 (di-Natriumhydrogenphosphat, Art.Nr. 1.06586.0500, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)
- NaN_3 -Solution (Natriumazid, Art.Nr. 1.06688, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)
- NaOH (Natriumhydroxid, Art.Nr. S 5881, Sigma-Aldrich Inc., Taufkirchen, Deutschland)
- Orange G (C.I. 16230), (Art.Nr. 1.15925.0025, Certistain®, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)
- PBS-Dulbecco (x10), (Phosphate-Buffered Saline, Art. L-1835, Biochrom AG, Berlin, Deutschland)
- PFA (Paraformaldehyd, Art.Nr. 1040051000, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)
- Polymerisationssystem-Kit (Technovit 9100 NEU, Heraeus-Kulzer GmbH & Co. KG, Wehrheim, Deutschland)
- Ponceau Xylidine (Art.Nr. 81465, Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz)
- Primocin (Art.Nr. ant-pm-1, InvivoGen, San Diego, Kalifornien, USA)
- Proteinase K (Art.Nr. 19131, Qiagen, Düsseldorf, Deutschland)
- RGD-Peptid: cyclo(-RGDfK-)-Ahx3-K-(K-Phosphonopropionyl₂)₂, synthetisiert von Jörg Auernheimer (Institut für Organische Chemie der Technischen Universität München, München, Deutschland)
- Säurefuchsin (Art.Nr. 84600, Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz)

- Saures Hämalaun nach Mayer (Apotheke des Klinikums rechts der Isar der Technischen Universität München, München, Deutschland)
- Sucrose (Art.Nr. 9097, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland)
- Target Retrieval Solution, ready to use (Art.Nr. S1700, Dako, Glostrup, Dänemark)
- Toluidinblau O, Zinkchlorid Doppelsalz (Art.Nr. 15930, Certistain®, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)
- Trispuffer 99+%, 0,1 molar (Art. T-8524, Sigma, Deisenhofen, Deutschland)
- Trypanblau 0,5% (w/v), (Art.Nr. L 6323, Biochrom AG, Berlin, Deutschland)
- Trypsin/EDTA Solution (Art.Nr. L 2143, Biochrom AG, Berlin, Deutschland)
- Vectastain Elite ABC Kit (Standard), (Avidin/Peroxidase , Art.Nr. PK-6100, Vector Laboratories Inc., Burlingame, Kalifornien, USA)
- Wasserstoffperoxid 30% (Art.Nr. 1.07209.0250, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)
- Weigert'sche Lösung I (Apotheke des Klinikums rechts der Isar der Technischen Universität München, München, Deutschland)
- Weigert'sche Lösung II (Apotheke des Klinikums rechts der Isar der Technischen Universität München, München, Deutschland)
- Wolframato-phosphorsäure-Hydrat (Art.Nr. 1.00583.0250, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)
- Xylol Pharm. Helv. VI (Art.Nr. 7475522, Hedinger GmbH & Co. KG, Stuttgart, Deutschland)

2.2 Methodik

2.2.1 Knochenchips

2.2.1.1 Herkunft der Knochen

Die in den nachfolgend beschriebenen Versuchen verwendeten Knochensegmente stammen aus humaner Hüftkopfspongiosa, die im Rahmen von Hüfttotalendoprothesenimplantationen in der Orthopädischen Klinik im Hause (Direktor zu diesem Zeitpunkt: Univ.-Prof. Dr. R. Gradinger) angefallen sind und üblicherweise fachgerecht entsorgt werden würden.

Als Spender für die Hüftköpfe wurden unwillkürlich vier Frauen und vier Männer mit einem Gesamtdurchschnittsalter von 66 Jahren (39-80 Jahre) ausgewählt. Individuelle Unterschiede bzgl. des Geschlechts, des Alters oder der Komorbiditäten wurden bei der Versuchsdurchführung nicht berücksichtigt.

Alle Patientinnen und Patienten hatten bereits vor der Operation ihr Einverständnis zur Verwendung der Spongiosa für wissenschaftliche Zwecke gegeben. Die Verwendung des Knochenmaterials wurde von der hausinternen Ethikkommission genehmigt (Ethikvotum 1307/05).

2.2.1.2 Vorbereitung der Knochenkuben

Alle verwendeten Hüftköpfe wurden unmittelbar nach der operativen Entnahme steril verpackt und in das Zellkulturlabor verbracht. Dort wurden sie zunächst gemäß dem etablierten und allgemein anerkannten Marburger Knochenbank-System im Lobator sd-2 mit einer Prozesszeit von 94 Minuten sowie einer Mindesttemperatur in der Knochenmitte von 82,5°C thermisch desinfiziert, um Zellen und lösliche Faktoren abzuwaschen, eine Reduzierung des Fettgehaltes des Transplantates als auch eine Inaktivierung möglicher bakterieller und viraler Infektionserreger zu erreichen [Pruss 2003a, 2003b]. Diese Art der thermophysikalischen Desinfektion basiert auf der Konformitätsänderung von Proteinen [Pruss 2004, S. 28]. Nach Ablauf des standardisierten Desinfektionsprozesses wurden die Hüftköpfe unter weiterhin sterilen Bedingungen in der Sterilbank weiterverarbeitet. Unter Zuhilfenahme von sterilen Zangen und autoklavierten Handsägen wurde hierfür die für den Versuchsaufbau benötigte Spongiosa präpariert und in Kuben der Größe 5x5x5 mm zugeschnitten.

Um interindividuelle Unterschiede der Spongiosaeigenschaft zur aussagekräftigen Beurteilung der Knochenvorbehandlung gering zu halten, wurden alle Knochenfragmente für die drei unterschiedlichen Behandlungsmethoden randomisiert. Um ein optimales Verfahren zur Vorbehandlung besiedelter Knochenmatrix zu evaluieren, wurden bei den unterschiedlich vorbehandelten Knochen Beschichtungstests durchgeführt.

Die Nativgruppe der Knochenkuben wurde dabei wie alle anderen Gruppen der thermischen Desinfektion unterzogen. Anschließend erfolgten jedoch keine weiteren Reinigungsschritte mehr.

In der ultraschallgereinigten Gruppe wurden die Knochenstücke nach der thermischen Desinfektion in ein mit sterilem PBS befülltes Glasgefäß gegeben und zehn Minuten lang im Ultraschallbad bei 60 kHz gereinigt. Dieser Schritt wurde solange wiederholt, bis das bei jedem Reinigungsvorgang erneuerte PBS keine Fettauflagen oder andere Verunreinigungen mehr aufwies.

In der acetongereinigten Gruppe wurden die Knochenstücke nach der thermischen Desinfektion in ein mit Aceton befülltes Glasgefäß eingelegt und unter der Abzugshaube für 15 Minuten auf den Schüttler gelegt. Auch dieses Vorgehen wurde solange durchgeführt, bis die bei jeder Repetition erneuerte Acetonlösung klar war. Abschließend wurden die Spongiosawürfel für zwölf Stunden zum Ausdampfen unter der Abzugshaube belassen.

Nach erfolgter Vorbereitung wurden die Knochenstückchen aller Gruppen bis zur Verwendung bei -80°C unter sterilen Bedingungen tiefgefroren.

Bei Bedarf wurden die Knochenwürfel unter der Sterilbank aufgetaut, mit $500\ \mu\text{l}$ sterilem PBS gespült und vor Verwendung unter der Sterilbank luftgetrocknet.

2.2.2 Zellkultur

2.2.2.1 Herstellung der Kulturmedien

Dem verwendeten Kulturmedium 199 EARLE (500 ml) sind zur Optimierung der Wachstumsbedingungen 25 mM HEPES, 50 $\mu\text{g/ml}$ Heparin, 50 $\mu\text{g/ml}$ ECGS, 1% Glutamin, 1 ml PrimocinTM und 1% MEM-Vitamine zugesetzt worden.

Im Anschluss wurden 100 ml Medium serumfrei belassen und dem restlichen Medium entsprechend FCS (20%) hinzugefügt.

Dies war notwendig, da Serum eine beträchtliche Anzahl an RGD-enthaltenden extrazellulären Matrixproteinen Fibronectin und Vitronectin beinhaltet [Diehl 2005] und somit einzelne Schritte der Messung verfälschen könnte, weshalb dafür serumfreies Medium eingesetzt wurde.

2.2.2.2 Herstellung von Endothelzellkulturen

Zur Besiedelung der Knochensegmente wurden käuflich erworbene humane Nabelschnurendothelzellen venösen Ursprungs (HUVEC, Art.Nr. AA-1001, Clonetics®, Cambrex Bio Science, Walkersville, Maryland, USA) verwendet, die als Standard-Endothelzellen bereits sehr gut charakterisiert sind und schon in zahllosen anderen Forschungsprojekten zum Einsatz kamen.

Zum Anzüchten wurden diese bis zum Auswachsen eines dichten Zellrasens mit 15 ml Nährmedium in 75 cm² Zellkulturflaschen mit Gasaustauschermembran im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Ein Mediumwechsel fand alle drei Tage statt.

Bei ausreichender Zelldichte erfolgte die Passagierung. Hierfür wurde, nach Abpipettieren des Kulturmediums, der Zellrasen mit 4 ml auf 37°C angewärmten Trypsins 0,05% / EDTA 0,02% durch fünf- bis maximal zehnteiliges Inkubieren im Brutschrank von der Zellkulturflasche gelöst. Um einen Zelltod durch das Trypsin zu vermeiden, wurde dieses danach durch ebenfalls 4 ml serumhaltiges Zellkulturmedium inaktiviert und die Zellen gleichmäßig in zwei neuen Zellkulturflaschen ausgesät. Abschließend sind die Kulturflaschen wieder auf 15 ml mit dem Kulturmedium aufgefüllt und bis zum nächsten Mediumwechsel, bis zur nächsten Passage bei ausreichender Konfluenz oder bis zur Verwendung wie oben genannt im Brutschrank kultiviert worden. Durch dieses Vorgehen konnte eine Hemmung der Proliferation durch Kontaktinhibition und ein evtl. daraus resultierendes Absterben der Zellen unterbunden werden. Es ist bekannt, dass auf makroskopischer Ebene beispielsweise Endothelzellen zum Überleben eine zelladhäsive Oberfläche von mindestens 25 µm benötigen [Chen 1997].

Zur Gewährleistung der in den Versuchen verwendeten Menge an Endothelzellen musste diese vor Versuchsbeginn nach dem bereits oben beschriebenen Vorgang des Abtrypsinierens bestimmt werden, was unter Zuhilfenahme einer Neubauerkammer geschah. Hierfür wurde die Zellsuspension zunächst in ein steriles Falcon PVC-Röhrchen überführt und fünf Minuten lang bei 250 x g abzentrifugiert. Der

Überstand wurde vorsichtig abpipettiert und das Zellsediment mit 1 ml frischem Medium ohne fetales Kälberserum aber mit 1% Serumalbumin (BSA) resuspendiert. Ein Verklumpen der Endothelzellen, welches das Auszählen behindert hätte, wurde durch mehrfaches Pipettieren verhindert. Schließlich wurden 10 µl dieser Zellsuspension mit 40 µl Medium und 50 µl Trypanblau in einem Eppendorfgefäß vermischt und die darin enthaltene Anzahl der vitalen Zellen in den vier großen Quadraten der Neubauerkammer bestimmt. Durch Bildung des Mittelwertes aus den ausgezählten Kammern und Multiplikation mit 10^5 ließ sich die Zellzahl/ml ermitteln. Die Gesamtzellzahl ergab sich durch Multiplikation der Zellzahl/ml mit dem Gesamtvolumen der Suspension in ml.

Um ein zu häufiges Passagieren und den daraus folgenden Verlust der spezifischen Eigenschaften der Endothelzellen zu vermeiden, sind diese bis zu einer Passage von maximal sieben durch wiederholte Subkultivierung angereichert worden. Jede Zellpopulation besitzt ihr eigenes Proliferationsvermögen, das durch die verschiedenen Passagen verändert werden kann.

Nach Erhalt einer ausreichenden Zellzahl wurden diese bis zur Weiterverarbeitung kryokonserviert.

2.2.2.3 Kryokonservierung und Auftauen von Endothelzellen

Die Kryokonservierung erfolgte nach der von Lindl beschriebenen Methode [Lindl 2002, S. 115ff.].

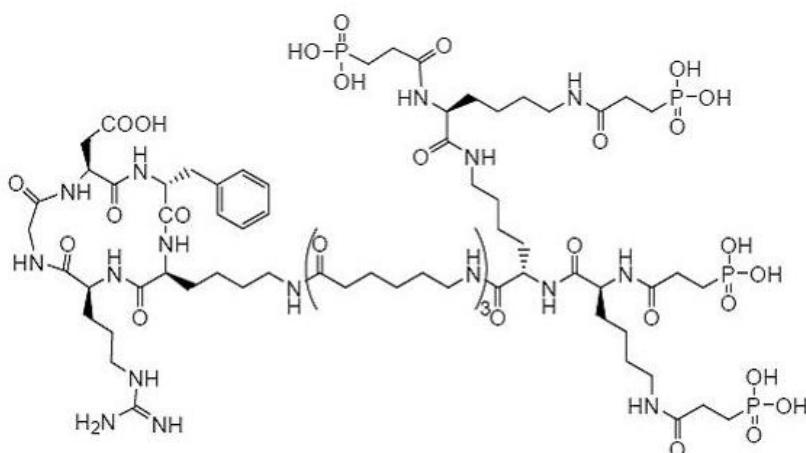
Hierfür wurden die Zellen wie bereits oben erläutert abtrypsiniert und ausgezählt. Anschließend wurden sie fünf Minuten lang bei $250 \times g$ zentrifugiert und nach behutsamem Abpipettieren des Zellmediums das Zellpellet sowie das Einfriermedium auf Eis gestellt. Nach ausreichender Abkühlung beider wurden die Zellen in geeigneter Dichte von 5×10^6 /ml mit dem Einfriermedium resuspendiert und davon jeweils 1 ml der Suspension in ein Kryoröhrchen gefüllt. Die einzelnen Röhrchen wurden unverzüglich in die mit 1-Propanol gefüllte Einfrierbox und diese dann bei einer Temperatur von -80°C in den Gefrierschrank gestellt. Der Vorgang musste binnen fünf Minuten nach Zugabe des Einfriermediums beendet sein, um die Zellen zu schonen. Nach etwa 24 Stunden konnten die gefrorenen Röhrchen schließlich dauerhaft in flüssigen Stickstoff überführt werden, wo sie bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt wurden.

Bei Bedarf wurden die Zellen in einem 37°C warmen Wasserbad angewärmt, der nahezu vollständig aufgetaute Röhrcheninhalt in 15 ml angewärmtes Kulturmedium überführt und zuletzt auf Kulturflaschen ausgesät, um die Zellen vor Versuchsbeginn nochmals zu passagieren.

2.2.3 Design des RGD-Peptids

Das in den Versuchen angewendete Pentapeptid cyclo(-RGDfK)-Ahx3-K-(K-Phosphonopropionyl)₂, das auch bereits die Osteoblastenadhäsion auf Hydroxylapatit und Titan stimulieren konnte [Auernheimer 2005], wurde am Lehrstuhl für organische Chemie in Garching von Jörg Auernheimer synthetisiert und gebrauchsfertig überreicht. Zur Synthetisierung wird daher auf die Beschreibung von Auernheimer und Kessler verwiesen [Auernheimer 2006]. Eine Strukturformel der Aminosäuresequenz ist in Abb. 4 dargestellt. Cyclo(-RGDfK-) steht dabei für das zyklische Pentapeptid Arg-Gly-Asp-d-Phe-Lys (Arginin-Glycin-Asparaginsäure-d-Phenylalanin-Lysin) [Marchi-Artzner 2001]. Dirk Finsinger konnte zeigen, dass das Peptid cyclo(-RGDfK-) über die ε-Aminogruppe des Lysins an Position 5 unter Erhalt der biologischen Aktivität mit verschiedenen weiteren funktionalen Molekülen, wie z.B. auch Ankergruppen zur Immobilisierung auf Oberflächen, verknüpft werden kann [Finsinger 1997], so dass dieses Peptid für die Experimente geeignet erschien.

Abbildung 4: Strukturformel von cyclo(-RGDfK)-Ahx-Ahx-Ahx-K-(K-PPA₂)₂

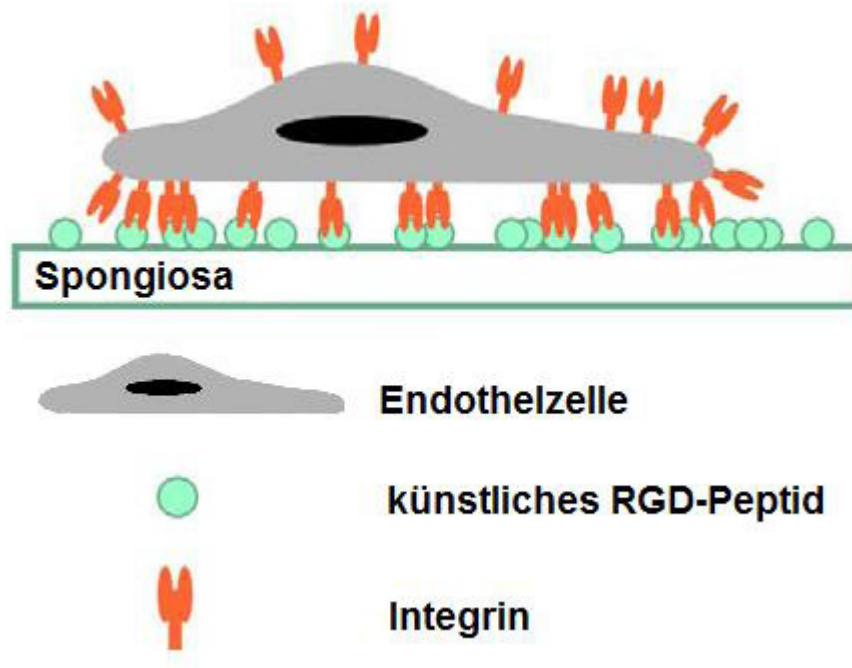


Bei dem in den Versuchen angewendeten RGD-Peptid handelt es sich um eine zyklische Version, da diese nicht durch Proteasen abgebaut werden kann und somit eine höhere Stabilität aufweist [Verrier 2002; Hersel 2003]. Zur Gewährleistung einer

stabilen ionischen Bindung an die anorganische Knochenmatrix besitzt das zyklische RGD-Peptid vier Phosphonatgruppen, weil diese u.a. an das Apatit binden [Auernheimer 2005].

Die Funktionsweise ist vereinfacht in Abb. 5 dargestellt.

Abbildung 5: Stimulierung der Zelladhäsion durch RGD-Peptide



2.2.4 Versuchsaufbau

2.2.4.1 Adhäsion radioaktiv markierter RGD-Peptide

Bevor mit den eigentlichen Zellversuchen begonnen wurde, galt es die optimale Bindungseffizienz des zyklischen RGD-Peptides an die Knochenmatrix zu determinieren, um später eine maximale Besiedelungsrate zu erreichen. Dafür wurde mittels radioaktiver Markierung die quantitative Bindung der Peptide analysiert.

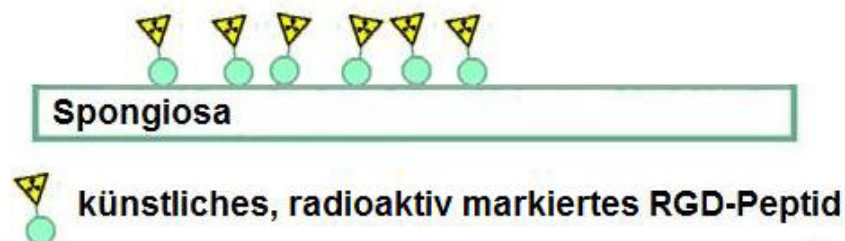
Damit auch Aussagen hinsichtlich der Stabilität getroffen werden können, sollte die gebundene Radioaktivität auch nach Inkubation des Knochens für eine Woche bei 37°C überprüft werden. Beim radioaktiv markierten RGD-Peptid wurde das gleiche Peptid wie bei den regulären Versuchen verwendet [Auernheimer 2006], mit dem Unterschied, dass das Phenylalanin durch Tyrosin ersetzt und dann mit Jod 125

jodiert wurde. Dieses wurde ebenfalls von Jörg Auernheimer synthetisiert und gebrauchsfertig überreicht.

Die drei verschieden vorbereiteten Knochen, die wie bereits beschrieben mit Ultraschall bzw. Aceton gereinigt oder nach der Lobator-Sterilisation nativ belassen worden waren, wurden in 48er Wellplatten gegeben, mit je 20 μl der jeweiligen RGD-Konzentration beimpft und dann über Nacht bei 8°C im Kühlschrank eingelagert. Es folgten Versuche mit RGD-Konzentrationen von 1 μmol , 10 μmol und 72 μmol . Zur Herstellung dieser wurde 1molarer Trispuffer mit dem jodierten RGD-Peptid entsprechend der gewünschten Konzentration vermischt. Am nächsten Tag erfolgte dann die Adhäsionsmessung. Dafür wurden die beschichteten Knochenstücke zunächst einzeln gewogen und danach zweimal für zehn Minuten mit 400 μl PBS-Pufferlösung gereinigt, um nichtgebundenes Peptid vom Knochen abzuwaschen. Im dritten und letzten Schritt sind die Knochen nicht mit PBS, sondern mit Zellmedium mit 1% BSA aber ohne Kälberserum auf gleiche Weise gereinigt und schließlich, nach der Messung im Gamma Counter, in neue Wells eingebettet worden. Das Wiegen der Knochen war notwendig, um zur Vergleichbarkeit die anhaftenden RGD-Peptide pro Gramm Knochen berechnen zu können. Nach der Messung wurden die Knochen für die 7-Tage-Testung mit 400 μl Standardmedium mit FCS bei 37°C inkubiert und das Medium einmal gewechselt.

Abb. 6 illustriert die an der Spongiosa angedockten, radioaktiv markierten RGD-Peptide, deren Radioaktivität bei der Auswertung mittels Gamma Counter gemessen wurde.

Abbildung 6: Radioaktiv markiertes RGD



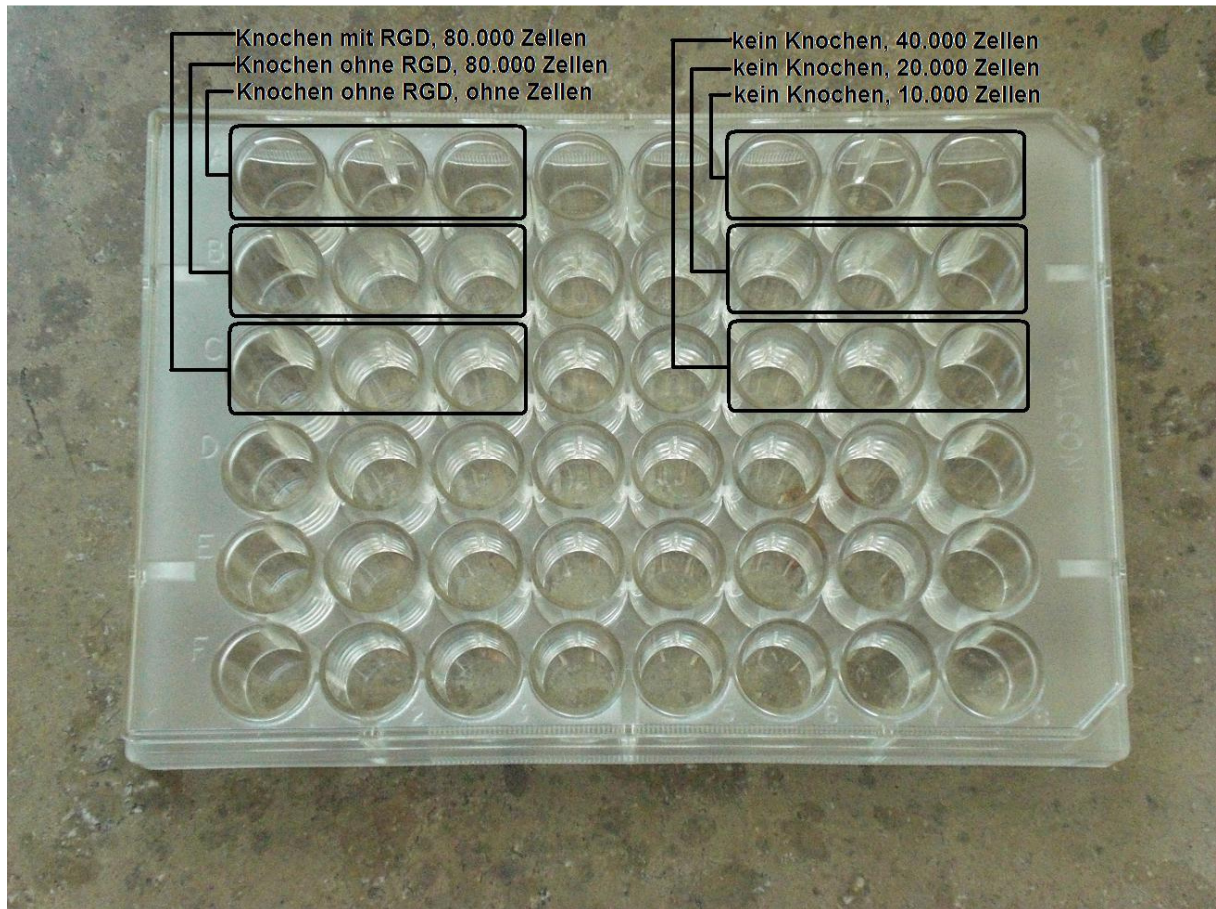
2.2.4.2 Adhäsion und Proliferation von Endothelzellen

Da sowohl die Zellbindung als auch die Proliferationsrate der Endothelzellen auf Knochen getestet werden sollte, wurde zur Festlegung gleicher Standardbe-

dingungen bei der Versuchsplanung für die Adhäsion eine Inkubationszeit von einem Tag, für die Proliferation eine Inkubationszeit von sechs Tagen festgelegt.

Wie in der nachfolgenden Abb. 7 gezeigt, wurden im Versuchsaufbau für die Adhäsion und Proliferation jeweils neun Knochenkuben der gleichen Vorbehandlung in 48er Wellplatten überführt. Drei Knochenstücke davon galten als Leerwert und wurden weder mit Endothelzellen noch mit RGD-Peptid beschichtet. Weitere drei Kuben wurden lediglich mit Endothelzellen, jedoch nicht mit RGD beschichtet, um eine Vergleichsgruppe zur letzten Gruppe zu haben, bei denen drei Knochen mit RGD-Peptiden und Endothelzellen beimpft wurden. Dafür wurden jeweils 20 µl des bereits oben erwähnten und nicht mehr radioaktiv markierten RGD-Peptids mit einer Konzentration von 100 µM verwendet und die freie Knochenoberfläche im Well damit beschichtet. Danach wurde die Wellplatte über Nacht im Kühlschrank bei 8°C aufbewahrt. Am Folgetag fand eine Reinigung der Knochenwürfel statt, um nicht-gebundenes Peptid abzuwaschen. Obwohl nur drei der neun Knochenwürfel beschichtet waren, sind alle gereinigt worden, um zur Vergleichbarkeit ein standardisiertes Vorgehen zu wahren. Hierfür wurde je 400 µl steriles PBS in die einzelnen Wells pipettiert. Nach zehn Minuten konnte das PBS abpipettiert werden und eine Wiederholung des Vorgangs erfolgen. Im dritten Reinigungsschritt wurde das PBS durch Medium EARLE 199 mit 1% BSA ohne fetales Kälberserum ersetzt und nach zehn Minuten entfernt. In einem nächsten Schritt wurden nun die gewonnenen Endothelzellen (siehe „Herstellung von Endothelzellkulturen“) mit einer Zellzahl von jeweils 80.000 auf drei Knochen ohne RGD sowie auf die drei peptidbeschichteten Knochen aufgetragen. Zusätzlich sind als Kontrollansatz jeweils drei Wells ohne Knochen mit 10.000, 20.000 und 40.000 Endothelzellen beimpft worden (Abb. 7).

Abbildung 7: Versuchsaufbau Adhäsion/ Proliferation



Nach erfolgter Endothelzellzugabe lagerten die Wells für 30 Min. bei 37°C im Brutschrank, bevor in jedes der belegten bzw. beimpften Wells 400 µl kälberserumfreies Medium EARLE 199 mit 1% BSA gegeben und die Platten für weitere zwei Stunden im Brutschrank inkubiert wurden. Das Medium wurde im Anschluss vorsichtig abpipettiert und die Knochenstücke in neue Wells umgelagert, um später bei der Auswertung nur die am Knochen adhärenierten Zellen zu messen. Darauf sind alle belegten Wells mit 400 µl kälberserumenthaltendem Standardmedium EARLE 199 aufgefüllt und im Brutschrank eingelagert worden. Bereits am nächsten Morgen erfolgte der Adhäsionsnachweis und nach sechs Tagen der Proliferationsnachweis mittels Hexosaminidase-Assay. Bei den Proliferationsversuchen wurde während der Inkubationsphase das Standardmedium regelmäßig durch frisches ersetzt, um den Zellen ausreichend Nährmedium zu bieten und einen Zelltod zu vermeiden. Ansonsten ist bezüglich des Versuchsaufbaus bei den Proliferationsversuchen entsprechend den Adhäsionsversuchen verfahren worden.

2.2.4.3 Messung der Endothelzelladhäsion und -proliferation mittels Hexosaminidase-Assay

Um die auf den Knochen adhärierenden und proliferierenden Endothelzellen quantifizieren zu können, wurde ein colorimetrischer Hexosaminidase-Assay angewendet, bei dem ein Substrat durch ein lysosomales Enzym der Zellen umgesetzt wird. Dieses Testprinzip beruht auf einer direkten Proportionalität der Farbentwicklung des Substrates zur Zellmenge [Landegren 1984].

- Herstellung der Hexosaminidasereagenz:
 - 100 mM Natrium-Citrat-Puffer, pH 5,0
 - 0,5% Triton-X 100
 - 15 mM p-Nitrophenol-N-acetyl-beta-D-glucosaminide
 - PBS im Verhältnis 1:1
 - Zitronensäure (zur pH-Einstellung)

Es wurden 5,88 g Natriumzitat, 1 g p-Nitrophenol-N-acetyl-beta-D-glucosaminid sowie 1 ml Triton 0,5% vermischt, mit Aqua dest. auf 200 ml aufgefüllt und zuletzt im Volumenanteil 1:1 mit PBS vermengt, bevor der pH mit reiner Zitronensäure auf 5,0 eingestellt wurde. Die Lagerung fand bei -20°C statt. Bei Verwendung erfolgte das Auftauen im Wasserbad.

- Herstellung Stopp-Puffer:
 - 0,2 M NaOH
 - 5 mM EDTA

Für die Lösung wurden 8 ml NaOH mit 2 ml EDTA vermengt und 190 ml Aqua dest. zugegeben.

Zur Messung der nach Landegren beschriebenen Methode [Landegren 1984] wurde sowohl bei der Adhäsions- als auch bei der Proliferationstestung zunächst das Nährmedium in den Wells der inkubierten Knochenwürfel abpipettiert und die Knochen zweimal mit 500 µl PBS gespült, um diese nochmals von nicht anhaftenden Zellen sowie vom Medium zu reinigen. Im nächsten Schritt wurden die Kuben in neue Wells der 48-Well-Zellkulturplatten überführt, damit im Hexosaminidase-Test nur die

auf den Knochen haftenden Zellen bestimmt werden. Dann wurden 350 µl Substrat in jedes benutzte Well pipettiert, so dass die Knochenkuben vollständig im Substrat eingelegt waren. Nun erfolgte eine 90-minütige Inkubation bei 37°C im Brutschrank, wobei das enthaltene Triton zur Lyse der Endothelzellen führt und so das lysosomale Enzym Hexosaminidase, welches das Substrat umsetzt, freigesetzt wird. Nach erfolgter Inkubation wurde durch Zugabe von 350 µl Stopp-Puffer eine Gelbfärbung des Substrates und somit der gesamten Lösung bewirkt, was auf einer Veränderung des pH-Wertes beruht. Von den jeweiligen Wells wurden nun je 100 µl der gelben Lösung in 96er-Well-Zellkulturplatten überführt und die Gelbfärbung sodann bei einer Extinktion von 405 nm photometrisch bestimmt. Die Intensität der Gelbfärbung entspricht der Zellzahl. Diese modifizierte Methode basiert auf der Publikation von Shibata [Shibata 1996]. Aus den jeweiligen drei Messwerten einer Gruppe wurde der Mittelwert gebildet und der zugehörige Leerwert abgezogen. Als Blankwert der Kontrollen, bei denen die Zellen auf dem Plastikboden der Wells ausgesät wurden, zählte ein leeres Well ohne Zellen, das ebenso mit Start- und Stopppuffer befüllt wurde.

2.2.5 Färbungen

Um die Endothelzellen zu visualisieren sind verschiedene Färbungen durchgeführt worden. Bevor jedoch mit den Präparatfärbungen zur Darstellung der Endothelzellen begonnen werden konnte, war eine Aufarbeitung der Knochenstücke notwendig.

2.2.5.1 PMMA-Einbettung

Hierfür bedurfte es zunächst einer Einbettung in PMMA, die anhand vieler Einzelschritte wie nachstehend durchgeführt wurde.

2.2.5.1.1 Fixation der Knochenpräparate

Wie bei den Proliferationsversuchen wurden die inkubierten Knochenwürfel am sechsten Tag zweimal mit 500 µl PBS bei Raumtemperatur gespült, um die Kuben vom Kulturmedium sowie von nicht anhaftenden Zellen zu befreien. Daraufhin wurden die Knochenkuben mit einem entsprechend der Knochenprobe genau beschrifteten Zettel in Mullbindensäcken umgelagert und mit einem Faden verschnürt, um so eine spätere Identifizierung der einzelnen Proben zu ermöglichen.

Nun wurden die Säckchen in einen Glasbehälter mit Deckel überführt, der mit bei Raumtemperatur angewärmter 1,4%iger Paraformaldehyd-Lösung befüllt war. Nach dem zusätzlichen Fixieren des Deckels mit Parafilm wurde der Behälter über Nacht bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt.

Die 1,4%ige Paraformaldehydlösung enthielt:

- 35 ml 8%ige Paraformaldehyd-Stammlösung
- 65 ml Aqua dest.
- 100 ml 0,04 M Phosphatpuffer + 10% Sucrose

Der pH-Wert wurde auf 7,4 eingestellt.

Die aufgeführten Bestandteile setzten sich dabei folgendermaßen zusammen:

- 8%ige Paraformaldehyd-Stammlösung:
 - o 40 g Paraformaldehyd
 - o 500 ml Aqua dest.

Das Paraformaldehyd wurde im Aqua dest. gelöst, angewärmt, auf den neutralen Punkt eingestellt und bis zur Verwendung bei -20°C eingefroren.

- 0,04 M Phosphatpuffer + 10% Sucrose (pH 7,4):
 - o 40 ml 1 M Phosphatstammlösung
 - o 100 g Sucrose
 - o 10ml 10% NaN₃-Lösung
 - o 1000 ml Aqua dest.

Der pH-Wert wurde auf 7,4 eingestellt.

- 1 M Phosphatpuffer-Stammlösung:
 - o 112,5 g Na₂HPO₄
 - o 30 g KH₂PO₄
 - o 1000 ml Aqua dest.

Am darauffolgenden Tag wurde die Fixation durch eine 30-minütige Reinigung der Knochensäckchen unter kühlem, fließendem Wasser beendet.

2.2.5.1.2 Dehydrierung

Als nächstes wurden die weiterhin in den Säckchen befindlichen Knochenkuben mittels aufsteigender Alkoholreihe und abschließend mit Xylol anhand folgender Tabelle in einer Küvette entwässert.

Konzentration	Dauer	Erläuterung
Ethanol 70%	½ Tag	Nach 30 Min. erneut durch frisches Ethanol 70% substituiert
Ethanol 80%	1 Nacht	- Noch am ersten Tag abends Ethanol 70% durch 80%iges Ethanol ersetzt - Dieses nach 30 Min. nochmals durch frisches Ethanol 80% ersetzt
Ethanol 96%	1 Tag	- Am Folgetag 80%iges Ethanol durch 96%iges Ethanol ausgetauscht - Nach 30 Min. nochmalige Erneuerung
Ethanol 100%	2 Tage	- Einen Tag später 96%iges Ethanol durch Ethanol 100% ausgewechselt - Nach 30 Min. Erneuerung Ethanol 100% - Am zweiten Tag Auffrischung Ethanol 100%
1:1-Gemisch Ethanol100%/Xylol	1 Stunde	100%iges Ethanol wird verworfen und für 60 Min. durch Ethanol/Xylol-Gemisch substituiert
Xylol	½ Tag	- Zuletzt reines Xylol - Nach 30 Min. mit frischem Xylol ersetzt

Tabelle 2: Dehydrationschema

Während der Alkoholreihe wurden die Gefäße bei 4°C im Kühlschrank gelagert. Die Dehydrierung mit Xylol erfolgte unter dem Abzug bei ständiger Durchmischung mit einem Magnetrührer.

2.2.5.1.3 Entstabilisierung der Basislösung

Nach Beendigung der Dehydrierung wurden die Knochenkuben in Technovit® 9100 Neu eingebettet, dessen Systemkomponenten in Tab. 3 aufgeführt sind. Hierfür mussten die Gebrauchslösungen zunächst hergestellt und die Technovit® 9100 Basislösung entstabilisiert werden. Dazu wurde eine Chromatographiesäule mit 50 g Al₂O₃ befüllt und die Technovit® 9100 Basislösung langsam hindurchgefiltert. Die nun entstabilisierte Lösung wurde in dunklen Flaschen abgepackt und konnte bei Nichtgebrauch für eine maximale Dauer von vier Wochen bei 4°C im Kühlschrank eingelagert werden.

Bezeichnung	Menge
Basislösung, stabilisiert	1 000 ml
PMMA-Pulver	120 g
Härter 1	8 Beutel à 1 g
Härter 2	10 ml
Polymerisations-Regler	5 ml
PMMA-Granulat	500 g

Tabelle 3: Systemkomponenten Technovit 9100 Neu

2.2.5.1.4 Infiltration und Polymerisation

Die Herstellung der Gebrauchslösungen aus den Technovit 9100 Neu-Komponenten erfolgte gemäß Tab. 4.

	Basislösung [ml]	PMMA-Pulver [g]	Härter 1 [g]	Härter 2 [ml]	Polymerisationsregler [ml]	Erläuterung
Präinfiltrationslösung 1	100					+ 100 ml Xylol (1:1 Gemisch) Lagerung: Raumtemperatur
Präinfiltrationslösung 2	200		1			Lagerung: Raumtemperatur
Präinfiltrationslösung 3	200		1			Lagerung: Raumtemperatur
Infiltrationslösung	250	20	2			Lagerung: 4°C
Stammlösung A	250	40	2			Lagerung: 4°C
Stammlösung B	25			2	1	Lagerung: 4°C
Polymerisationsgemisch						9 Anteile Stammlösung A + 1 Anteil Stammlösung B

Tabelle 4: Herstellung der Gebrauchslösungen

Bis zur Verarbeitung bzw. zum Austausch der Lösungen wurden die eingelegten Knochenstücke während des gesamten Vorgehens bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt. Alle Entgasungen mittels Exsikkator fanden bei 800 bar statt. Die basislösungenthaltenden Gebrauchslösungen wurden in braunen Flaschen bei 4°C gelagert.

Zuerst wurde das reine Xylol aus der Dehydrationsreihe durch die Präinfiltrationslösung 1 ersetzt. Am darauffolgenden Morgen wurde diese mit der Präinfiltrationslösung 2 substituiert und am Abend nochmals durch die Präinfiltrationslösung

3 erneuert. Am nächsten Tag wurde die Präinfiltrationslösung 3 verworfen und stattdessen mit der Infiltrationslösung aufgefüllt. Bei der Herstellung der Infiltrationslösung war darauf zu achten, dass vor der Zugabe des Härter das PMMA-Pulver vollständig gelöst war, um eine Klumpenbildung zu vermeiden. Daher musste das Pulver zunächst in 220 ml Basislösung mittels Magnetrührer bei 4°C gelöst, anschließend der Härter dazugegeben und mit der Basislösung auf ein Volumen von 250 ml aufgefüllt werden. Als nächstes erfolgte die Entgasung der Lösung im Exsikkator. Nach Auffüllen des mit den Knochenchips bestückten Gefäßes mit der Infiltrationslösung wurde zusätzlich dreimal im Exsikkator entgast. Einen Tag später ist die Infiltrationslösung durch frische ersetzt und wieder dreimal entgast worden.

Am Folgetag fand als letzter Schritt die Herstellung des Polymerisationsgemisches statt, das zu neun Volumenanteilen aus der Stammlösung A und zu einem Volumenanteil aus der Stammlösung B bestand und nach dem Ansetzen sofort verbraucht werden sollte. Vor der Verwendung erfolgte ebenfalls die Entgasung im Exsikkator. Bei der Herstellung der Stammlösung A ist analog zur Herstellung der Infiltrationslösung verfahren worden. Zur Zubereitung der Stammlösung B musste, um zuviel Flüssigkeitsverdrängung zu vermeiden, auf einen Magnetrührer verzichtet und stattdessen die benötigten Reagenzien mit einem Glasstab vermischt werden.

Mit Fertigstellung des Polymerisationsgemisches wurden die Knochenproben aus den Mullbindensäcken entnommen und in 15 ml Glasfläschchen überführt. Da das Gewebe beim Ausgießen nicht unmittelbar auf dem Glasboden liegen sollte, sind diese vorher noch mit kleinen Blöcken aus auspolymerisierten Resten bestückt (Abb. 8) und darauf dann die Knochenkuben gelegt worden.

Darauffolgend wurden die Behälter bis zum Oberrand mit dem Polymerisationsgemisch aufgefüllt und die noch offenen Gläschen im gekühlten Exsikkator auf ein Kühlelement gestellt und bei 4°C für ca. 10 Minuten entgast, um Luftblasen zu vermeiden, die das Aushärten des Kunststoffes negativ beeinflussen hätten können. Nach dem Entgasen wurden evtl. entstandene kleine Dellen an der Flüssigkeitsoberfläche bis zum Gefäßoberrand mit Polymerisationsgemisch vorsichtig aufgefüllt und die Gefäße mit dem Deckel letztlich luftdicht verschlossen. Zum Auspolymerisieren wurden die Gefäße bei -8°C bis -15°C im Gefrierschrank aufbewahrt. Die Dauer betrug je nach Erreichen der Härte zwölf bis 24 Stunden. Die auspolymerisierten Blöcke wurden danach über Nacht im Kühlschrank bei 4°C gelagert und anschließend an Raumtemperatur adaptiert.

Abbildung 8: Leeres Glasfläschchen mit Polymerisationsblock



2.2.5.2 Anfertigen von Dünnschnitten

Zum Schneiden wurden die jetzt polymerisierten Knochenstücke aus den Glasflaschen entnommen und der ausgehärtete Kunststoff kurz vor dem Knochenpräparat abgesägt, um später nur wenige Schnitte verwerfen zu müssen.

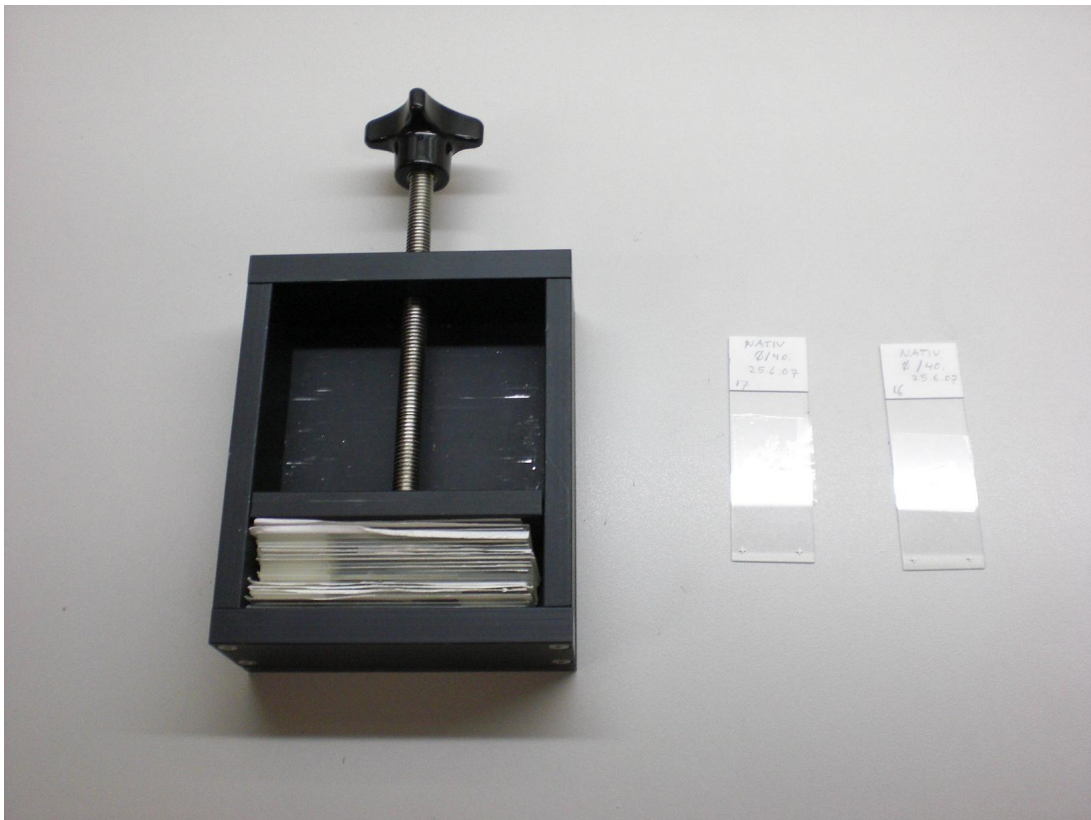
Alle histologischen Dünnschnitte wurden mit dem Hartschnittmikrotom Polycut E angefertigt. Zunächst mussten das Hartstahlmesser in einem Winkel zwischen 0° und 1° zur Schnittebene im Mikrotomkopf fixiert und die eingebetteten Knochenpräparate auf dem Schlitten des Mikrotoms fest eingespannt werden. Als nächstes wurde das Präparat nah an die Schnittkante des Mikrotommessers geführt und der Schlitten, auf dem die Präparate fixiert waren, an eine möglichst unbenutzte und scharfe Stelle des Mikrotommessers verschoben. Es bewährte sich, die Schnitte trocken durchzuführen, d.h. weder Messer noch Block mit Schneideflüssigkeit zu benetzen, da sich die Schnitte so weniger aufrollten. Bei einer Schnittdicke von $5\ \mu\text{m}$ und einer Schneidegeschwindigkeit von ca. fünf Schnitten pro Minute wurde schließlich der Schneidevorgang begonnen.

Im nächsten Schritt wurde mit einem großen Pinsel 70%iges Ethanol auf die Mitte der Objektträger getropft und jeweils ein Schnitt vorsichtig mit zwei kleineren Pinseln auf jeweils einen benetzten Objektträger ausgestrichen, damit sich der Schnitt nicht einrollte. Anschließend wurden die Objektträger mit dem auf Alkohol ausgezogenen Schnitt mit einer Polyethylenfolie bedeckt und mittels eines herkömmlichen Nudel-

holzes die Luftbläschen vorsichtig ausgestrichen. Je intensiver dabei das Ethanol ausgestrichen wurde und je weniger Luftbläschen dabei enthalten waren, desto besser hafteten die getrockneten Schnitte später am Objektträger.

Die fertigen Schnitte wurden zuletzt in die Objektträgerpresse gespannt und fest zugezogen. Dabei wurde als Zwischenlage zwischen den Objektträgern jeweils ein auf das Objektträgerformat zugeschnittener Filterpapierstreifen eingelegt.

Abbildung 9: Objektträgerpresse mit Schnitten



Zum Trocknen wurden die Schnitte für drei Wochen bei 37°C gepresst und danach bei Raumtemperatur bis zur Weiterverarbeitung gelagert.

2.2.5.3 Deacrylierung der Schnitte

Um die Schnitte anfärben zu können, mussten sie deacryliert bzw. entplastiniert werden, da diese im Vergleich zu nicht-entplastinierten Präparaten erfahrungsgemäß wesentlich bessere Ergebnisse liefern. Dafür wurden die Folien von den gelagerten Präparaten abgezogen und die Schnitte nach folgendem Schema in Küvetten deacryliert.

Schritt	Substanz	Einwirkzeit [Min.]
1	(2-Methoxyethyl)-acetat	30
2	(2-Methoxyethyl)-acetat	30
3	Xylol	5
4	Xylol	5
5	Ethanol 100%	5
6	Ethanol 96%	5
7	Ethanol 70%	5
8	Ethanol 50%	5
9	Ethanol 20%	5
10	H ₂ O	10
11	H ₂ O	10
12	H ₂ O	10

Tabelle 5: Schema zur Deacrylierung

Das verwendete (2-Methoxyethyl)-acetat diente dabei der Entplastinierung, die absteigende Alkoholreihe sowie die Spülung mit Wasser der Rehydrierung der Präparate. Mit der Rehydrierung sind die Schnitte auf die wässrige Färbelösung vorbereitet worden.

2.2.5.4 Färbung der Dünnschnitte

Nachdem nun jeder Knochenkubus eingebettet, geschnitten und schließlich die Entacrylierung durchgeführt worden war, konnten die Schnitte letztlich histologisch gefärbt und abschließend versiegelt werden.

2.2.5.4.1 Masson-Goldner-Färbung für PMMA

Bei der Masson-Goldner-Färbung nach R. Yang [Yang 2003] handelt es sich um eine Trichromfärbung, die heutzutage eine der Standardfärbungen für die Knochenmor-

phometrie darstellt und in der vorliegenden Arbeit in leicht modifizierter Weise Anwendung findet. Charakteristisch für sie ist die gute Zellanfärbung sowie die farblich klar unterscheidbare Darstellung mineralisierter und nicht-mineralisierter Knochenmatrix.

In den angefärbten Präparaten stellen sich dabei Knorpel und mineralisiertes Knochengewebe grün-blau, Osteoid hingegen rot dar; Zellkerne imponieren bräunlich bzw. schwarz und Zytoplasma ziegelrot.

Herstellung der Färbelösungen:

Weigert'sche Lösung I (= Hämatoxilin) sowie Weigert'sche Lösung II (= Eisen(III)-chloridlösung) waren bereits bezugsfertig in der Hausapotheke der Technischen Universität München erhältlich und nach Romeis [Romeis 1948, S. 160f.] zubereitet. Als Färbelösung diente eine Mischung beider Stammlösungen im Verhältnis 1:1, die erst unmittelbar vor Gebrauch erstellt wurde.

Ponceau-Xylidine-Säurefuchsinlösung:

Substanz	Quantität
Ponceau Xylidine	0,33 g
Säurefuchsin	0,175 g
Aqua dest.	500 ml
Eisessig	1 ml

Tabelle 6: Zusammensetzung Ponceau-Xylidine-Säurefuchsinlösung

Ponceau Xylidine und Säurefuchsin wurden gemeinsam in Aqua dest. gelöst und anschließend der Eisessig zugesetzt.

Phosphorwolframsäure-Orange G:

Substanz	Quantität
Wolframatophosphorsäure-Hydrat	15 g
Orange G	10 g
Aqua dest.	500 ml

Tabelle 7: Zusammensetzung Phosphorwolframsäure-Orange G

Das Wolframatophosphorsäure-Hydrat wurde im Aqua dest. gelöst und das Orange G beigemischt.

Lichtgrün:

Substanz	Quantität
Lichtgrün	0,5 g
Aqua dest.	500 ml
Eisessig	1 ml

Tabelle 8: Zusammensetzung Lichtgrün

Das Lichtgrün wurde im Aqua dest. gelöst und erst dann der Eisessig zugegeben.

Vorgehen und Reihenfolge der Anfärbung:

Substanz	Dauer [Min.]	Funktion
Weigert'sche Lösung I + II	60	Färbung
H ₂ O, lauwarm und fließend	5	Reinigung
Ponceau-Xylidine-Säurefuchsin	15	Färbung
Essigsäure 1%, frisch angesetzt	kurz abspülen	Auswaschung
Phosphorwolframsäure-Orange G	10	Differenzierung
Essigsäure 1%, frisch angesetzt	kurz abspülen	Auswaschung
Lichtgrün	15	Gegenfärbung
Essigsäure 1%, frisch angesetzt	kurz abspülen	Auswaschung

Aqua dest.	5	Reinigung
Ethanol 96%	2	Dehydrierung
Ethanol 100%	2	Dehydrierung
Ethanol 100%	2	Dehydrierung
Xylol	kurz tränken	Intermedium
Xylol	20-30	Intermedium

Tabelle 9: Schritte der Masson-Goldner-Färbung

2.2.5.4.2 Toluidinblau-O-Färbung

Die Toluidinblau-O-Färbung bewährt sich trotz Verwendung lediglich eines Farbstoffes durch eine sehr gute Gewebedifferenzierung aufgrund metachromatischer Effekte. Diese Effekte lassen sich durch unterschiedlich starke Entfärbungen der einzelnen Gewebearten bei zusätzlicher Differenzierung in Alkohol nochmals intensivieren, so dass bei sehr einfacher Durchführbarkeit sehr gute Ergebnisse erzielt werden können.

Mikroskopisch betrachtet stellt sich mineralisiertes Hartgewebe ungefärbt bis blassblau dar, Zellen, Osteoidsäume und Kollagenfasern in verschiedenen Blautönen. Knorpelmatrix und Wundheilungsareale färben sich rot-violett, verkalkte Knorpelmatrix dunkelblau.

Herstellung der Färbelösung:

Substanz	Quantität
Toluidinblau O	0,3 g
Natriumcarbonat	2,5 g
Aqua dest.	100 ml

Tabelle 10: Zusammensetzung Toluidinblau-O-Lösung

Toluidinblau O und Natriumcarbonat wurden in 100ml Aqua dest. mittels eines Magnetrührers gelöst und die entstandene Lösung vor Gebrauch zweimal filtriert.

Anleitungsschritte zur Färbung:

Substanz	Dauer [Min.]	Funktion
Toluidinblau-O-Lösung	20	Färbung
H ₂ O, lauwarm und fließend	5	Reinigung
Ethanol 96%	0,15	Dehydrierung
Ethanol 100%	3	Dehydrierung
Ethanol 100%	3	Dehydrierung
Xylol	30	Intermedium

Tabelle 11: Schritte der Toluidinblau-O-Färbung

2.2.6 Einbettung der histologischen Schnitte

Nachdem nun die verschiedenen Färbetechniken durchgeführt worden waren, mussten die Präparate abschließend eingedeckt werden. Als Eindeckmittel wurde dafür Eukitt[®] verwendet, das für alle entwässerten, mikroskopischen Präparate angewendet werden kann und über mehrere Jahre stabile Farben garantiert.

Nach Beendigung der jeweiligen Färbung wurden die Präparate direkt dem Xylol entnommen und unter dem Abzug mit einem Eukitt[®]-benetzten Deckglas, das mit Hilfe eines Glasstabes aufgebracht wurde, eingedeckt, indem das Deckglas dem Präparat am oberen Ende aufgesetzt und unter langsamer Absenkung vorsichtig ausgestrichen wurde. Es war dabei darauf zu achten, dass der Zwischenraum zwischen Präparat und Deckglas vollständig mit Eukitt[®] ausgefüllt war. Mit einem xylolgetränkten Lappen wurde überschüssiges Eindeckmittel entfernt. Nach erfolgter Lufttrocknung waren die Schnitte fertig zum Mikroskopieren.

2.2.7 Immunhistochemie nach der ABC-Methode

Bei der Immunhistologie handelt es sich um eine Methode, bei der Proteine mittels Antikörper visualisiert werden können. Durch die hohe Affinität und Spezifität eines Antikörpers zum gewünschten Antigen kommt es zur Bindung zwischen diesen. Der Antikörper ist dabei mit einem Detektionssystem gekoppelt, der das nachgewiesene Antigen sichtbar macht. Auf diese Weise lassen sich bereits geringe Mengen des entsprechenden Proteins darstellen.

Zur qualitativen Analyse der besiedelten Knochenkuben wurde hier die immunhistologische Untersuchung mit CD31-AK durchgeführt, da so durch eine spezifische Antikörperbindung über den Oberflächenmarker CD31 gezielt Endothelzellen dargestellt werden können. Das CD31/PECAM (Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule), wogegen der Antikörper gerichtet ist, ist an der endothelialen Zelladhäsion beteiligt [DeLisser 1997].

CD31 gilt dabei als ein besonders sensibler Marker für Endothelzellen [Horak 1992]. Nach Gasparini ist der CD31-Antikörper sogar der sensitivste panendotheliale Antikörper bei jedoch reduzierter Spezifität, weil damit auch Plasmazellreaktionen nachgewiesen werden [Gasparini 1997, S. 29f.].

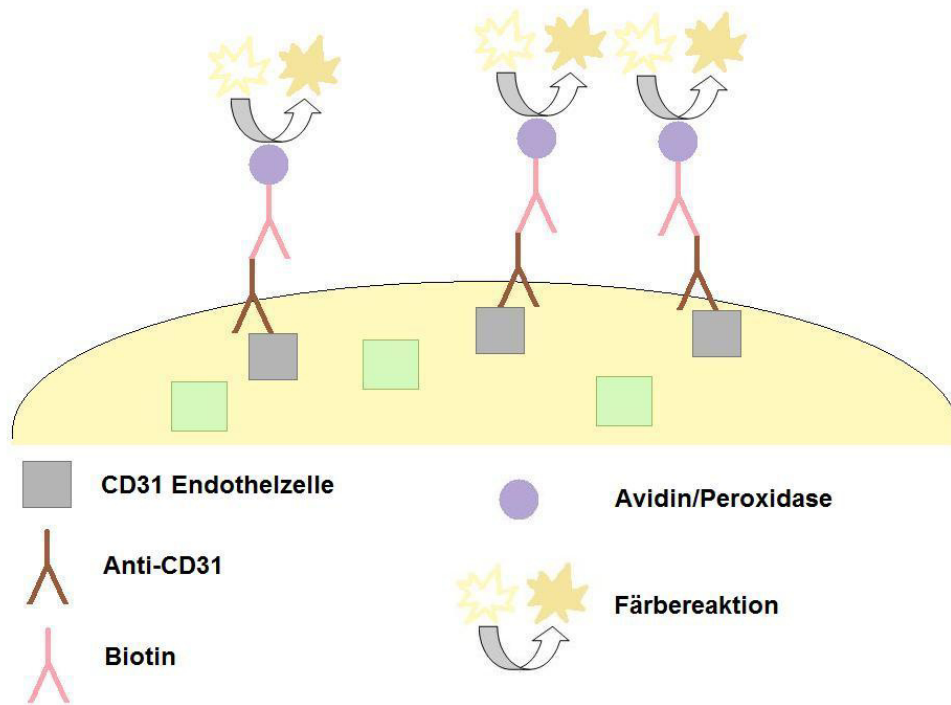
Verwendet wurde in der Versuchsreihe der Kit Vectastain Elite® ABC, ein sensitives Immunoperoxidasesystem, das nach der Avidin-Biotin-Methode arbeitet. Es handelt sich bei diesem Prinzip um eine doppelt indirekte Antikörpernachweismethode, weil zwei Antikörper zum Einsatz kommen. Diese hat dadurch den Vorteil einer Signalverstärkung. Der Antikörper, der dabei direkt gegen das nachzuweisende Epitop gerichtet ist, wird als Primärantikörper bezeichnet. In einem weiteren Schritt wird ein zweiter Antikörper, der sogenannte Sekundärantikörper, aufgetragen, der sich diesmal jedoch gegen den ersten Antikörper richtet. Der Sekundärantikörper dient als Brücke zwischen dem Primärantikörper und dem Peroxidase-Anti-Peroxidase-Komplex, der zuletzt zugeführt wird. Der Komplex besteht aus drei Molekülen Enzym und zwei Antikörpern derselben Spezies wie der Primärantikörper, die gegen das Enzym gerichtet sind.

Das Enzym löst durch eine Enzym-Substrat-Reaktion die Farbentstehung aus, weil durch die freiwerdenden Protonen das vorher nahezu farblose Chromogen unter Bildung von Wasser zu seinem farbigen Endprodukt oxidiert wird.

Als Primärantikörper diente bei den Versuchen Anti-CD31, das mit einem Glykoprotein in Endothelzellen reagiert [Parums 1990], als Sekundärantikörper kam ein biotinelabelter anti-mouse IgG Antikörper zum Einsatz, der mit dem peroxidasegelabelten Avidin einen Komplex bildete. Als Substrat diente AEC (=3-Amino-9-Ethylcarbazol). Die Funktionsweise ist in Abb. 10 nochmals dargestellt. Zur Gegenfärbung wurde Hämalaun verwendet.

Lichtmikroskopisch präsentieren sich die Endothelzellen rot-bräunlich.

Abbildung 10: Funktionsschema ABC-Methode



Vor den eigentlichen Färbeversuchen wurde zur Testung des Antikörpers CD31 zunächst eine Positivkontrolle (Abb. 62) mit angezüchteten Endothelzellen und eine Negativkontrolle (Abb. 63) mit Osteoblasten angefertigt. Diese finden sich im Ergebnisteil unter 3.3.3.

2.2.7.1 Vorversuche mit Frischpräparaten

Zunächst galt es, eine Immunhistochemie für Endothelzellen zu etablieren. Dafür wurden zwei Tablettts mit je sechs Culture slides verwendet. Auf jedem Culture slide befinden sich vier Kammern, von denen jede Kammer mit jeweils 10 000 Zellen besiedelt und mit 1 ml Standardmedium mit FCS beimpft wurde. Diese sollten bei 37°C so lange inkubiert werden, bis etwa 80% der Fläche mit Endothelzellen besiedelt gewesen wären. Es zeigte sich jedoch, dass sich die Endothelzellen auf der Glasfläche der Culture slides nicht ausbreiten konnten, so dass der Vorversuch mit Slide Flasks, Objektträgern aus Kunststoff, erneut gestartet wurde. Jeder der fünf Objektträger wurde mit 50 000 Zellen und 3 ml Standardmedium beimpft und bei 37°C bis zur ausreichenden Zellanreicherung inkubiert. Anschließend erfolgte zunächst die Fixierung der Zellen wie in Tab. 12 beschrieben sowie die immunhistologische Färbung nach zwei Methoden, gemäß Tab. 13.

Schritt	Substanz	Dauer [Min.]
1	PBS	10
2	PBS	10
3	PFA 4%	15
4	PBS	2
5	Raumluft	Lufttrocknung bei Raumtemperatur

Tabelle 12: Schema Zellfixierung

- Herstellung 1% H₂O₂/Methanol:
 - 3 ml 30%iges H₂O₂
 - 87 ml Methanol

- Herstellung Proteinase K 1:1000:
 - 1 µl Proteinase K
 - 999 µl Aqua dest.

- Herstellung FCS 10%:
 - 100 µl FCS 100%
 - 1000 µl PBS

- Herstellung Antikörper CD31 (Monoclonal Mouse Anti-Human AK) 1:20:
 - 30 µl CD31
 - 570 µl Antibody diluent

- Herstellung Antikörper Biotin (Biotinylated Horse Anti-Mouse IgG AK) 1:200:
 - 3 µl anti-Maus biotischer Vektor
 - 597 µl PBS

- Herstellung ABC-Reagenz (Avidin/Peroxidase):
 - 5 ml PBS
 - 2 Tropfen Reagenz A
 - 2 Tropfen Reagenz B

Versuchsaufbau:

Schritt	Substanz	Dauer [Min.]		Erläuterung
		Methode 1	Methode 2	
1	PBS	5	5	
2	PBS	5	5	
3	1% H ₂ O ₂ /Methanol	10	10	Block endogener Peroxidase
4	PBS	25	5	
5	Proteinase K, 1:1000	0	20	Andauung bei RT
6	PBS	5	5	
7	FCS 10%	20	20	bei RT, verhindert indirekte Bindungen
8	300 µl CD31	60	60	Primärantikörper, RT
9	PBS + Brij	5	5	Zusatz von Brij senkt Oberflächenspannung
10	PBS + Brij	5	5	
11	300 µl Sekundärantikörper	30	30	biotingelabelter Sekundärantikörper, RT
12	PBS + Brij	5	5	
13	PBS + Brij	5	5	
14	Avidin/Peroxidase	30	30	Peroxidase
15	PBS + Brij	5	5	
16	PBS + Brij	5	5	
17	AEC+Substrate-Chromogen	gemäß Intensität	gemäß Intensität	Substrat zur Färbung
18	PBS + Brij	5	5	
19	Hämalaun	1	1	Gegenfärbung

20	H ₂ O	5	5	
----	------------------	---	---	--

Tabelle 13: Schritte der Immunhistologieversuche für Endothelzellen an frischen Präparaten

Die Verarbeitung und Lagerung erfolgte in einer mit Aqua dest. befüllten Feuchtkammer, um ein Austrocknen der Präparate zu vermeiden. Die Reinigungsvorgänge wurden in Glasküvetten durchgeführt.

Nachdem, wie in der obenstehenden Anleitung beschrieben, das Substrat zur Anfärbung zugegeben worden war, wurde unter dem Mikroskop die Färbung verfolgt. War die gewünschte Braunfärbung erreicht, wurde zur Beendigung des Färbeprozesses das Substrat auf ein Tuch geträufelt und der Objektträger in die PBS-/Brijlösung gelegt.

Nachdem die Immunhistologie abgeschlossen worden war, wurden die Objektträger in Glyceringelatine eingebettet, die für 30 Sekunden in der Mikrowelle angewärmt und danach mit einem Glasdeckel versehen worden war, bevor sie zur Mikroskopie bereitstanden.

Die Andauung mit Proteinase K erwies sich bei den Vorversuchen als kontraproduktiv, da die Zellen größtenteils verloren gingen und dies folglich schlechte Ergebnisse lieferte.

2.2.7.2 Hauptversuche mit PMMA-Schnitten

Als Nachweis sowie zur Visualisierung der am Knochen adhären Endothelzellen wurden immunhistochemische Färbungen mit den angefertigten PMMA-Schnitten angefertigt. Es wurden verschiedene Andauungen, Konzentrationen und Inkubationszeiten getestet und die besten Färberesultate für die Auswertung verwendet. Die unterschiedlichen immunhistochemischen Anleitungen sind in Tab. 14 wiedergegeben.

- Herstellung Antikörper CD31 (Monoclonal Mouse Anti-Human AK) 1:10:
 - o 20 µl CD31
 - o 180 µl Antibody diluent

- Herstellung Antikörper CD31 (Monoclonal Mouse Anti-Human AK) 1:20:
 - o 15 µl CD31
 - o 285 µl Antibody diluent

Versuchsaufbau:

Nach bereits vorangehend beschriebener Deacrylierung der Kunststoffschritte (siehe 2.2.5.3) wurden folgende immunhistochemische Versuche durchgeführt:

Schritt	Substanz	Dauer [Min.]						Erläuterung
		Schnitt 1	Schnitt 2	Schnitt 3	Schnitt 4	Schnitt 5	Negativ-kontrolle	
1	PBS	5	5	5	5	5	5	
2	PBS	5	5	5	5	5	5	
3	1% H ₂ O ₂ /Methanol	10	10	10	10	10	10	Block endogener Peroxidase
4	PBS	5	5	5	5	5	5	
5	PBS	5	5	5	5	5	5	
6	Andauung Mikrowelle	15	15	0	0	0	15	cf. folgende Erläuterung
7	Proteinase K, 1:1000	0	0	30	30	0	0	Andauung bei RT
8	PBS	5	5	5	5	5	5	
9	PBS	5	5	5	5	5	5	
10	FCS 10%	20	20	20	20	20	20	RT, verhindert indirekte Bindungen
11	100 µl CD31, 1:10	180	0	180	0	0	0	Primärantikörper, RT cf. folgende Erläuterung
12	100 µl CD31, 1:20	0	180	0	180	180	0	Primärantikörper, RT cf. folgende Erläuterung

	100 µl ISO-AK, 1:20	0	0	0	0	0	180	zur Negativkontrolle, RT cf. folgende Erläuterung
13	PBS + Brij	15	15	15	15	15	15	
14	PBS + Brij	15	15	15	15	15	15	
15	100 µl Sekundär- antikörper, 1:200	45	45	45	45	45	45	biotingelabelter Sekundärantikörper, RT
16	PBS + Brij	5	5	5	5	5	5	
17	PBS + Brij	5	5	5	5	5	5	
18	Avidin/Peroxidase	45	45	45	45	45	45	Peroxidase
19	PBS + Brij	5	5	5	5	5	5	
20	PBS + Brij	5	5	5	5	5	5	
21	AEC+Substrate- Chromogen	gemäß Farbintensität						Färbesubstrat
22	PBS + Brij	5	5	5	5	5	5	

Tabelle 14: Immunhistologie von PMMA-Schnitten

- Erläuterung zur Andauung in der Mikrowelle:

Die Schnitte wurden zur Andauung in eine mit Leerschnitten bestückte und mit Citratpuffer pH 6,1 (Dako Cytomation Target Retrieval Solution Ready to Use) befüllte Kunststoffküvette (cf. Abb. 11) gegeben und mit einem Glasdeckel verschlossen. Die Leerschnitte waren zum Schutz des eigentlichen Präparates erforderlich, damit dieses nicht abschwamm. Anschließend wurde die Küvette in einem 800 ml Glasgefäß plaziert und das Gefäß auf 450 ml mit Aqua dest. befüllt. Unter ständiger Kontrolle, dass stets genügend Puffer in der Küvette war, wurde das Glasgefäß zur hitzeinduzierten Antigendemaskierung für jeweils fünf Minuten bei 450 Watt, dann bei 350 Watt und zuletzt bei 250 Watt zum Aufkochen in die Mikrowelle gestellt. Danach wurde die Küvette aus dem Becherglas entnommen und für 15 Minuten bei Raumtemperatur abgekühlt. Durch das Kochen in der Mikrowelle mit dem Citratpuffer (pH 6,1) wurden die Epitope, die durch Fixierung vernetzt wurden, wieder freigelegt und konnten so durch die Antikörper erkannt werden.

Abbildung 11: Pufferbefüllte Kunststoffküvette mit Leerschnitten



- Erläuterung zum Primärantikörper CD31:
In der Feuchtkammer wurden die Präparate zunächst für drei Stunden mit dem Primärantikörper bei Raumtemperatur beimpft und anschließend über Nacht bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt. Am Folgetag wurden die Schnitte aus dem Kühlschrank entnommen und in der Feuchtkammer für 45 Minuten bei Raumtemperatur angewärmt, bevor mit den weiteren Schritten fortgefahren wurde.
- Erläuterung zur Negativkontrolle:
Unter Verwendung des ISO-Antikörpers Mouse IgG1 (Negative Control Mouse) wurde bei der Versuchsdurchführung auch eine Negativkontrolle als Kontrollansatz angefertigt. Sie diente als Gegenprobe, bei der sich folglich im Präparat keine Braunfärbungen der Endothelzellen finden ließen und somit die Aussagekraft der Positivkontrolle unterstrichen wurde.

Auch bei den eingebetteten Schnitten erfolgte die Verarbeitung und Lagerung in einer mit Aqua dest. befüllten Feuchtkammer, um ein Austrocknen der Präparate zu vermeiden. Die Reinigungsvorgänge wurden ebenfalls in Glasküvetten durchgeführt. Nachdem das Substrat zur Anfärbung zugegeben worden war, wurde unter dem Mikroskop die Färbung verfolgt. War die gewünschte Braunfärbung erreicht, wurde zur Beendigung des Färbevorgangs das Substrat auf ein Tuch geträufelt und der Objektträger in die PBS-/Brijlösung gelegt.

Es erfolgte jedoch diesmal keine Gegenfärbung mit Hämalaun, da diese erfahrungsgemäß bei Kunststoffpräparaten kaum angenommen wird.

Nachdem die Immunhistologie abgeschlossen war, wurden die Objektträger ebenfalls in Glyceringelatine eingebettet und mit einem Glasdeckel versehen. Die Glyceringelatine war zuvor wiederum für 30 Sekunden in der Mikrowelle angewärmt worden.

2.2.8 Mikroskopie

Mit dem Mikroskop Axiovert 25 von Zeiss wurden alle gefärbten Präparate begutachtet. Die histologischen Abbildungen in der vorliegenden Arbeit wurden mit der am Mikroskop integrierten Farbkamera AxioCam MRc angefertigt und mittels einer speziellen Bildverarbeitungssoftware (AxioVision Vs40, V.4.7.1.0) am angeschlossenen Computersystem bearbeitet.

2.2.9 Statistik

Die statistische Auswertung wurde mit Hilfe der Software SPSS V.15.0 und in Zusammenarbeit mit Frau Raymonde Busch des Instituts für Medizinische Statistik und Epidemiologie der Technischen Universität München (Direktor: Prof. Dr. Klaus A. Kuhn) durchgeführt.

Eine Zusammenfassung der Werte fand mit Median, Perzentile 5 und 95, Minimum und Maximum, Mittelwert und Standardabweichung statt. Die Diagrammdarstellungen erfolgten mittels Box-Plots. Eine Signifikanz lag vor, wenn $p < 0,05$ war. Eine Tendenz lag bei einem Intervall von $0,05 \leq p < 0,15$ vor.

Zum Vergleich zwischen den Knochengruppen wurde der Kruskal-Wallis-Test als globaler Test angewendet. Bei Nicht-Signifikanz war die Testung beendet. Bei

Signifikanz bzw. Tendenz folgte als Post-Hoc-Test der Mann-Whitney-Test [Marcus 1976]. Für verbundene Stichproben fand zum Vergleich zwischen zwei verbundenen Variablen der Wilcoxon-Test Anwendung.

3. Ergebnisse und Auswertung

Alle nachfolgenden Ergebnisse werden in Form einer Grafik dargestellt. Die jeweils ausführlichen, korrespondierenden statistischen Auswertungen finden sich im Anhang.

3.1 Adhäsion radioaktiv markierter RGD-Peptide

Die Versuchsdurchführung erfolgte wie unter 2.2.4.1 beschrieben. Tab. 15 zeigt zunächst die Ergebnisse der Adhäsion des radioaktiv markierten RGD auf den entsprechenden Knochen.

Gemessen wurde die Radioaktivität (Anzahl der Zerfälle des radioaktiv markierten RGD pro Minute) im Automatic Gamma Counter Wallac 1480 Wizard 3“. Ursprünglich wäre auch eine 7-Tage-Testung geplant gewesen. Da jedoch das radioaktive Jod das RGD zerstörte, konnte die Auswertung der Stabilität nach einer Woche aufgrund verfälschter Werte nicht berücksichtigt werden und wurde daher verworfen.

Probenart	RGD-Konzentration [μmol]	Reinigungsart	Probe	Knochengewicht [g]	Zerfälle des am Knochen anhaftenden RGD (Aktivität)	
					[Counts per Minute]	pro Gramm Knochen [10^{-11} mol/g]
	Leerwert 1				82822,90	
	Leerwert 10				90453,40	
	Leerwert 72				29013,20	
Knochen	1	Ultraschall	1	0,200	29827,40	3,60
Knochen	1	Ultraschall	2	0,165	22373,10	3,27
Knochen	1	Ultraschall	3	0,278	20083,90	1,73
Knochen	1	Aceton	1	0,076	22610,20	7,11
Knochen	1	Aceton	2	0,087	45627,80	12,64
Knochen	1	Aceton	3	0,126	49626,10	9,52
Knochen	1	Nativ	1	0,155	15612,70	2,45
Knochen	1	Nativ	2	0,250	31190,00	3,04
Knochen	1	Nativ	3	0,252	26990,70	2,62
Knochen	10	Ultraschall	1	0,314	28518,10	20,38
Knochen	10	Ultraschall	2	0,234	16472,50	15,38
Knochen	10	Ultraschall	3	0,241	31226,40	29,05
Knochen	10	Aceton	1	0,159	48417,50	67,92
Knochen	10	Aceton	2	0,091	31450,50	76,92
Knochen	10	Aceton	3	0,103	27582,50	58,25
Knochen	72	Ultraschall	1	0,170	8601,40	254,12
Knochen	72	Ultraschall	2	0,255	6160,00	118,59

Ergebnisse und Auswertung

Knochen	72	Ultraschall	3	0,335	22591,40	335,28
Knochen	72	Aceton	1	0,069	7471,20	542,61
Knochen	72	Aceton	2	0,156	16614,60	526,15
Knochen	72	Nativ	1	0,283	11308,10	198,45
Knochen	72	Nativ	2	0,228	11247,00	246,32
Knochen	72	Nativ	3	0,269	9013,90	165,95

Tabelle 15: Adhäsion des radioaktiv markierten RGD auf Knochen nach einem Tag

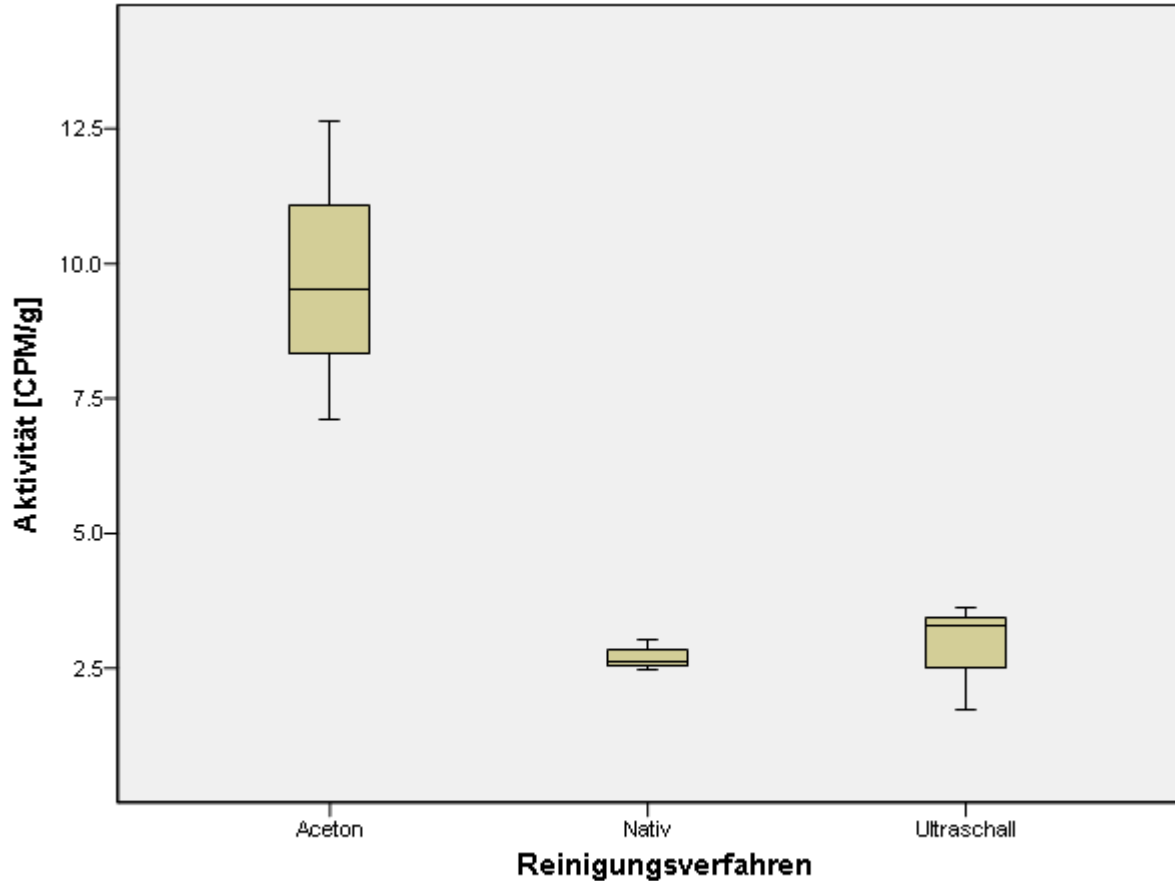
Nota bene: Im Folgenden werden die Dezimalzahlen aufgrund des verwendeten Programms (SPSS V.15.0) wie in der englischen Sprache üblich mit Dezimalpunkt geschrieben statt wie im Deutschen mit Komma.

3.1.1 Vergleich der RGD-Adhäsion auf den unterschiedlich gereinigten Knochenkuben innerhalb einer Konzentration

Verglichen wurde jeweils die Radioaktivität der am Knochen adhären, radioaktiv markierten RGD-Peptide bezogen auf ein Gramm Knochengewicht. Es wurden jeweils die zusammengehörigen Einzelproben der Adhäsionen der drei verschiedenen RGD-Konzentrationen (1 und 10 und 72 μmol) auf den drei Knochenreinigungsgruppen (Nativ, Ultraschall, Aceton) in Beziehung gestellt.

3.1.1.1 Konzentration 1 μmol

Abbildung 12: Vergleich der Adhäsion radioaktiv markierter RGD (1 μmol) auf unterschiedlich gereinigten Knochenkuben pro Gramm

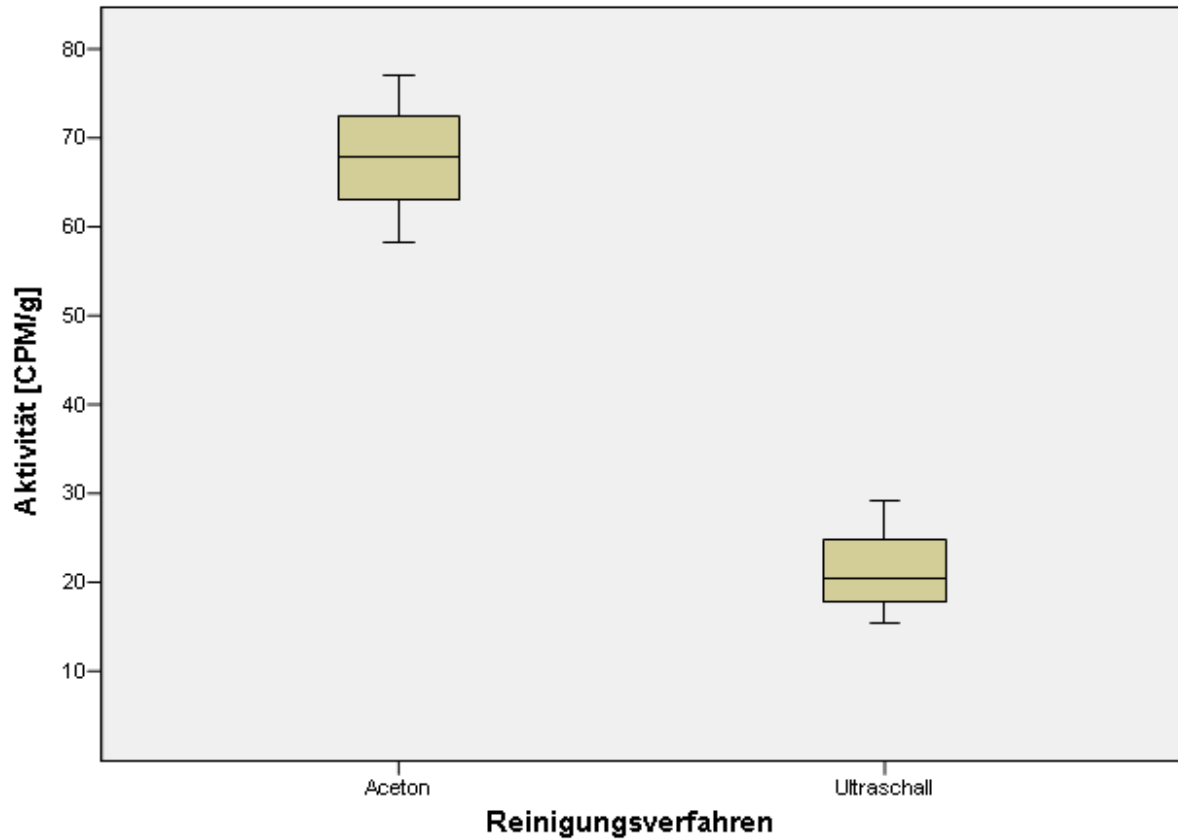


Vergleicht man die RGD-Adhäsion der verschiedenen Knochengruppen, die mit jeweils 1 μmol radioaktiv markiertem RGD beschichtet wurden, so fällt auf, dass die Aceton- gegenüber der Nativ- als auch gegenüber der Ultraschallgruppe eine Tendenz zur Mehradhäsion aufweist. Der p-Wert liegt dabei bei beiden Vergleichen bei 0,050.

Zwischen den Gruppen der nativen und der ultraschallgereinigten Knochen lässt sich mit einem p-Wert von 0,513 keine Tendenz erkennen.

3.1.1.2 Konzentration 10 µmol

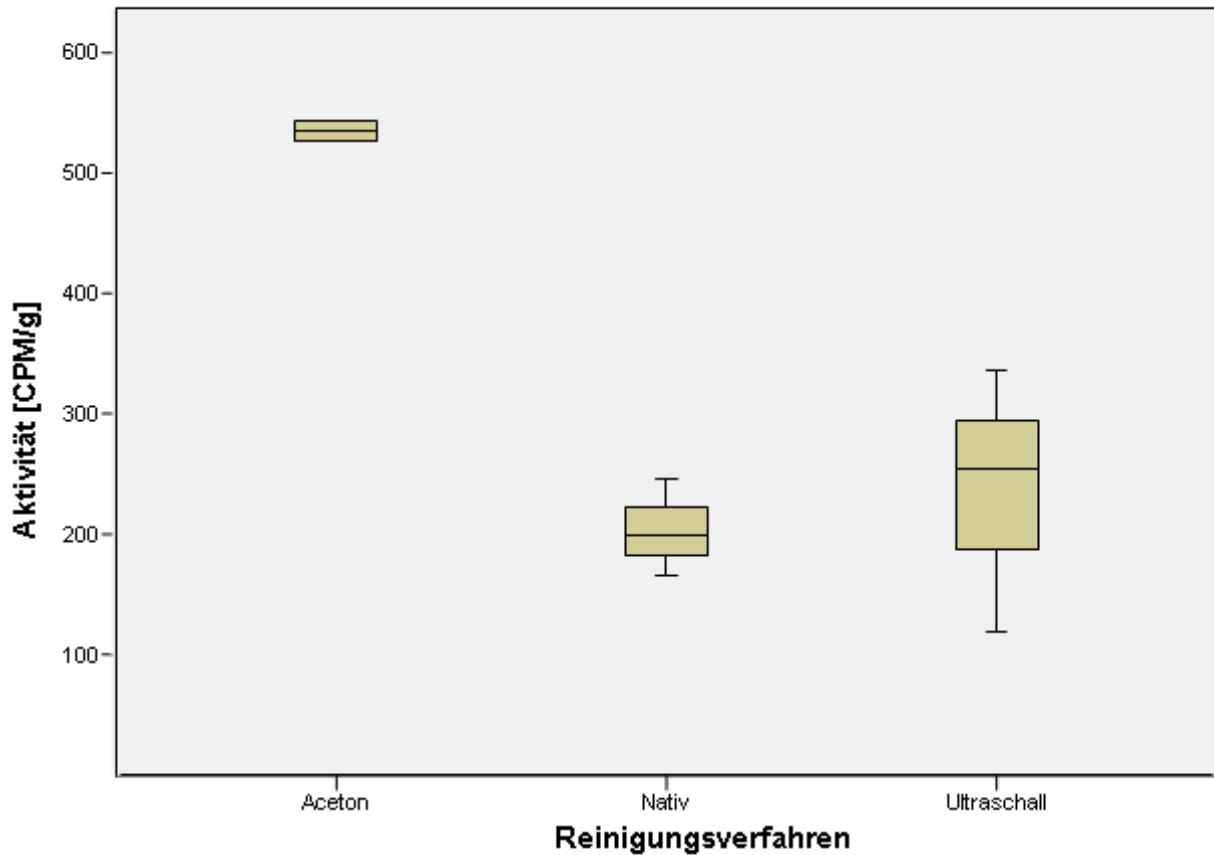
Abbildung 13: Vergleich der Adhäsion radioaktiv markierter RGD (10 µmol) auf unterschiedlich gereinigten Knochenkuben pro Gramm



Bei einer Konzentration von 10 µmol radioaktiv markiertem RGD zeichnet sich bei einem p-Wert von $p=0,050$ die klare Tendenz zur Mehradhäsion des RGD auf acetongereinigtem Knochen gegenüber dem ultraschallgereinigten Knochen ab.

3.1.1.3 Konzentration 72 μmol

Abbildung 14: Vergleich der Adhäsion radioaktiv markierter RGD (72 μmol) auf unterschiedlich gereinigten Knochenkuben pro Gramm



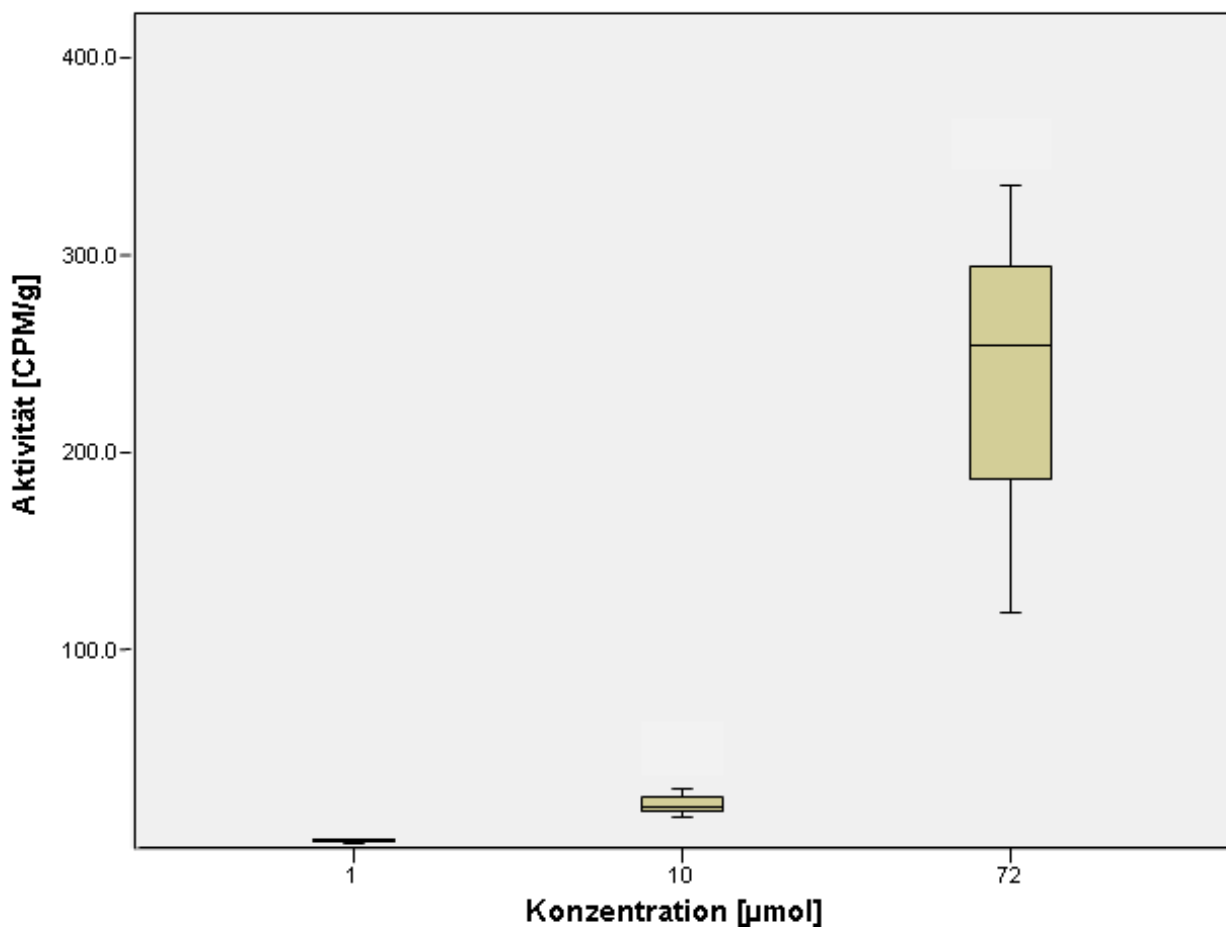
Im Vergleich der Nativ- und der Ultraschallgruppe mit den acetongereinigten Knochen, die mit 72 μmol konzentriertem, radioaktiv markiertem Peptid beimpft wurden, lässt sich mit einem p-Wert von jeweils 0,083 ebenfalls die Tendenz erkennen, dass nach der Knochenreinigung mit Aceton wesentlich mehr RGD-Peptide adhären können als auf den Vergleichsgruppen. Untersucht man jedoch die Adhäsionsfähigkeit zwischen der Nativ- und der Ultraschallgruppe, so lässt sich bei einem p-Wert von 0,513 kein statistischer Unterschied feststellen.

3.1.2 Vergleich der RGD-Adhäsion bei unterschiedlichen Konzentrationen innerhalb einer Reinigungsart

Um herauszufinden, ob bei den verwendeten Konzentrationen des radioaktiv markierten RGD-Peptids eine die Verankerung auf dem Knochen betreffende Sättigung eintritt, wurden die verschiedenen Konzentrationen der einzelnen Reinigungsgruppen einander gegenübergestellt. Daraus resultierend sollten Rückschlüsse auf die verwendete RGD-Konzentration für die Hauptversuche gezogen werden. Die entsprechend ausführliche statistische SPSS-Ausarbeitung zu den Vergleichen ist im Anhang unter 7.1.2 angeführt.

3.1.2.1 Ultraschall

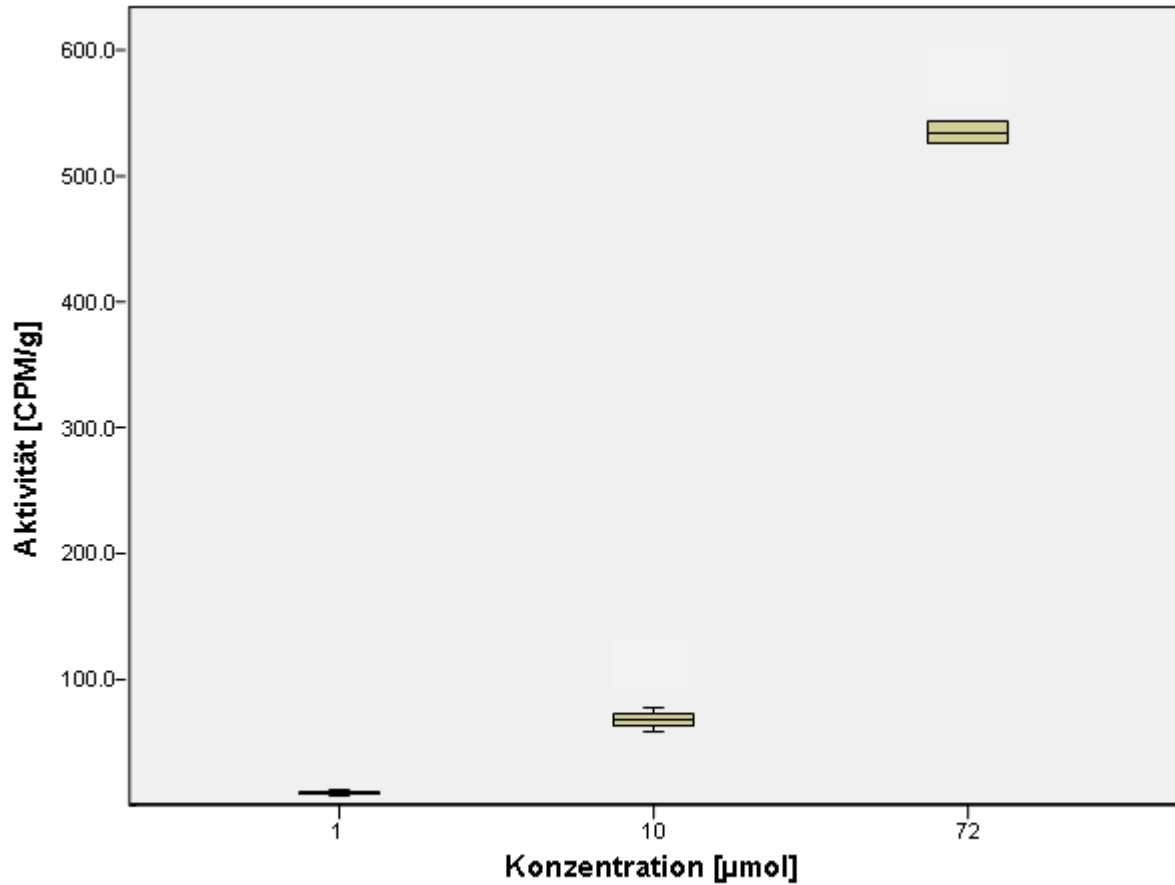
Abbildung 15: Vergleich der Adhäsion radioaktiv markierter RGD bei unterschiedlichen Konzentrationen auf ultraschallgereinigten Knochenkuben pro Gramm



Bei der Ultraschallgruppe ist mit steigender Konzentration des RGD-Peptids die Adhäsion am Knochen mit jeweils $p=0,050$ tendenziell zunehmend.

3.1.2.2 Aceton

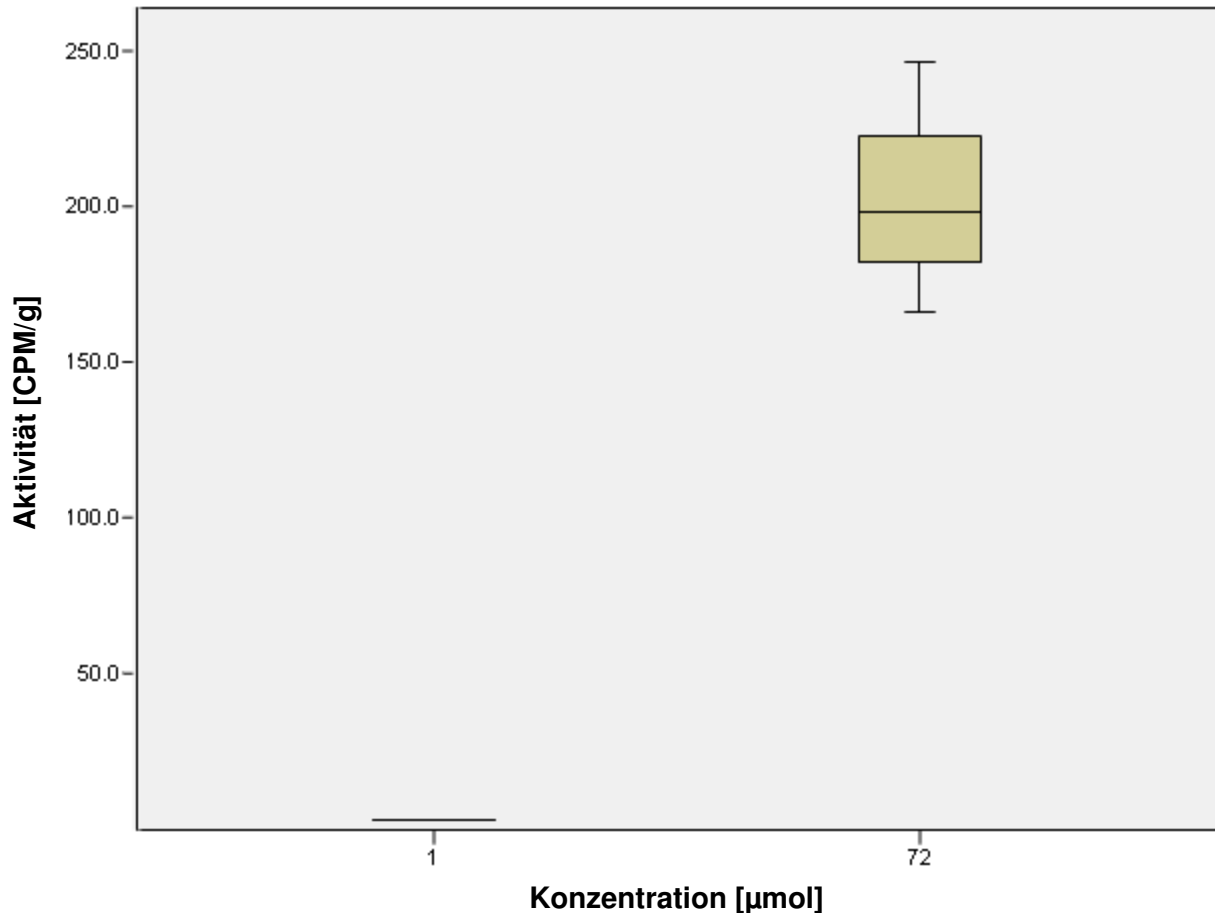
Abbildung 16: Vergleich der Adhäsion radioaktiv markierter RGD bei unterschiedlichen Konzentrationen auf acetongereinigten Knochenkuben pro Gramm



Bei einer Konzentration von 10 µmol RGD-Peptid kann mit $p=0,050$ statistisch gesehen tendenziell mehr radioaktiv markiertes Peptid auf dem acetongereinigten Knochen gebunden werden, als bei 1 µmol. Bei einer noch höheren Konzentration von 72 µmol können statistisch gesehen tendenziell noch mehr Endothelzellen am Knochen anhaften als bei 10 µmol ($p=0,083$).

3.1.2.3 Nativ

Abbildung 17: Vergleich der Adhäsion radioaktiv markierter RGD bei unterschiedlichen Konzentrationen auf nativen Knochenkuben pro Gramm



Auch in der Nativgruppe adhären bei der höheren Konzentration (72 µmol) mit $p=0,050$ mehr Endothelzellen am Knochen als bei der niedrigeren Konzentration.

3.2 Hauptversuche Endothelzelladhäsion und -proliferation

Es wurden insgesamt 13 Versuche zur Adhäsion und Proliferation durchgeführt. Mittels colorimetrischer Hexosaminidase-Assays wurde über die direkte Proportionalität der Farbentwicklung zur Zellmenge die Farbintensität der lysierten Endothelzellen der Adhäsions- sowie der Proliferationsversuche auf den verschiedenen Knochen mit und ohne RGD-Beschichtung ermittelt. Gemessen wurde dabei die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 405 nm. Der Mittelwert der jeweiligen

Ergebnisse und Auswertung

Versuche (siehe Tab. 16) berechnet sich aus dem reinen Messwert der jeweils zugehörigen Einzelversuche abzüglich des entsprechenden Leerwertes. Alle Messdaten können dem Anhang unter 7.1.3 entnommen werden.

Versuch	Adhäsion			Proliferation		
	Gruppe	Mittelwert		Gruppe	Mittelwert	
		ohne RGD	mit RGD		ohne RGD	mit RGD
1	Ultraschall	0,141	0,129	Ultraschall	0,078	0,093
2	Ultraschall	0,484	0,283	Ultraschall	0,012	0,020
3	Aceton	0,296	0,388	Aceton	0,209	0,222
4	Nativ	0,413	0,389	Nativ	0,072	0,102
5	Nativ	0,192	0,166	Nativ	0,018	0,037
6	Nativ	0,242	0,231	Nativ	0,067	0,059
7	Aceton	0,293	0,299	Aceton	0,128	0,153
8	Aceton	0,215	0,309	Aceton	0,115	0,136
9	Nativ	0,152	0,187	Nativ	0,017	0,021
10	Ultraschall	0,235	0,290	Ultraschall	0,121	0,162
11	Ultraschall	0,166	0,190	Ultraschall	0,042	0,069
12	Aceton	0,153	0,170	Aceton	0,290	0,307
13	Ultraschall	0,063	0,095	Ultraschall	0,073	0,164

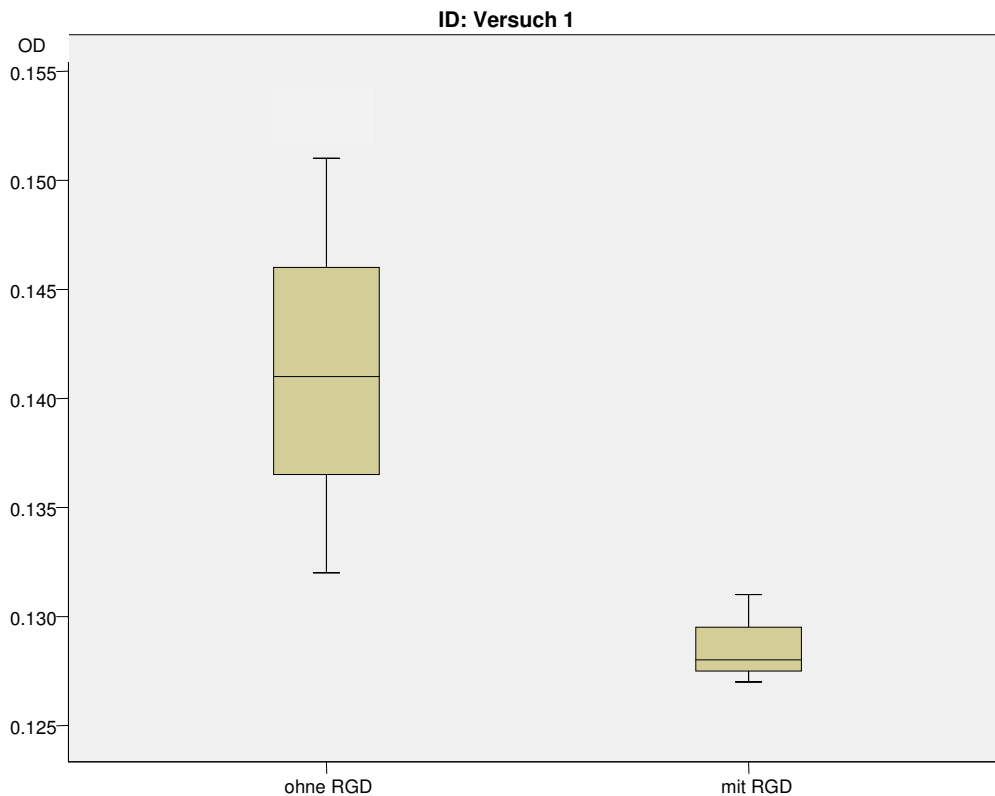
Tabelle 16: Aufstellung aller colorimetrisch gemessener Mittelwerte von Endothelzelladhäsion und -proliferation auf den unterschiedlich gereinigten Knochenkuben mit und ohne RGD-Beschichtung abzüglich der korrespondierenden Leerwerte

3.2.1 Endothelzelladhäsion der Einzelversuche

Die Messergebnisse der Adhäsion beruhen auf dem Versuchsaufbau wie er unter 2.2.4.2 beschrieben wird. Verglichen wird die mittels Hexosaminidase-Assay gemessene Endothelzelladhäsion auf den verschiedenen Knochengruppen mit und ohne RGD-Beschichtung.

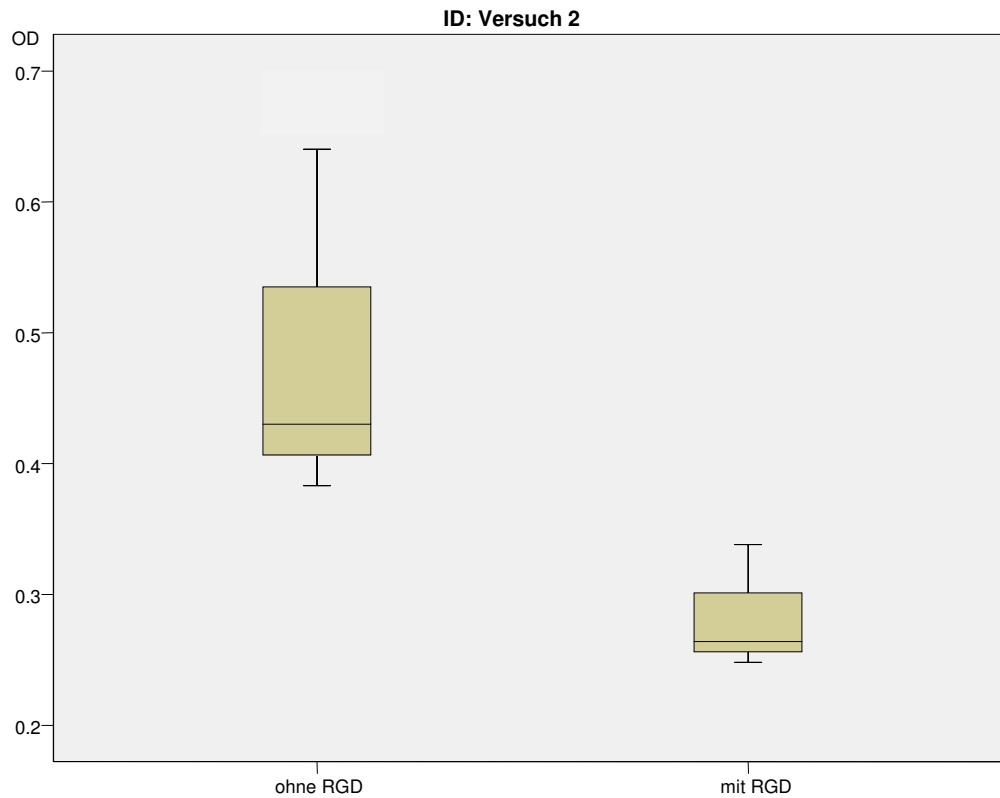
3.2.1.1 Ultraschall

Abbildung 18: Vergleich der Endothelzelladhäsion mit und ohne RGD-Beschichtung auf ultraschallgereinigten Knochen (Versuch 1)



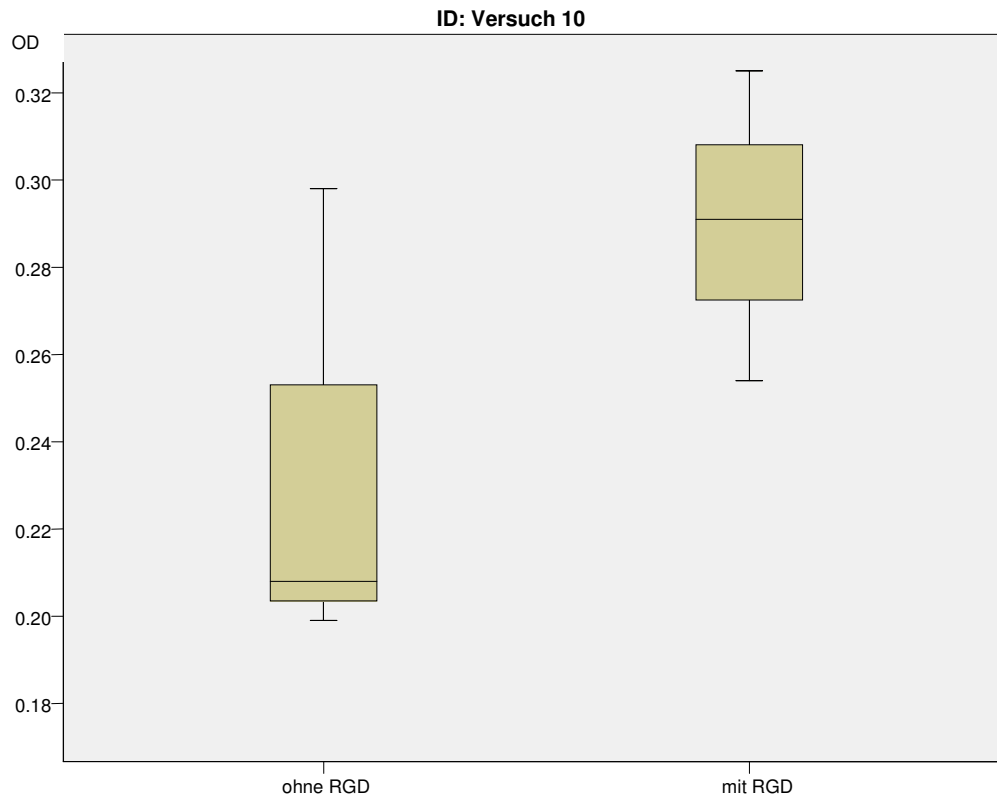
Auf den ultraschallgereinigten Knochen ohne RGD adhäreren mit einem p-Wert von 0,109 tendenziell mehr Endothelzellen als auf Knochen mit RGD-Peptid.

Abbildung 19: Vergleich der Endothelzelladhäsion mit und ohne RGD-Beschichtung auf ultraschallgereinigten Knochen (Versuch 2)



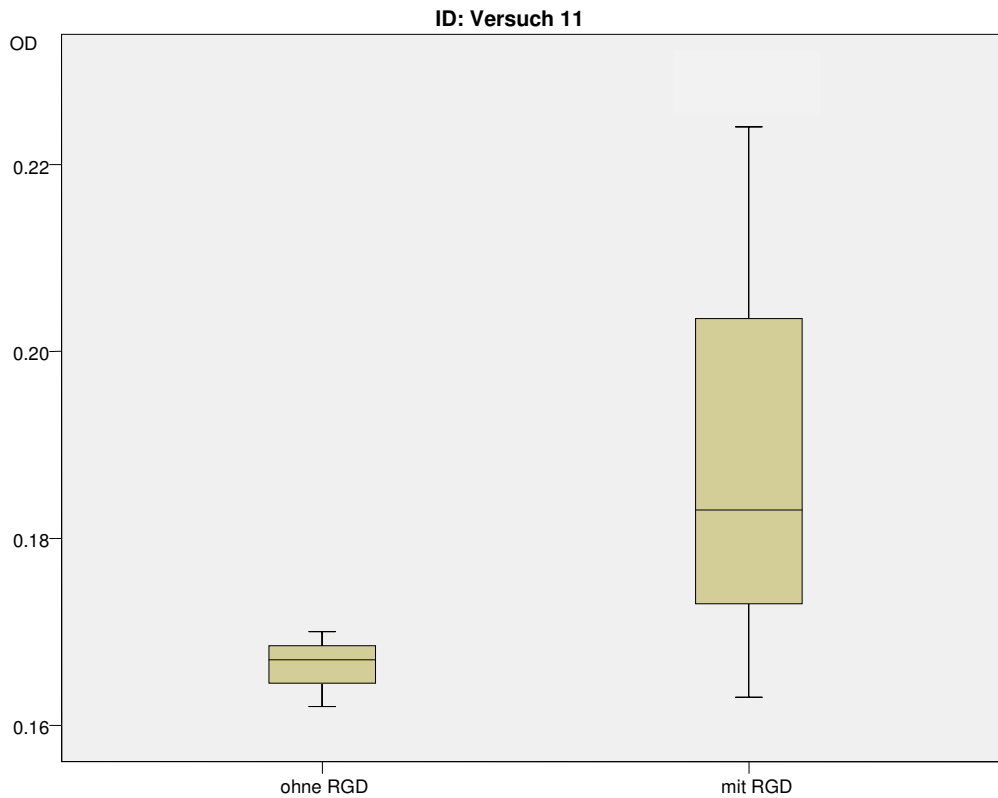
Im zweiten Versuch der Endothelzelladhäsion auf ultraschallgereinigten Knochenkuben zeigt sich bei einem p-Wert von 0,109 eine Tendenz zur Mehradhäsion auf den RGD-unbeschichteten Knochenstücken.

Abbildung 20: Vergleich der Endothelzelladhäsion mit und ohne RGD-Beschichtung auf ultraschallgereinigten Knochen (Versuch 10)



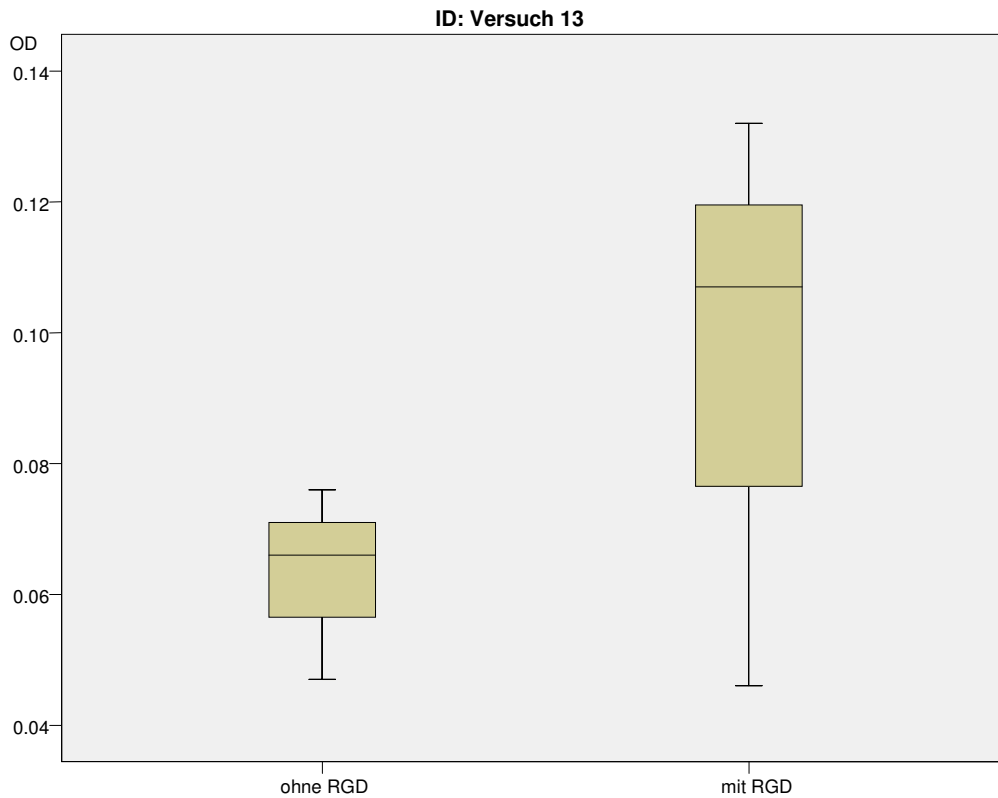
Bei einem weiteren Versuch auf ultraschallgereinigtem Knochen ist kein signifikanter Unterschied ($p=0,285$) zwischen RGD-beschichtetem und unbeschichtetem Knochen zu erkennen.

Abbildung 21: Vergleich der Endothelzelladhäsion mit und ohne RGD-Beschichtung auf ultraschallgereinigten Knochen (Versuch 11)



Mit einem p-Wert von 0,109 zeigt sich eine Tendenz zur Mehradhäsion von Endothelzellen auf RGD-beschichtetem, ultraschallgereinigten Knochen.

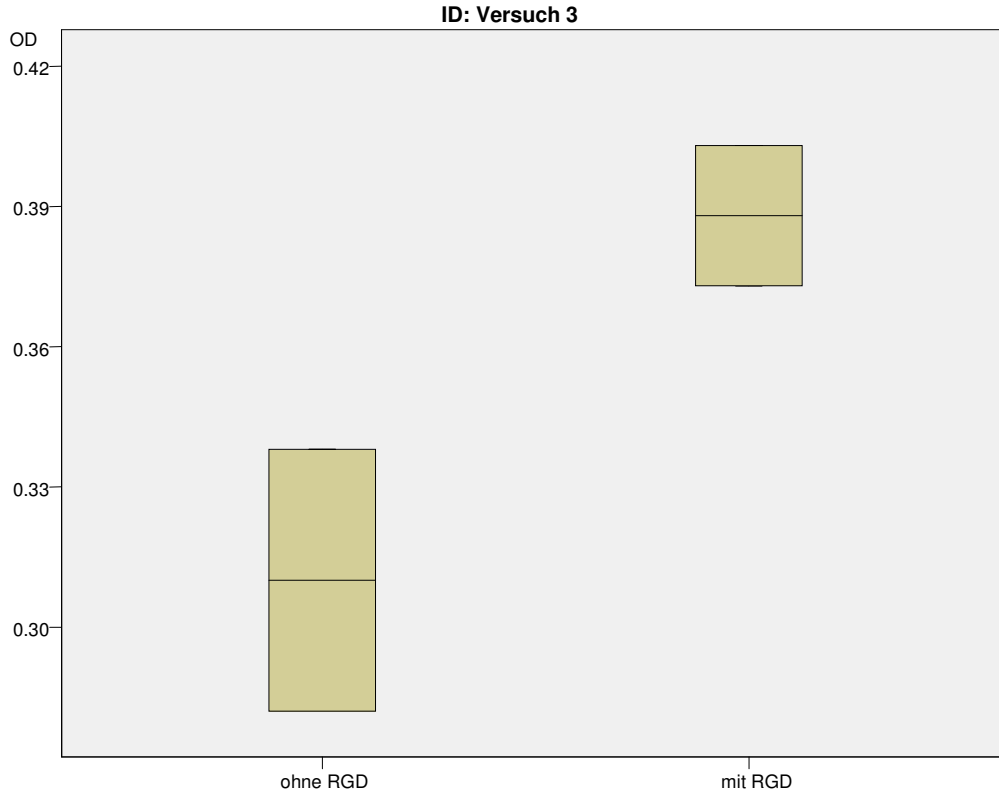
Abbildung 22: Vergleich der Endothelzelladhäsion mit und ohne RGD-Beschichtung auf ultraschallgereinigten Knochen (Versuch 13)



Aus einem weiteren Experiment, das die Adhäsion der Endothelzellen auf ultraschallgereinigten Knochen mit und ohne optionaler RGD-Beschichtung vergleicht, resultiert kein signifikanter Unterschied ($p=0,285$) zwischen den beiden Vergleichsgruppen.

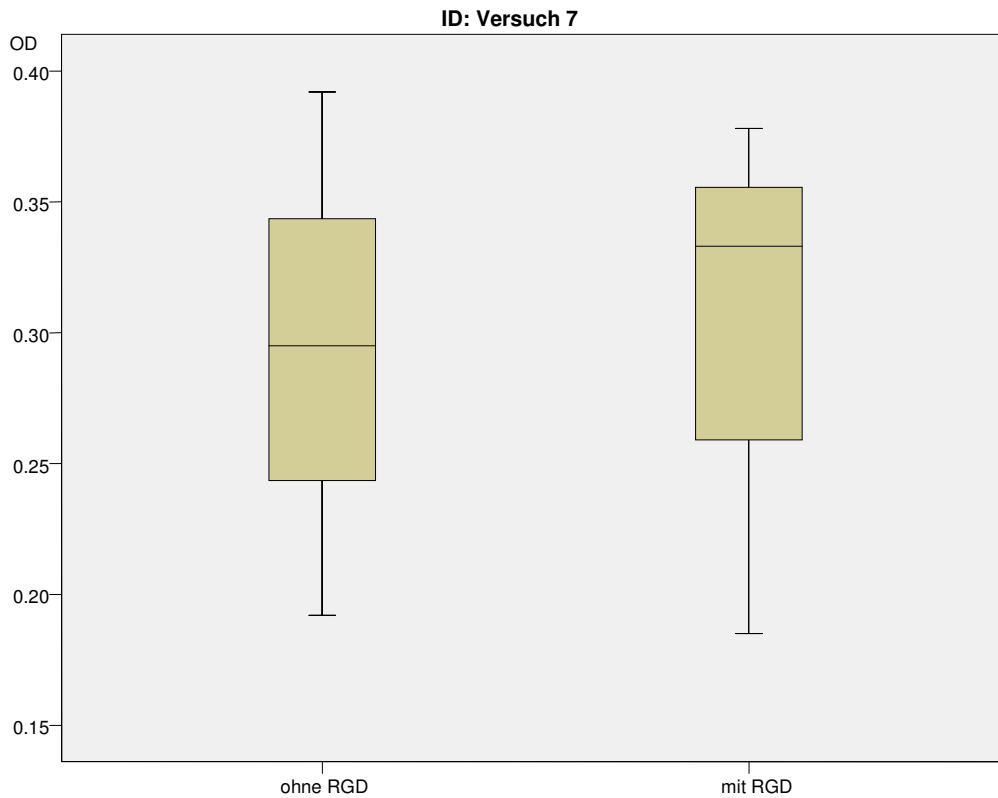
3.2.1.2 Aceton

Abbildung 23: Vergleich der Endothelzelladhäsion mit und ohne RGD-Beschichtung auf acetongereinigten Knochen (Versuch 3)



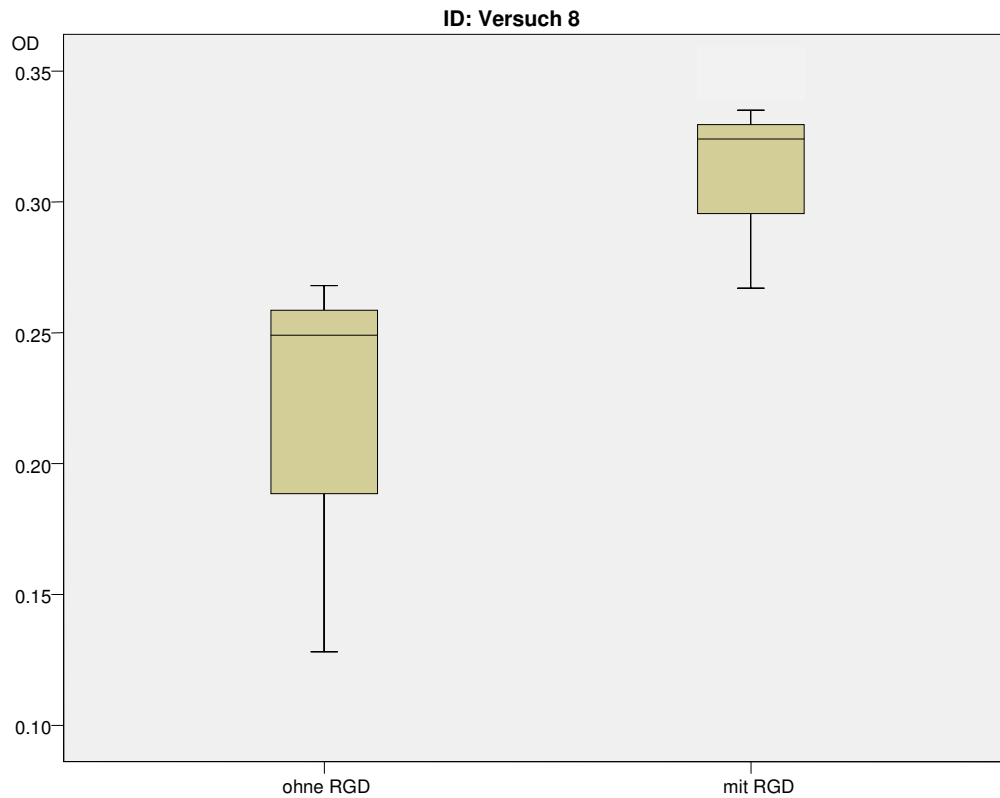
Bei gleichem Versuchsaufbau, jedoch unter Verwendung acetongereinigter Knochenkuben, ist kein tendenzieller Unterschied bzgl. der Adhäsionsfähigkeit von Endothelzellen auf RGD-beschichteten oder RGD-unbeschichteten Knochen zu erkennen. Der p-Wert liegt dabei bei 0,180.

Abbildung 24: Vergleich der Endothelzelladhäsion mit und ohne RGD-Beschichtung auf acetongereinigten Knochen (Versuch 7)



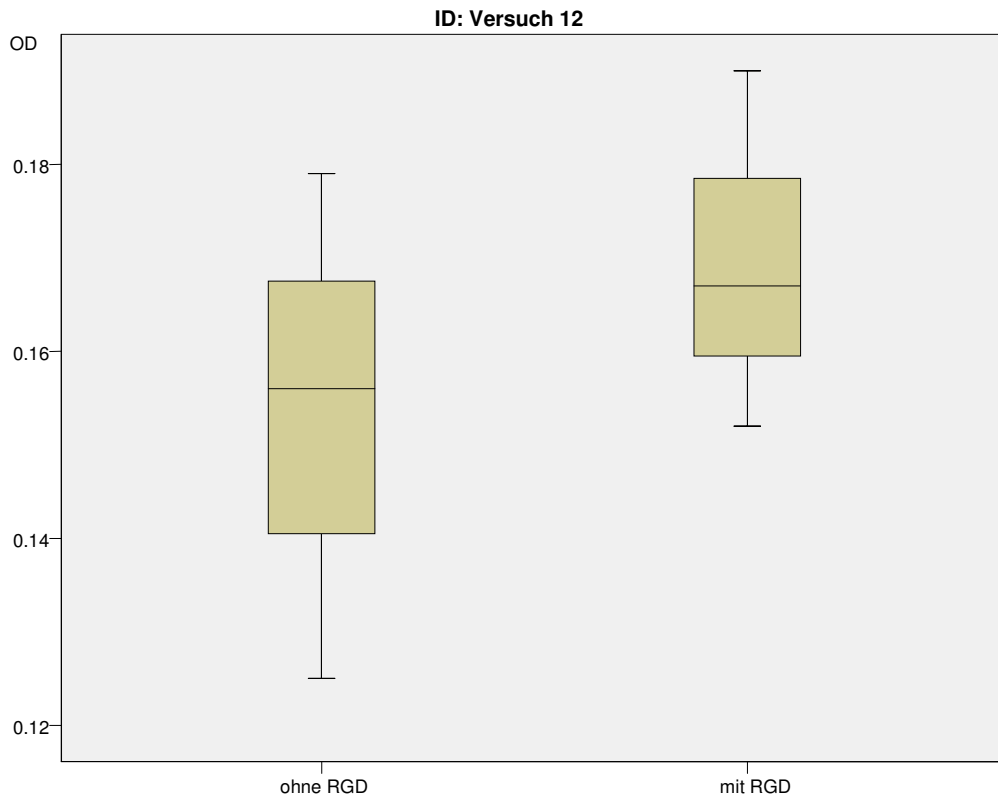
Bei dieser Testreihe zeigt sich bei einem p-Wert von 1,000 hinsichtlich der Endothelzelladhäsion kein statistischer Unterschied zwischen den beiden Testgruppen.

Abbildung 25: Vergleich der Endothelzelladhäsion mit und ohne RGD-Beschichtung auf acetongereinigten Knochen (Versuch 8)



Bei einem p-Wert von 0,109 ergibt sich eine statistische Tendenz zur vermehrten Adhäsion von Endothelzellen auf RGD-beschichtetem, ultraschallgereinigten Knochen.

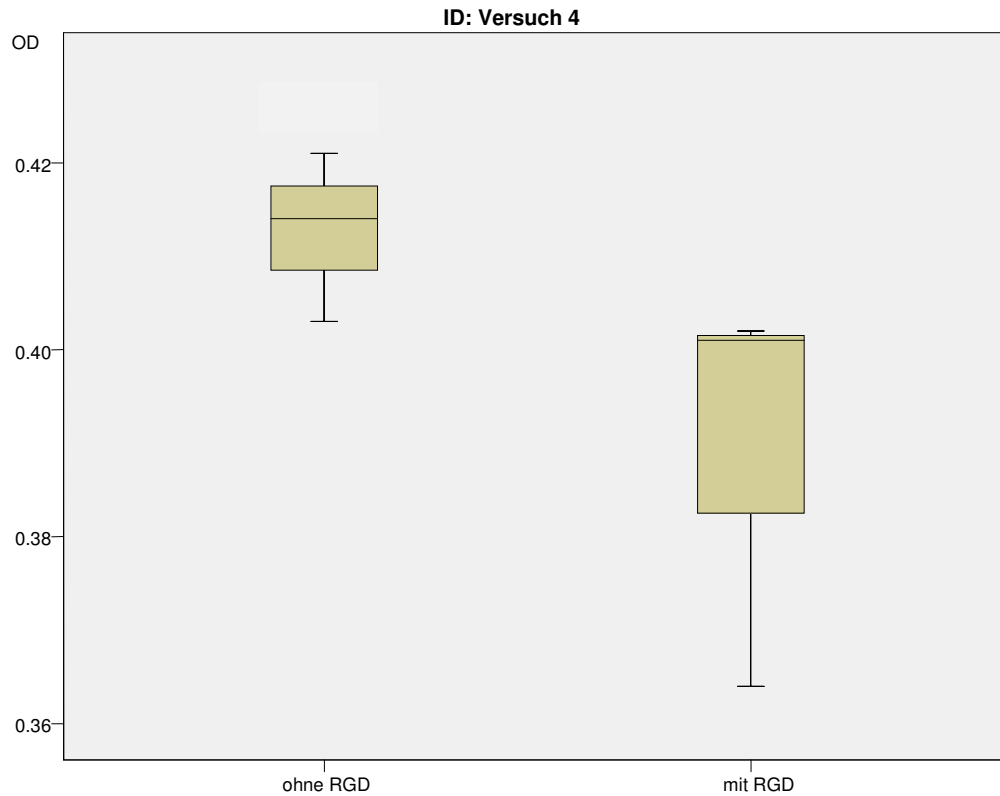
Abbildung 26: Vergleich der Endothelzelladhäsion mit und ohne RGD-Beschichtung auf acetongereinigten Knochen (Versuch 12)



Im Vergleich der Adhäsionsfähigkeit von Endothelzellen auf acetongereinigtem Knochen mit und ohne vorheriger RGD-Beschichtung ergibt sich mit einem p-Wert von $p=0,285$ kein signifikanter Unterschied zwischen den Vergleichsgruppen.

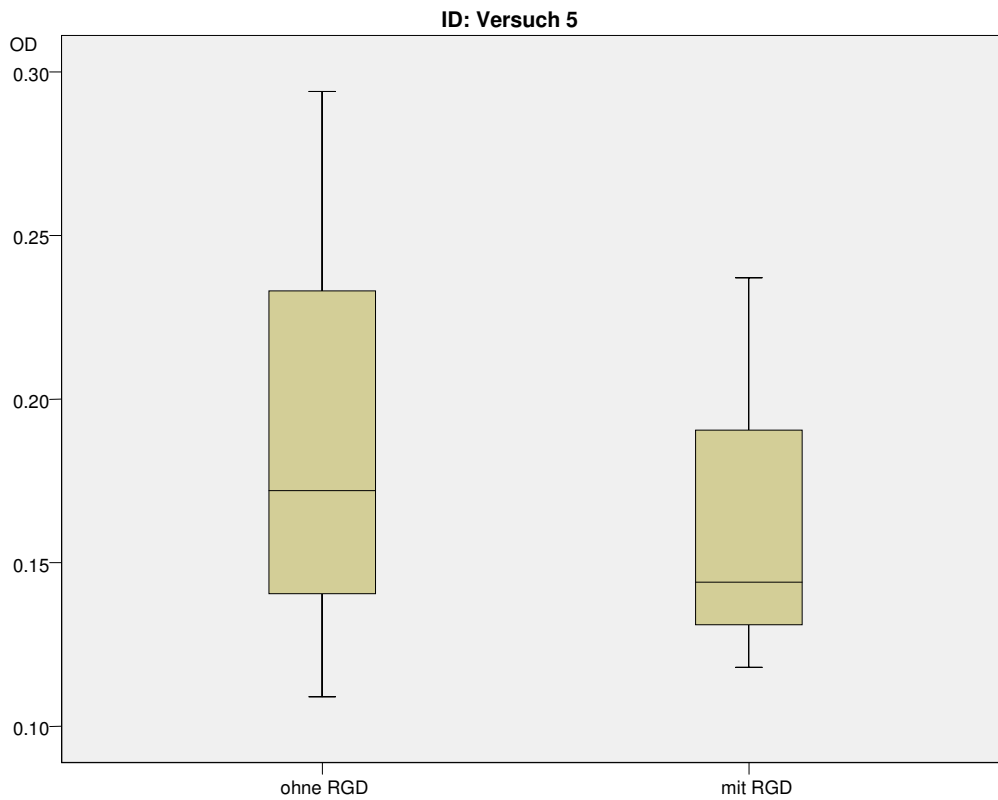
3.2.1.3 Nativ

Abbildung 27: Vergleich der Endothelzelladhäsion mit und ohne RGD-Beschichtung auf nativen Knochen (Versuch 4)



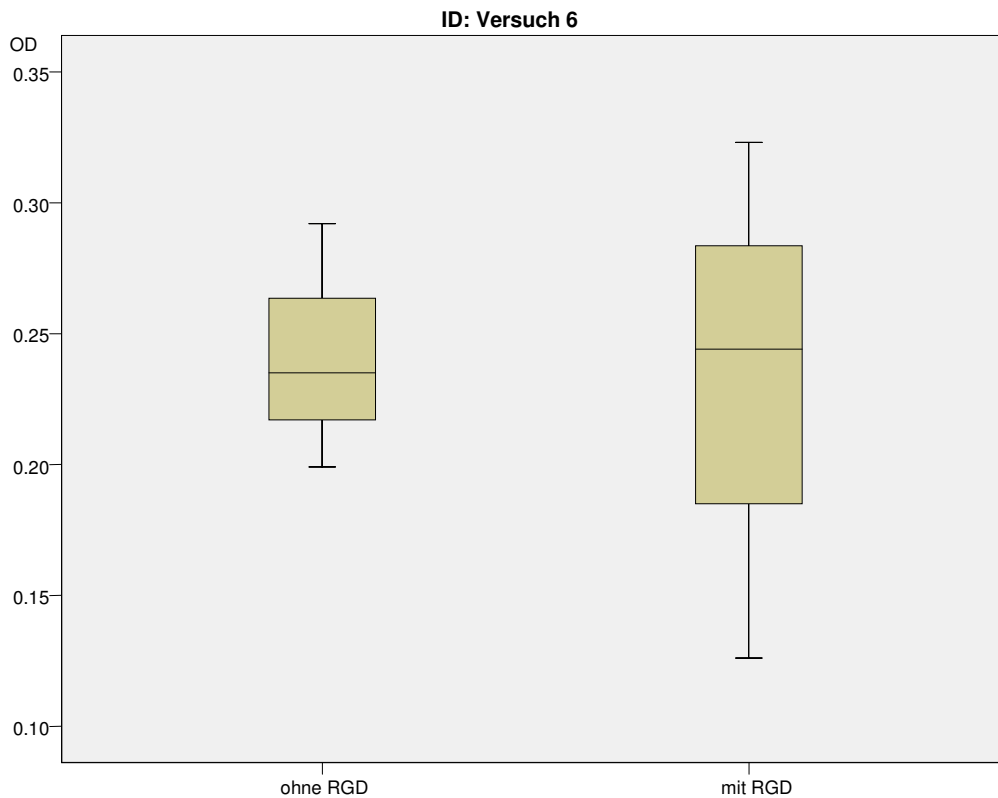
Bei der RGD-unbeschichteten Gruppe lässt sich eine Tendenz zur Mehradhäsion von Endothelzellen auf Nativknochen nachweisen. Der p-Wert beträgt dabei 0,109.

Abbildung 28: Vergleich der Endothelzelladhäsion mit und ohne RGD-Beschichtung auf nativen Knochen (Versuch 5)



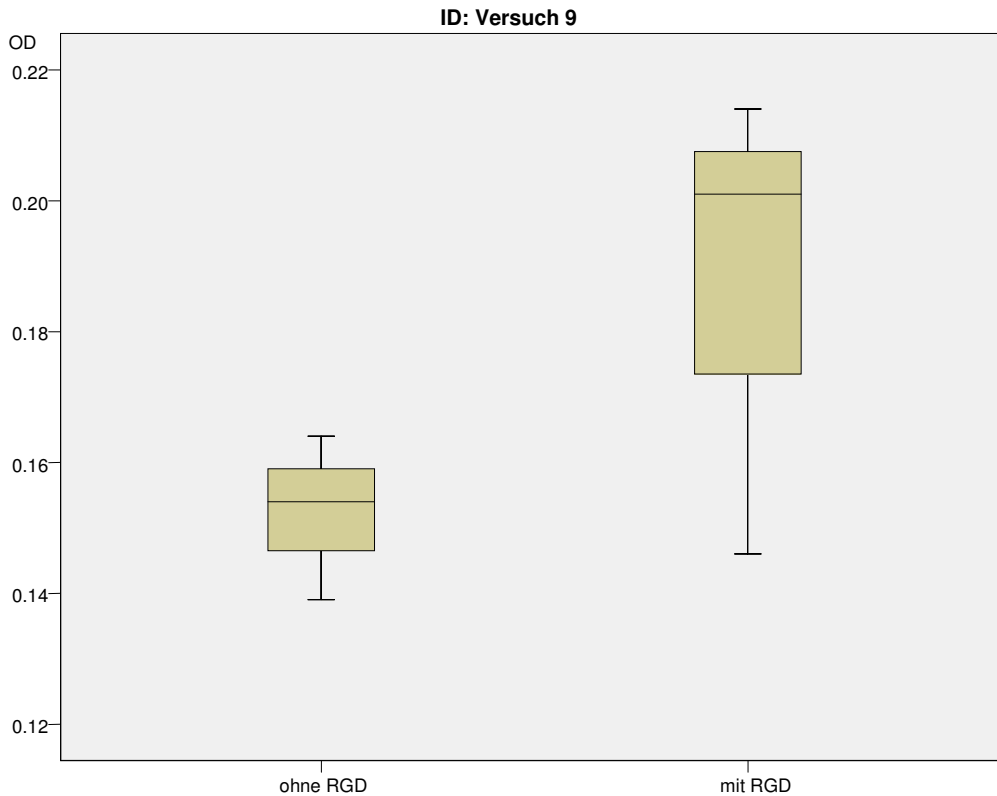
Es lässt sich kein Unterschied betreffend der Endothelzelladhäsion zwischen den beiden Vergleichsgruppen erkennen ($p=1,000$).

Abbildung 29: Vergleich der Endothelzelladhäsion mit und ohne RGD-Beschichtung auf nativen Knochen (Versuch 6)



Signifikante Endothelzelladhäsionsunterschiede lassen sich bei einem p-Wert von 1,000 bei den untersuchten Gruppen RGD-beschichteter und unbeschichteter laborgereinigter Knochen nicht finden.

Abbildung 30: Vergleich der Endothelzelladhäsion mit und ohne RGD-Beschichtung auf nativen Knochen (Versuch 9)



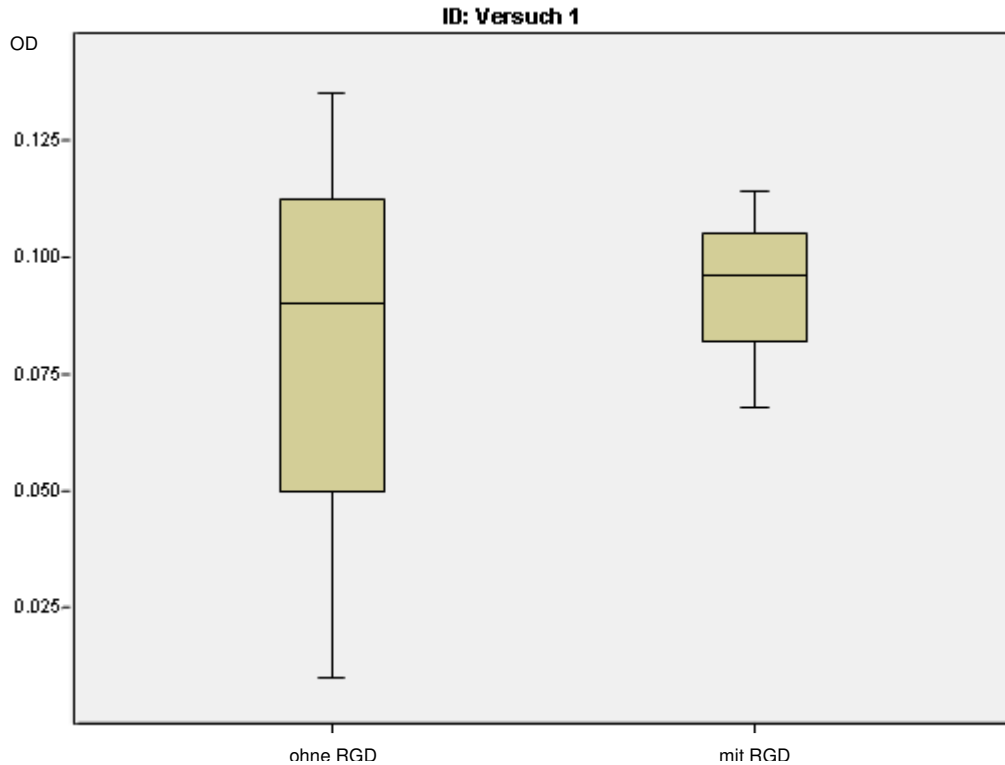
Bei einem p-Wert von $p=0,285$ zeigt sich eine Mehradhäsion von Endothelzellen auf RGD-beschichtetem Knochen, die jedoch weder Signifikanz noch Tendenz aufweist.

3.2.2 Endothelzellproliferation der Einzelversuche

Analog zur Adhäsion wurden Proliferationsversuche durchgeführt, indem die beschichteten Knochenkuben entsprechend des Protokolls für Proliferation unter 2.2.4.2 für sechs Tage mit Nährmedium inkubiert worden waren, bevor die Endothelzellproliferation auf den unterschiedlich vorgereinigten und mit RGD-beschichteten Knochen bzw. RGD-unbeschichteten Knochen der Vergleichsgruppe mittels Hexosaminidase-Assay gemessen wurde.

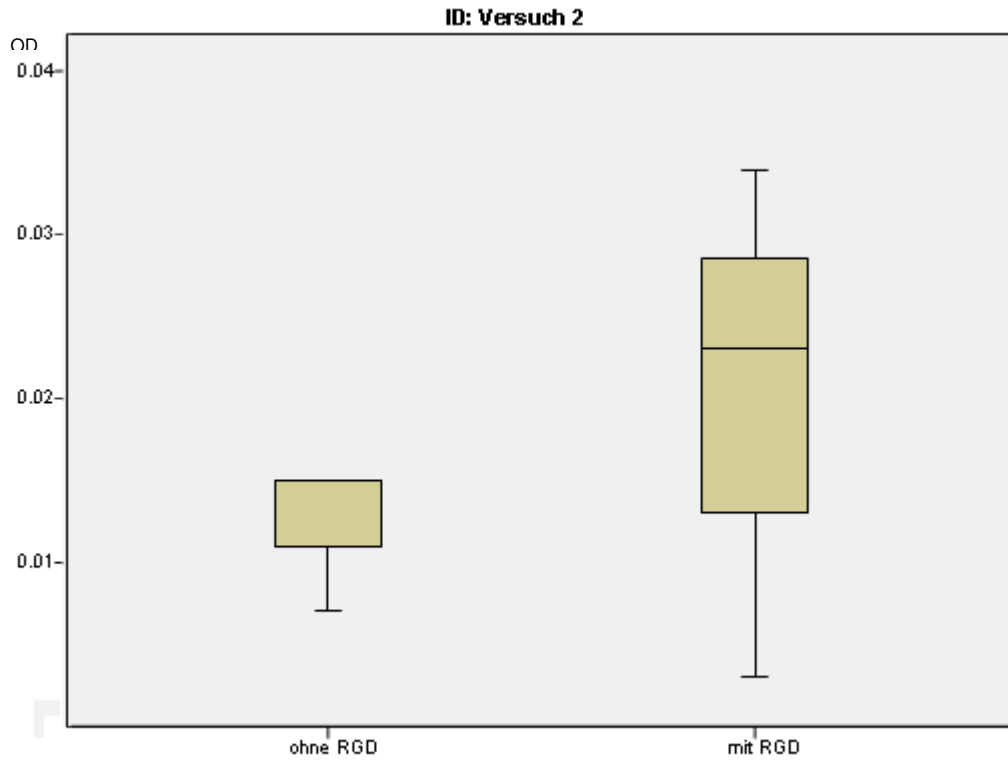
3.2.2.1 Ultraschall

Abbildung 31: Vergleich der Endothelzellproliferation mit und ohne RGD-Beschichtung auf ultraschallgereinigten Knochen (Versuch 1)



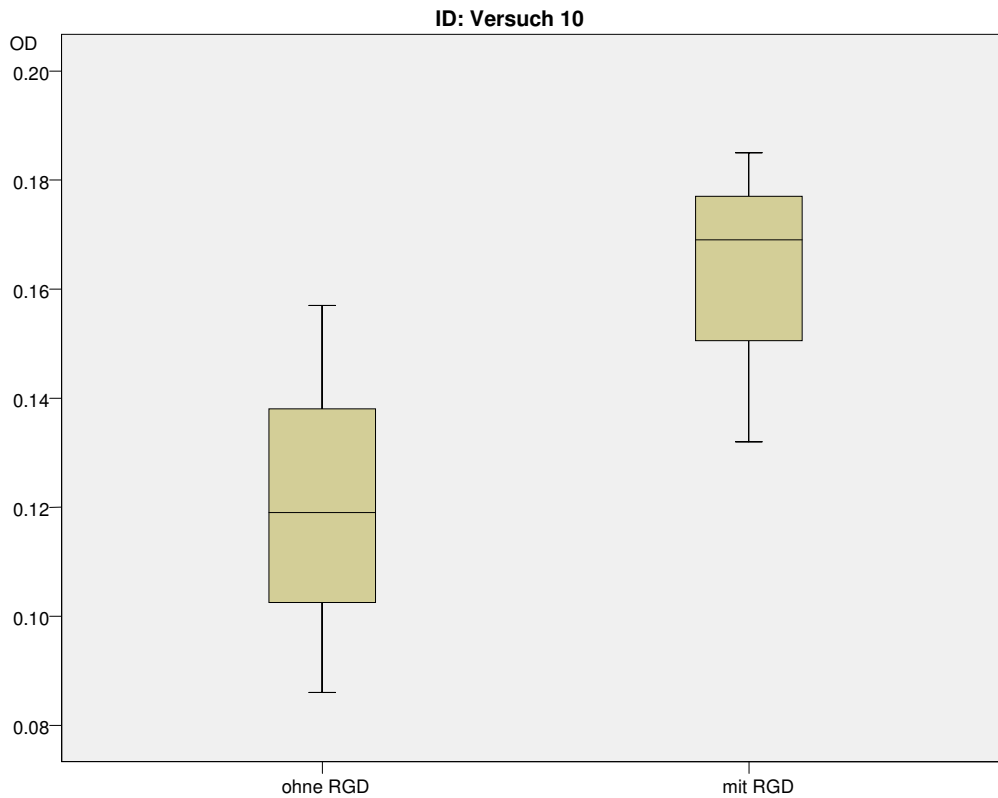
Untersucht wurde die unterschiedliche Proliferationsfähigkeit von Endothelzellen auf ultraschallgereinigtem Knochen mit und ohne zusätzlicher RGD-Beschichtung. Bei einem p-Wert von $p=0,593$ lässt sich dafür kein wesentlicher Unterschied zwischen den beiden Versuchsgruppen erkennen.

Abbildung 32: Vergleich der Endothelzellproliferation mit und ohne RGD-Beschichtung auf ultraschallgereinigten Knochen (Versuch 2)



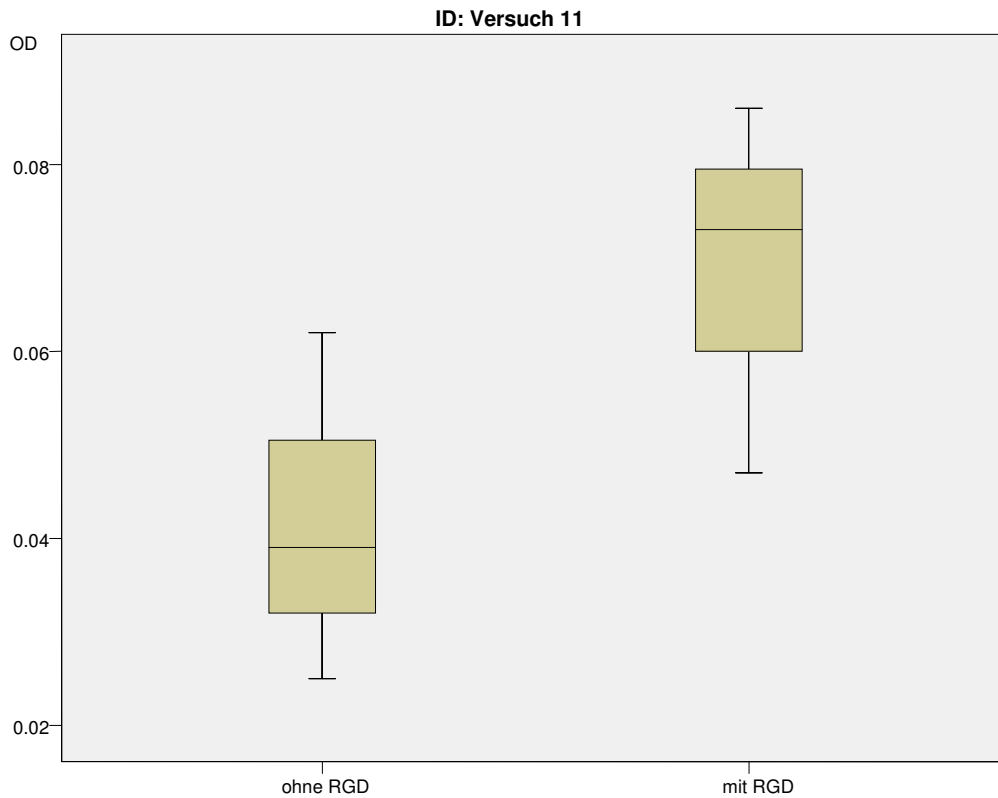
In einem weiteren Versuch unter gleichen, standardisierten Bedingungen findet sich bei den ultraschallgereinigten Knochenstücken kein signifikanter Unterschied der Endothelzellproliferation zwischen RGD-beschichtetem und RGD-unbeschichtetem Knochen ($p=0,285$).

Abbildung 33: Vergleich der Endothelzellproliferation mit und ohne RGD-Beschichtung auf ultraschallgereinigten Knochen (Versuch 10)



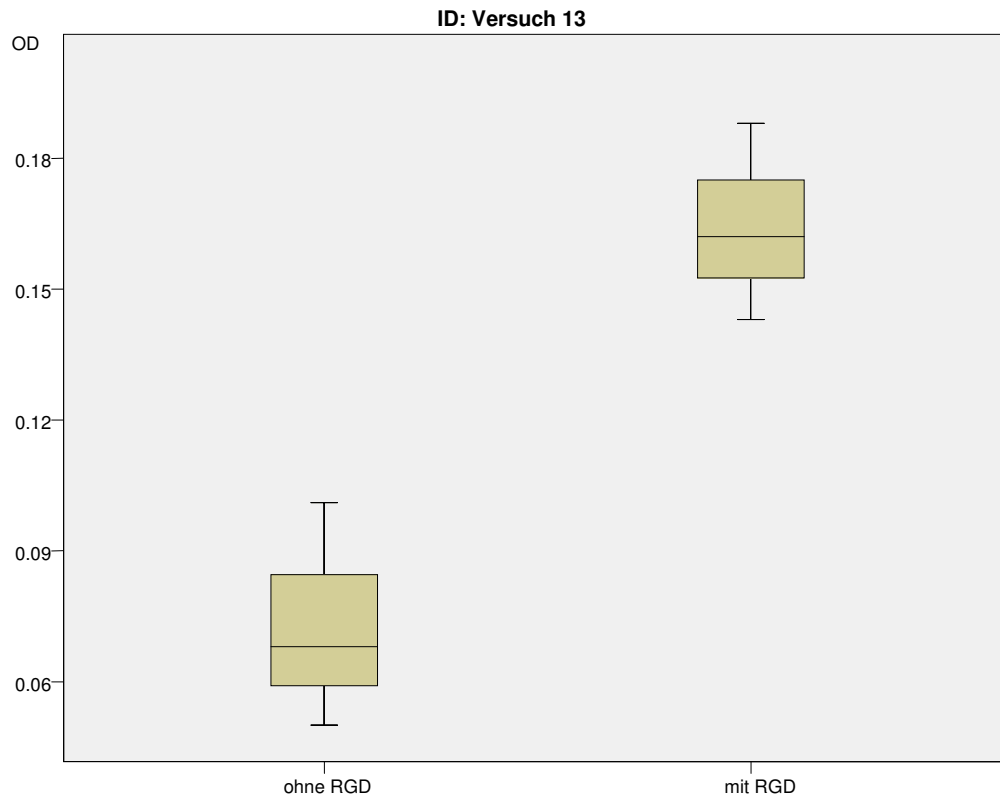
In diesem Experiment lässt sich mit einem p-Wert von $p=0,109$ eine Tendenz zur Mehrproliferation von Endothelzellen auf dem zusätzlich mit RGD-beschichtetem Knochen nachweisen.

Abbildung 34: Vergleich der Endothelzellproliferation mit und ohne RGD-Beschichtung auf ultraschallgereinigten Knochen (Versuch 11)



Der Versuch zeigt mit $p=0,285$ statistisch keine signifikante oder tendenzielle Ungleichheit betreffend der Endothelzellproliferation auf den Knochenproben.

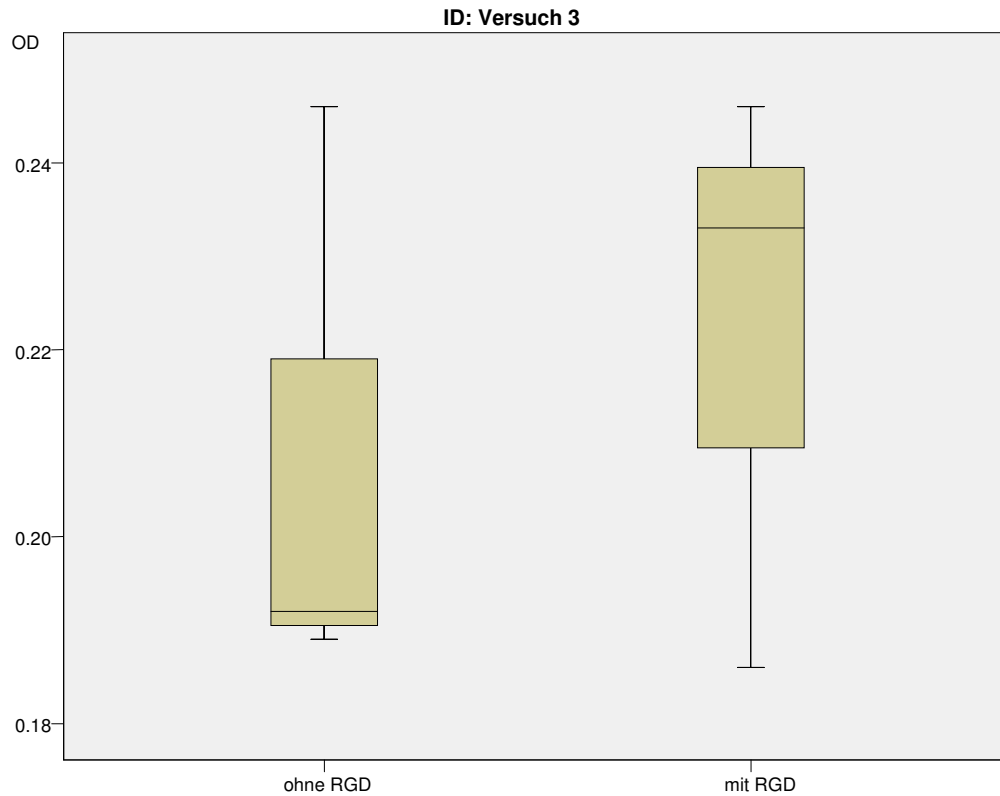
Abbildung 35: Vergleich der Endothelzellproliferation mit und ohne RGD-Beschichtung auf ultraschallgereinigten Knochen (Versuch 13)



Im Gegensatz zu RGD-beschichtetem Knochen lässt sich mit $p=0,109$ eine Tendenz zur geringeren Endothelzellproliferation auf RGD-unbeschichtetem, ultraschallgereinigtem Knochenwürfel erkennen.

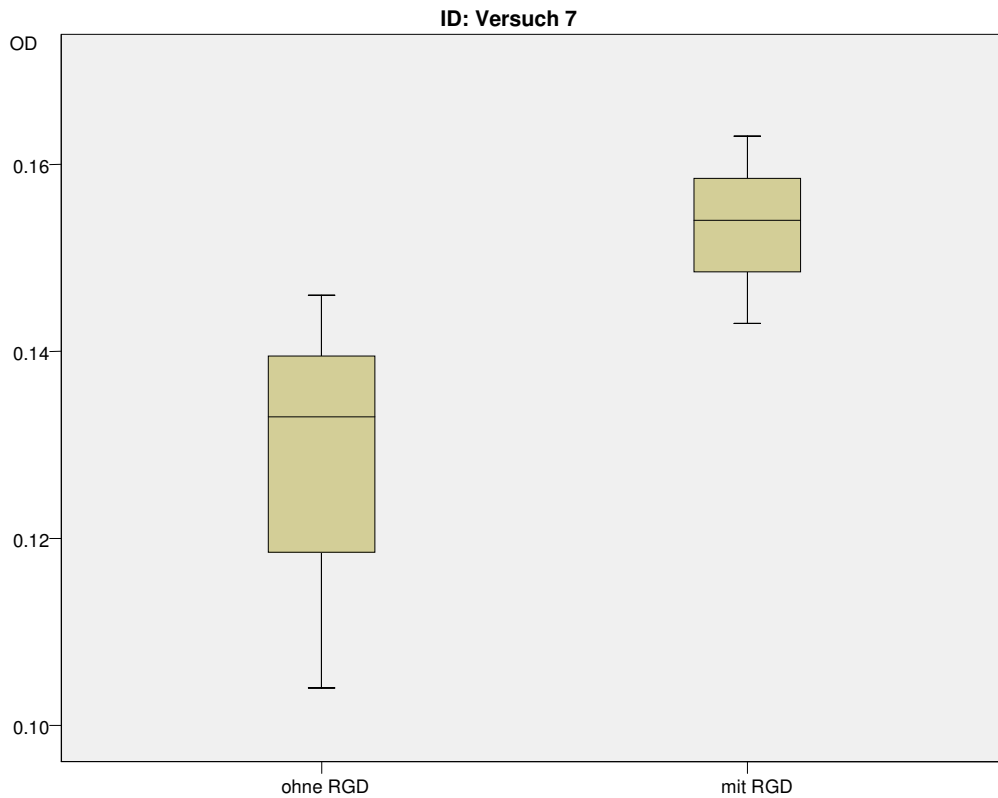
3.2.2.2 Aceton

Abbildung 36: Vergleich der Endothelzellproliferation mit und ohne RGD-Beschichtung auf acetongereinigten Knochen (Versuch 3)



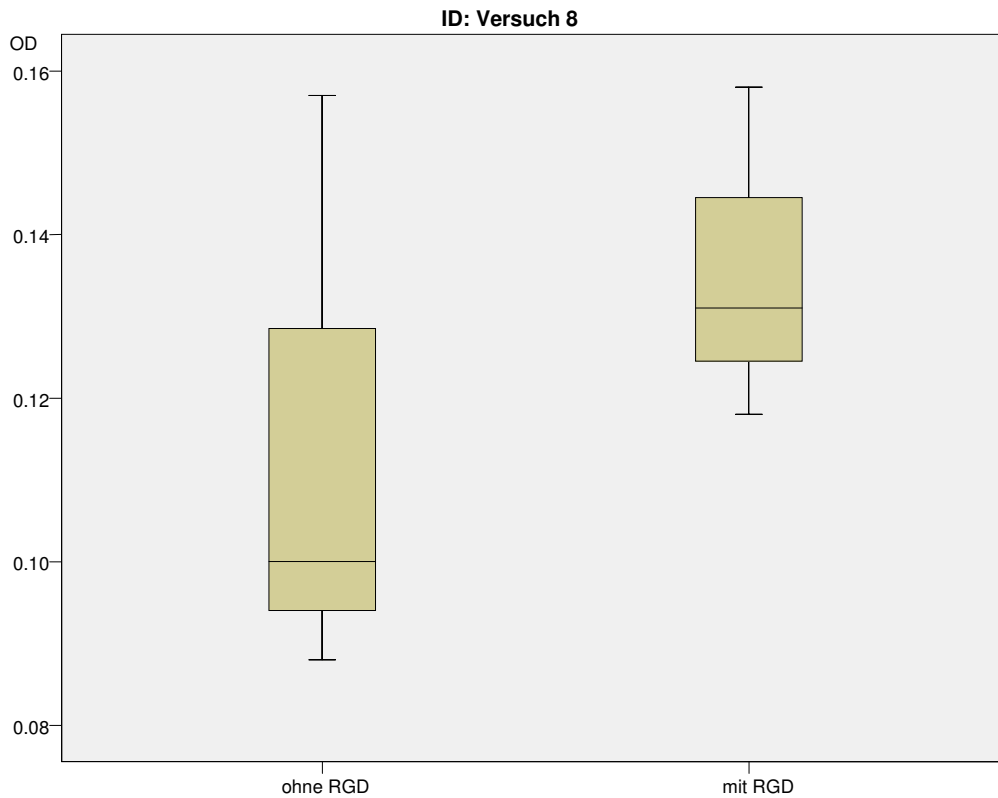
Im Hinblick auf die Endothelzellproliferation auf acetongereinigtem Knochen besteht kein signifikanter Unterschied, ob die Knochenwürfel zusätzlich mit RGD-Peptiden beimpft wurden oder nicht. Der p-Wert liegt bei $p=1,000$.

Abbildung 37: Vergleich der Endothelzellproliferation mit und ohne RGD-Beschichtung auf acetongereinigten Knochen (Versuch 7)



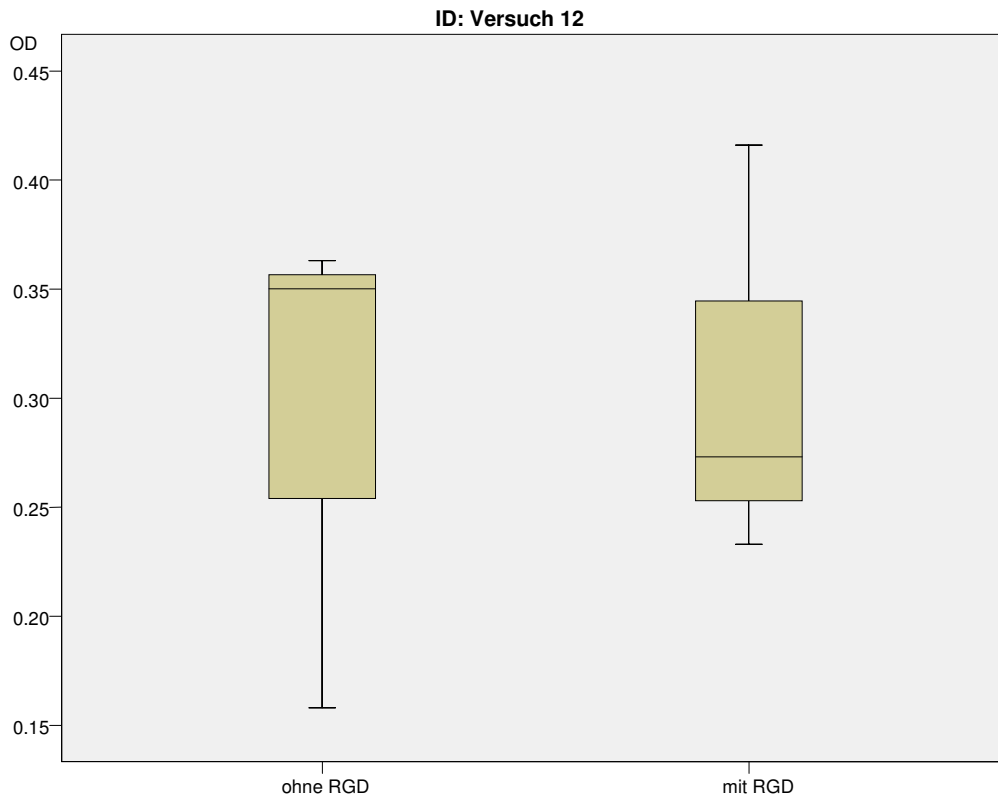
Obwohl bei diesem Experiment durch die RGD-Beschichtung mehr Endothelzellen auf acetongereinigtem Knochen proliferieren, besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den Vergleichsgruppen ($p=0,285$).

Abbildung 38: Vergleich der Endothelzellproliferation mit und ohne RGD-Beschichtung auf acetongereinigten Knochen (Versuch 8)



Mit einem p-Wert von $p=0,109$ besteht die Tendenz, dass durch die RGD-Beschichtung mehr Endothelzellen auf den acetongereinigten Knochenstückchen proliferieren als auf den RGD-unbeschichteten.

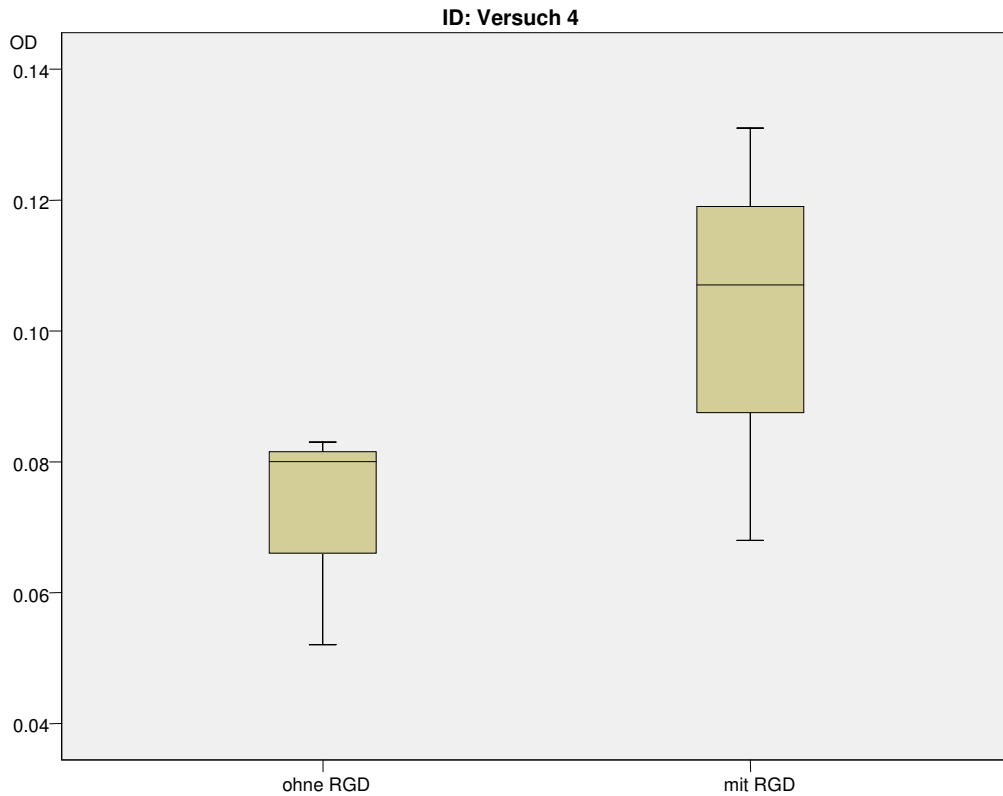
Abbildung 39: Vergleich der Endothelzellproliferation mit und ohne RGD-Beschichtung auf acetongereinigten Knochen (Versuch 12)



Mit $p=1,000$ zeigen sich bezüglich der Proliferation auf RGD-beschichtetem und -unbeschichtetem Knochen keine statistischen Unterschiede.

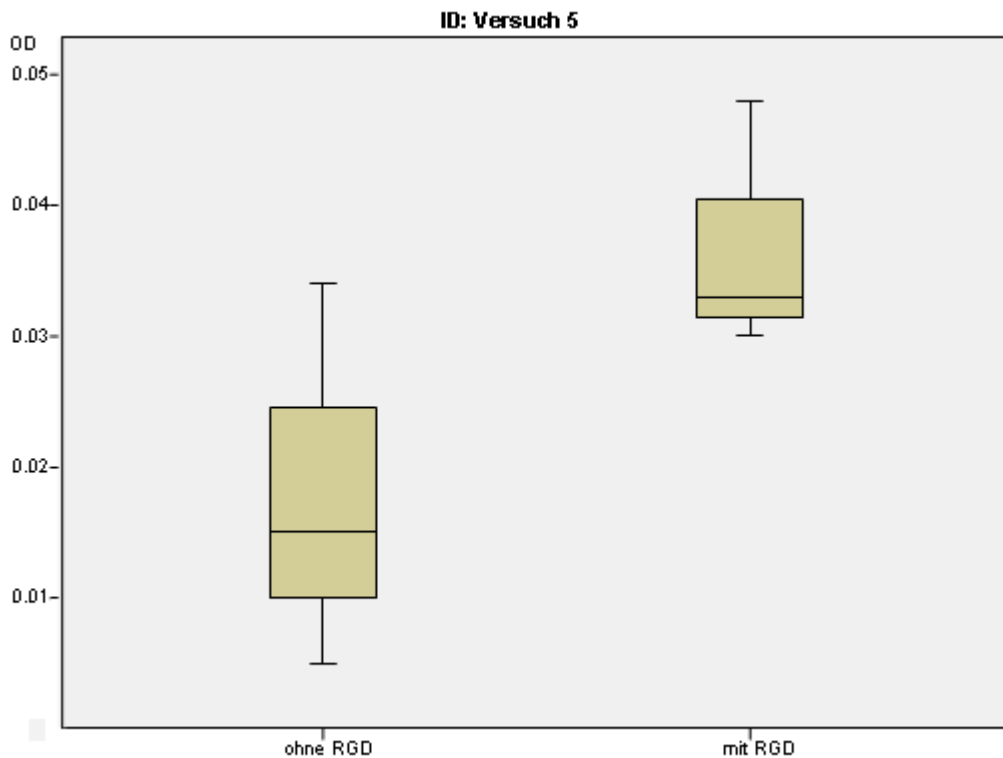
3.2.2.3 Nativ

Abbildung 40: Vergleich der Endothelzellproliferation mit und ohne RGD-Beschichtung auf nativen Knochen (Versuch 4)



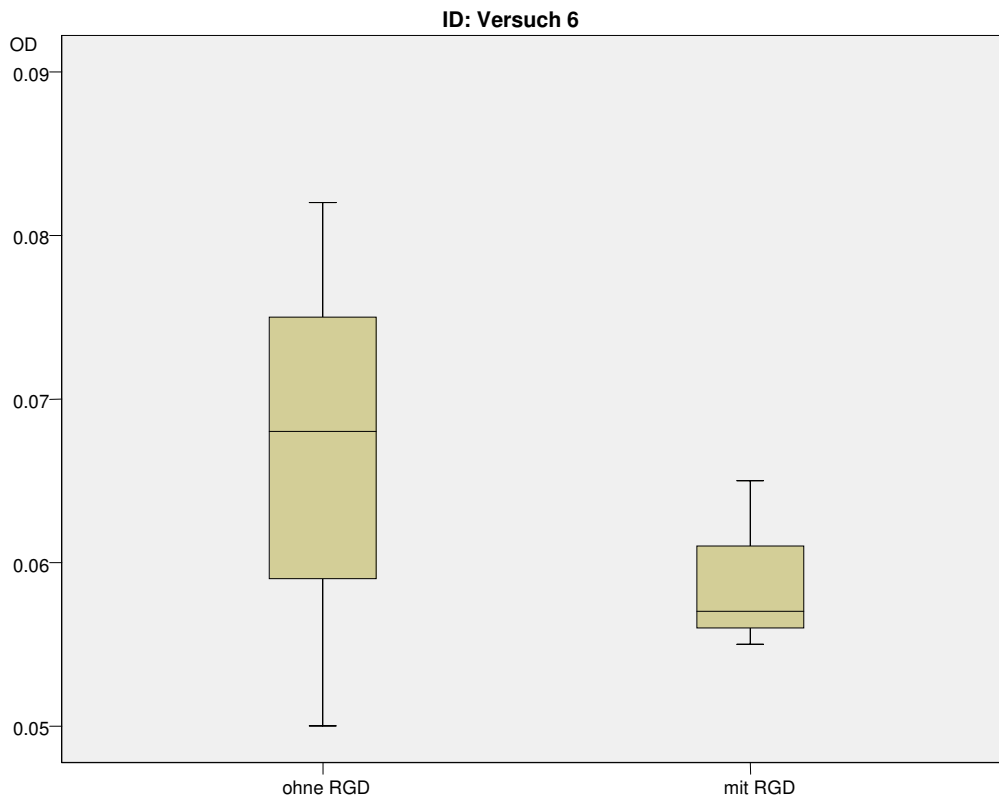
Statistisch gesehen präsentiert sich auf Knochen der Nativgruppe die Tendenz ($p=0,109$) einer vermehrten Proliferation zusätzlich mit RGD-beschichteter Knochen gegenüber den unbeschichteten.

Abbildung 41: Vergleich der Endothelzellproliferation mit und ohne RGD-Beschichtung auf nativen Knochen (Versuch 5)



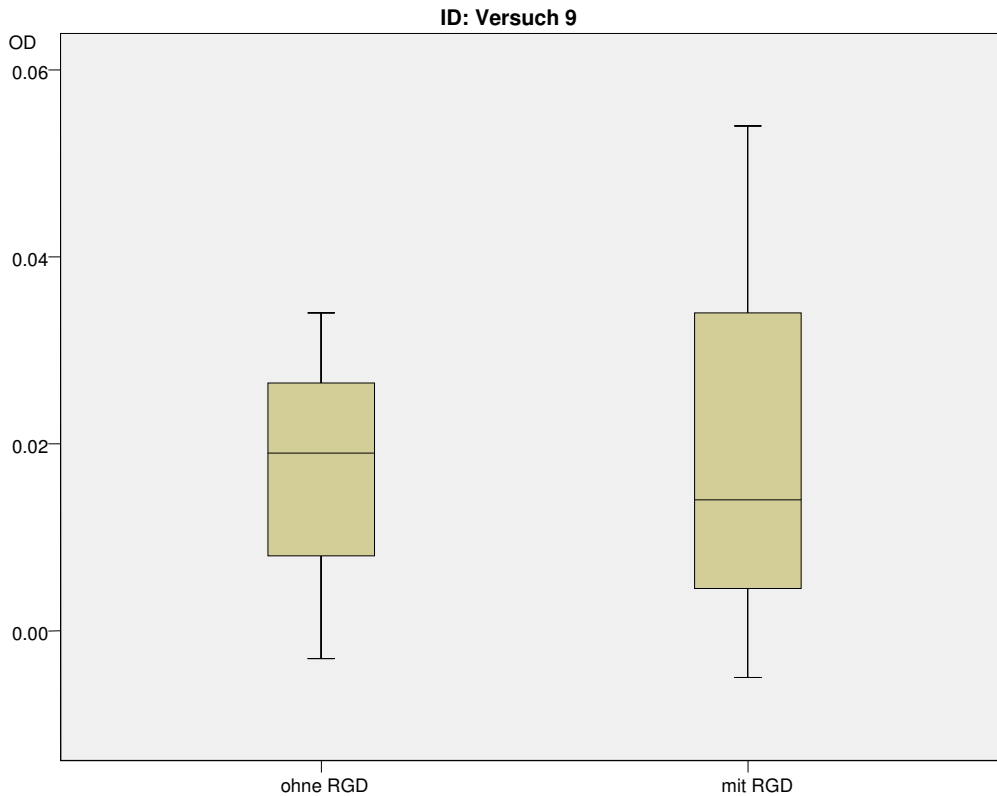
Bei einem weiteren Proliferationsversuch auf Knochen der Nativgruppe kann gemessen werden, dass zwar durch die zusätzliche RGD-Beschichtung mehr Endothelzellen proliferieren, eine statistische Signifikanz oder Tendenz ($p=0,285$) jedoch nicht vorliegt.

Abbildung 42: Vergleich der Endothelzellproliferation mit und ohne RGD-Beschichtung auf nativen Knochen (Versuch 6)



In diesem Versuch zeigt sich kein signifikanter Unterschied der beiden Versuchsreihen RGD-beschichteter und RGD-unbeschichteter Knochen. Der statistische p-Wert beträgt 0,593.

Abbildung 43: Vergleich der Endothelzellproliferation mit und ohne RGD-Beschichtung auf nativen Knochen (Versuch 9)



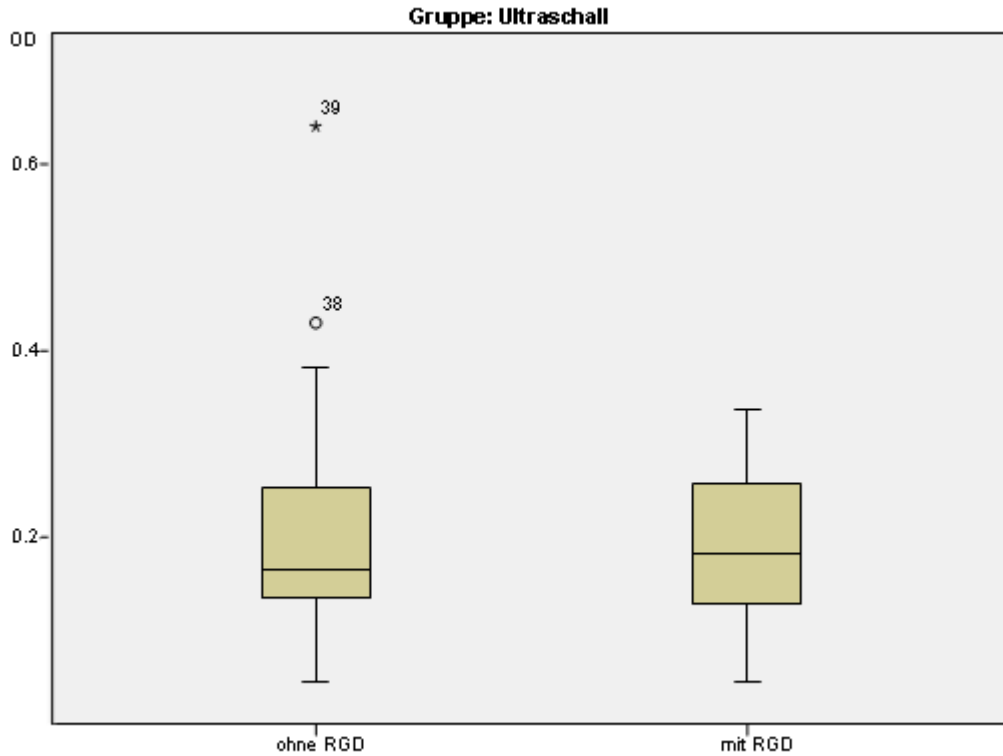
Zwischen den beiden Vergleichsgruppen lässt sich kein Unterschied feststellen. Ob der gereinigte Knochen zusätzlich mit RGD beschichtet wird oder nicht, ist hier bzgl. einer besseren Proliferationsrate von Endothelzellen mit $p=1,000$ statistisch gesehen nicht relevant.

3.2.3 Zusammenfassung Endothelzelladhäsion

Im Folgenden werden alle Einzelversuche der jeweiligen Knochenreinigungsgruppe aus 3.2.1 zusammengefasst und die Adhäsionsunterschiede der jeweiligen Reinigungsgruppe mit und ohne RGD-Beschichtung statistisch erfasst. Die statistische Auswertung zu den Versuchen findet sich unter Punkt 7.1.3.4.

3.2.3.1 Ultraschall

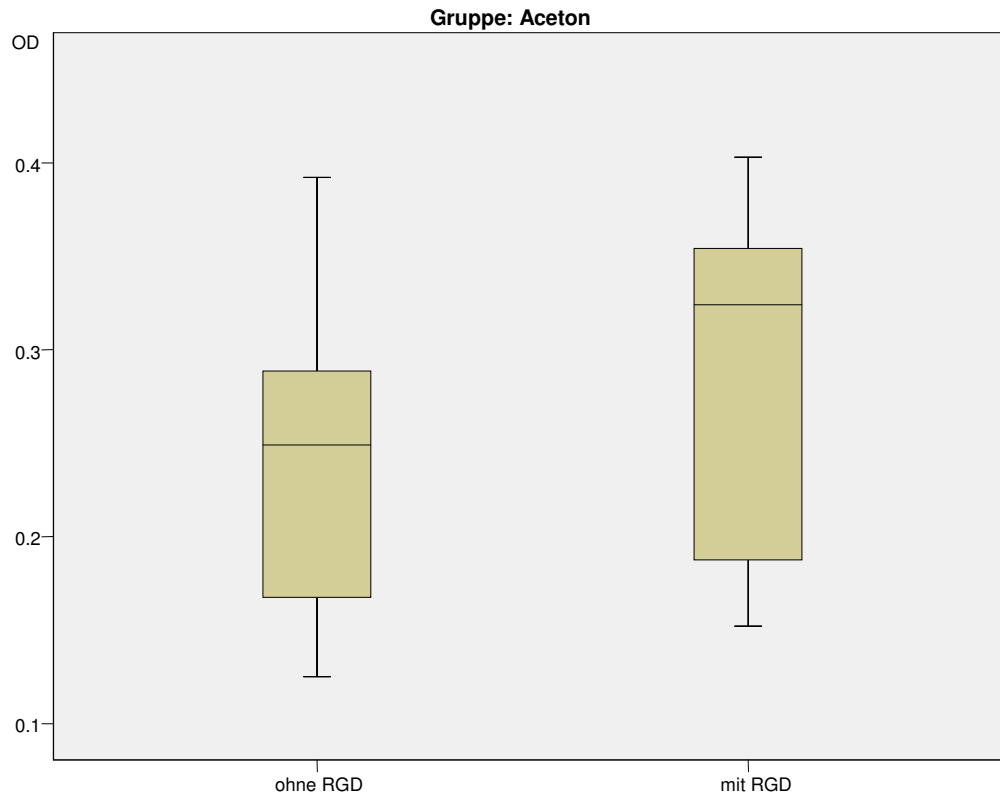
Abbildung 44: Zusammenfassung Endothelzelladhäsion mit und ohne RGD-Beschichtung auf ultraschallgereinigten Knochenkuben



Werden alle Einzelversuche der ultraschallgereinigten Knochenkuben zusammengefasst und die Endothelzelladhäsion auf Kuben mit und ohne RGD-Beschichtung verglichen, so lässt sich anhand der Grafik erkennen, dass es keine tendentiellen oder signifikanten Unterschiede zwischen beiden Gruppen gibt. Der p-Wert liegt bei 0,977.

3.2.3.2 Aceton

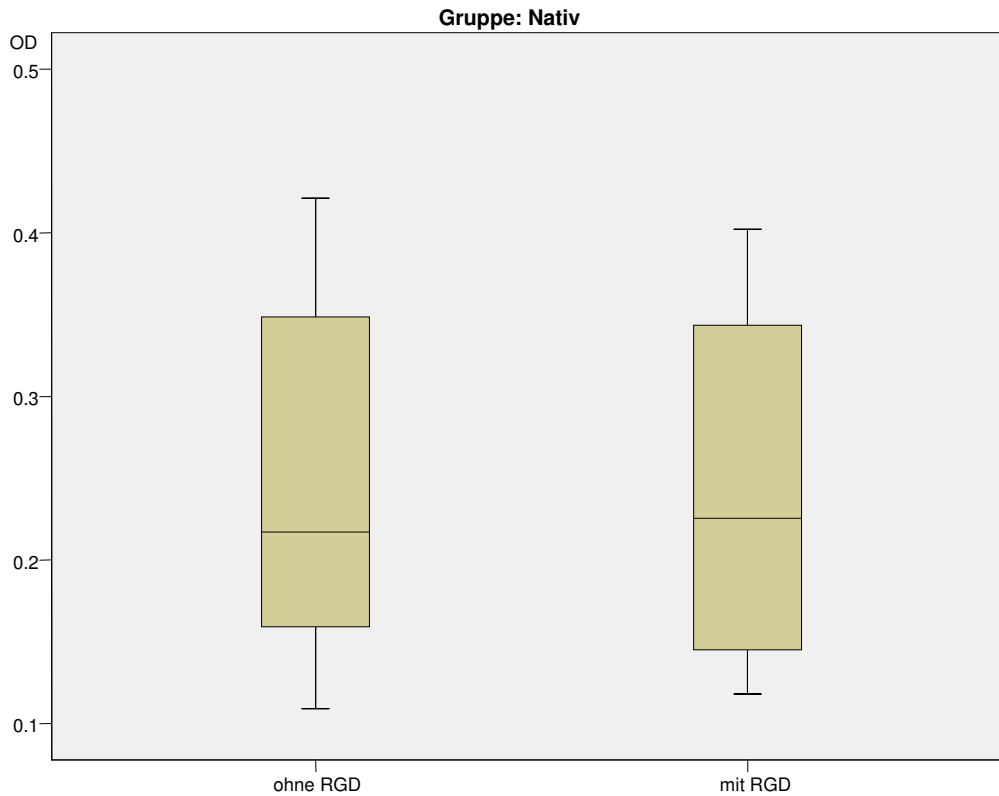
Abbildung 45: Zusammenfassung Endothelzelladhäsion mit und ohne RGD-Beschichtung auf acetongereinigten Knochenkuben



Bei acetongereinigten Knochenkuben lässt sich statistisch nachweisen, dass mit $p=0,062$ die Tendenz dazu besteht, dass mehr Endothelzellen auf dem Knochen adhäreren, wenn dieser zusätzlich mit dem RGD-Peptid beschichtet wird.

3.2.3.3 Nativ

Abbildung 46: Zusammenfassung Endothelzelladhäsion mit und ohne RGD-Beschichtung auf nativen Knochenkuben



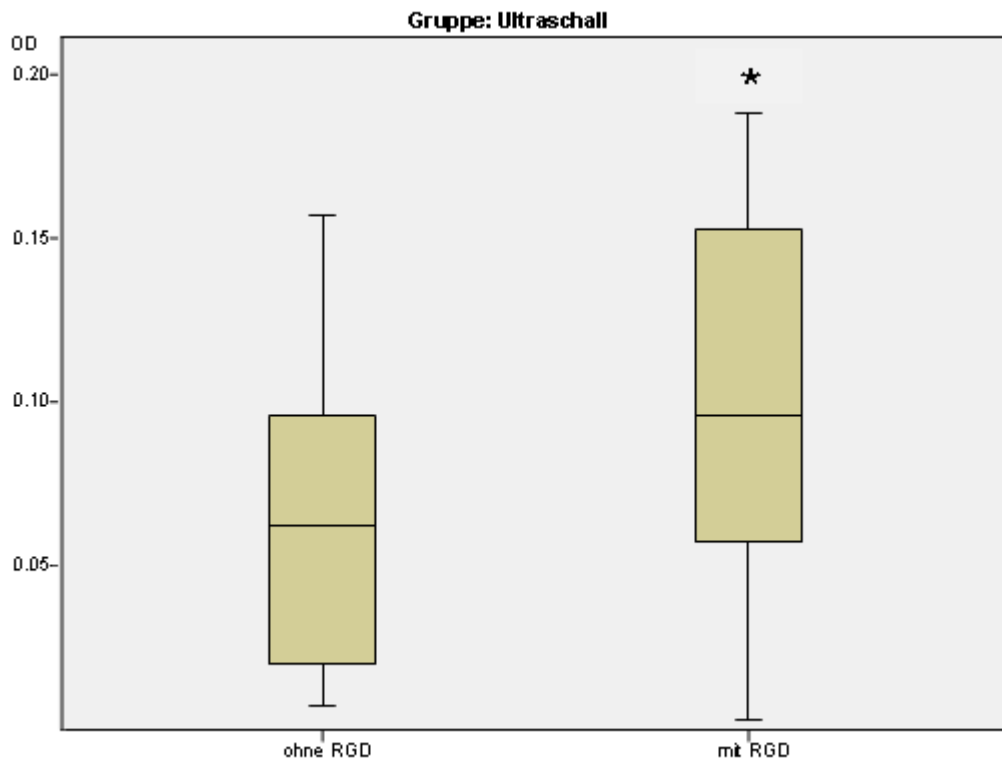
Bei der Nativgruppe lässt sich bezüglich der Adhäsionsfähigkeit von Endothelzellen unabhängig davon, ob der Knochen zusätzlich mit RGD-Peptid beimpft wurde oder nicht, kein tendenzieller Unterschied feststellen ($p=0,875$).

3.2.4 Zusammenfassung Endothelzellproliferation

Analog zur Adhäsion werden alle Einzelversuche der jeweiligen Knochenreinigungsgruppe aus 3.2.2 zusammengefasst und die Unterschiede hinsichtlich der Proliferation der jeweiligen Reinigungsgruppe mit und ohne RGD-Beschichtung statistisch erfasst. Die statistische Auswertung zu den Versuchen findet sich unter 7.1.3.4.

3.2.4.1 Ultraschall

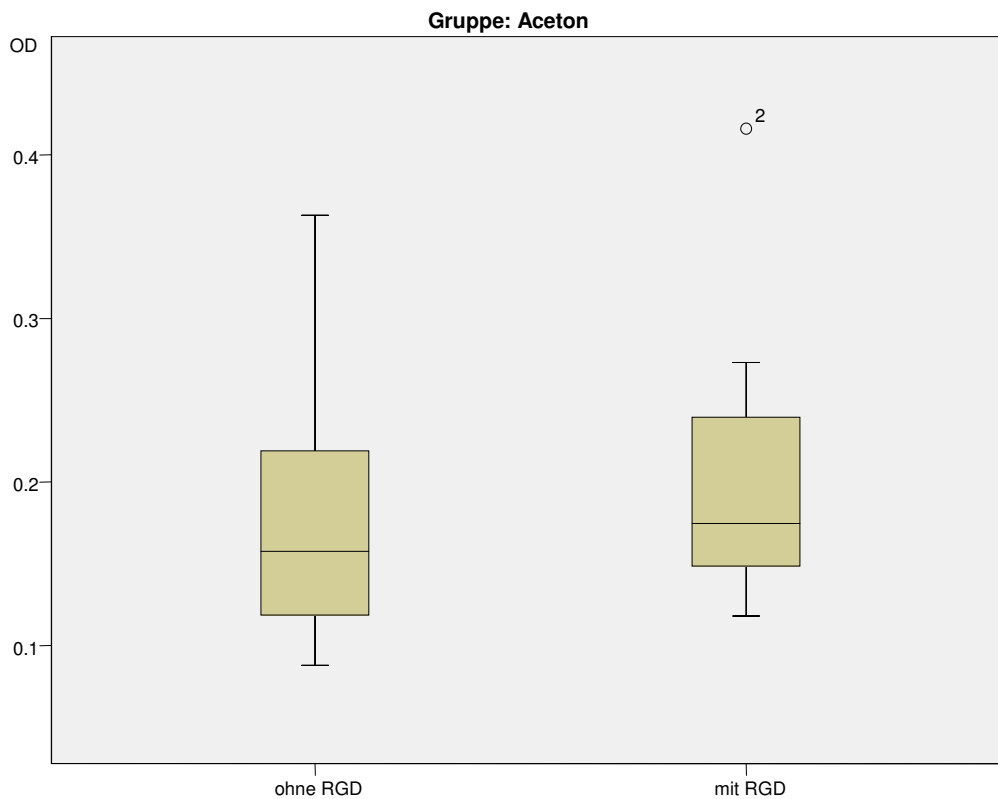
Abbildung 47: Zusammenfassung Endothelzellproliferation mit und ohne RGD-Beschichtung auf ultraschallgereinigten Knochenkuben



Die Proliferation der Endothelzellen auf ultraschallgereinigtem Knochen mit zusätzlicher RGD-Peptidbeschichtung ist nach sechs Tagen mit $p=0,006$ statistisch signifikant höher als auf der Vergleichsgruppe ohne zusätzliche Peptidbeschichtung.

3.2.4.2 Aceton

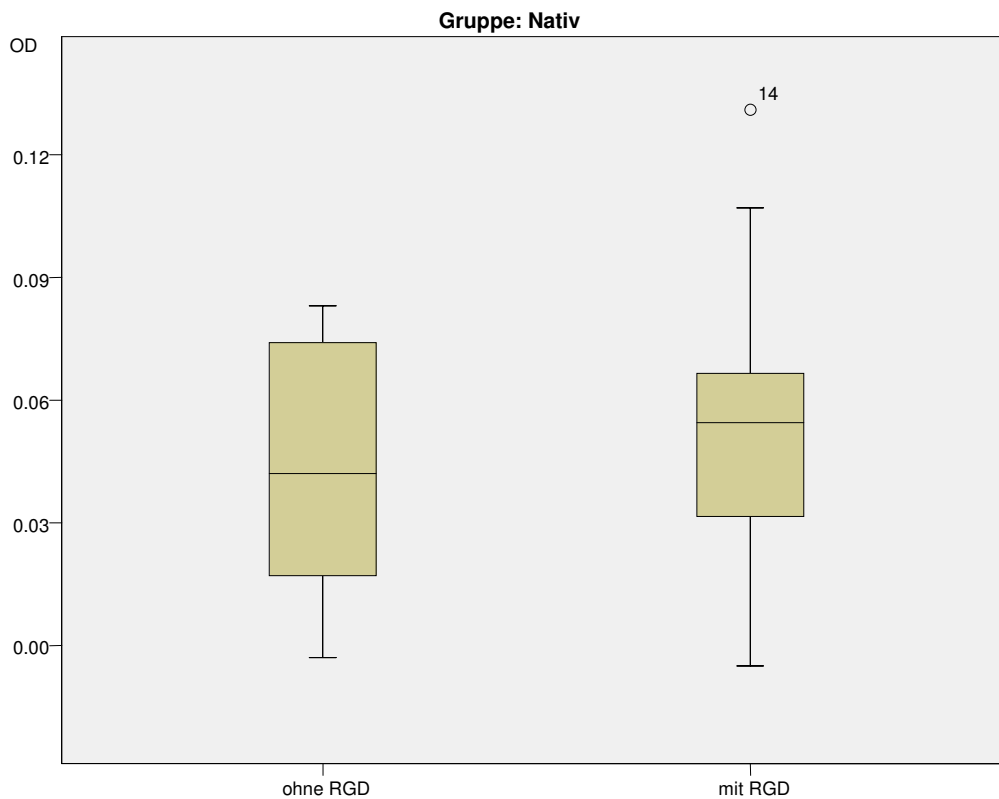
Abbildung 48: Zusammenfassung Endothelzellproliferation mit und ohne RGD-Beschichtung auf acetongereinigten Knochenkuben



Es macht mit $p=0,209$ statistisch gesehen keinen signifikanten Unterschied für die Endothelzellproliferation, ob die Knochenwürfel zusätzlich peptidbeschichtet werden oder nicht.

3.2.4.3 Nativ

Abbildung 49: Zusammenfassung Endothelzellproliferation mit und ohne RGD-Beschichtung auf nativen Knochenkuben



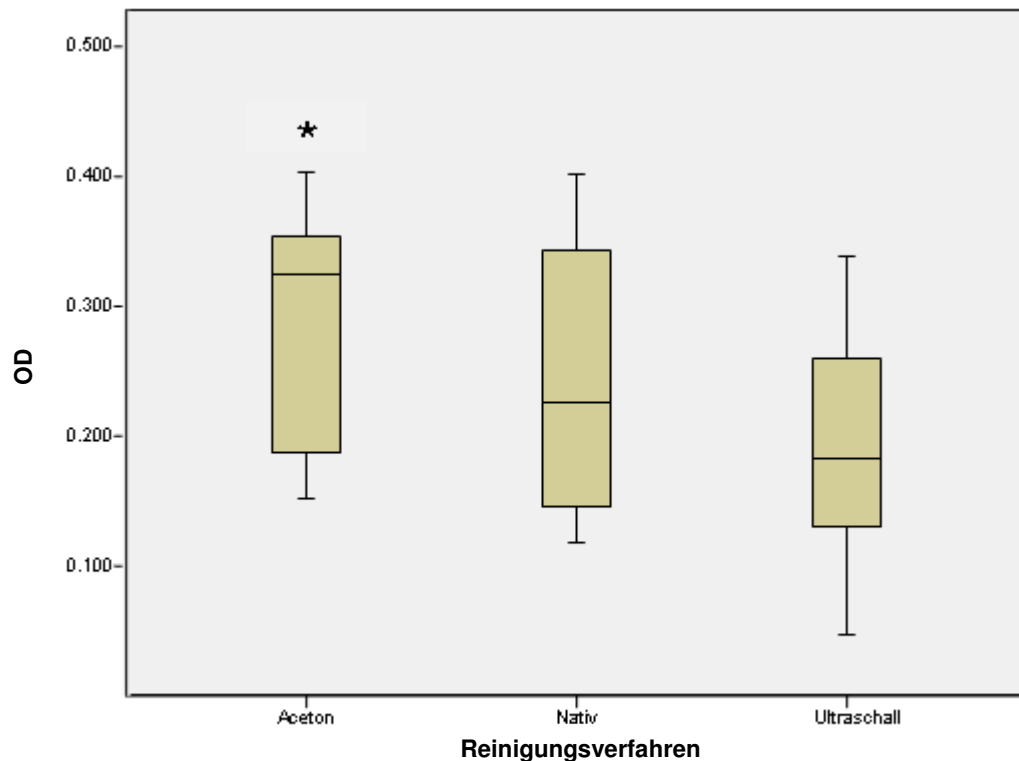
Es besteht eine statistische Tendenz ($p=0,126$), dass durch RGD-Beschichtung mehr Endothelzellen auf Knochen der Nativgruppe proliferieren können als in der Vergleichsgruppe ohne Peptidbeschichtung.

3.2.5 Vergleich der Endothelzelladhäsion und -proliferation auf RGD-beschichteten Knochenkuben bezüglich der unterschiedlichen Reinigungsverfahren

Um herauszufinden, ob die Adhäsion und Proliferation der Endothelzellen auf den RGD-beschichteten Knochenstücken von der jeweiligen Vorreinigung der Knochen abhängt, werden die Ergebnisse der drei verschiedenen Knochenreinigungsverfahren von 3.2.3 bzw. 3.2.4 gegenübergestellt und statistisch analysiert. Die genaue statistische Auswertung dazu findet sich im Anhang unter 7.1.3.5.

3.2.5.1 Adhäsion

Abbildung 50: Vergleich der Endothelzelladhäsion auf RGD-beschichteten Knochenkuben bezüglich der unterschiedlichen Reinigungsverfahren



Wird die Knochenreinigung durch Aceton mit jener der Nativgruppe verglichen, so zeigt sich mit $p=0,295$ kein signifikanter Unterschied der Endothelzelladhäsion.

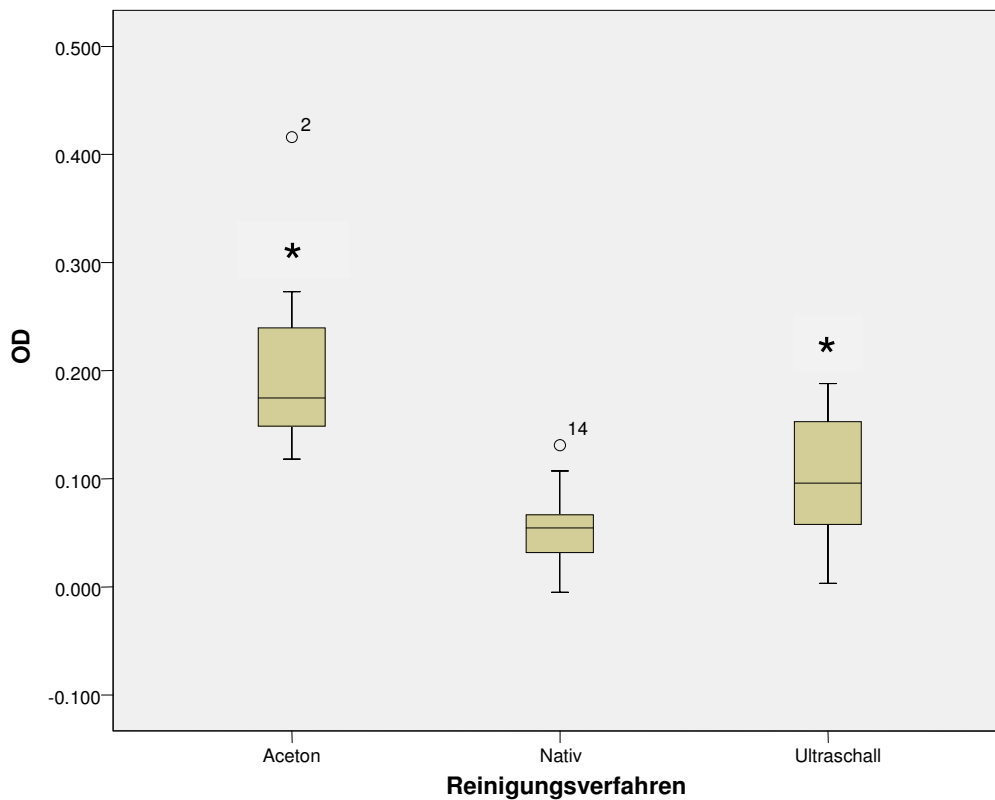
Wird die Reinigung mit Aceton jener mit Ultraschall gegenübergestellt, kann statistisch belegt werden, dass nach Acetonreinigung signifikant mehr Endothelzellen auf RGD-beschichtetem Knochen anhaften, als wenn der Knochen vor der Peptidbeschichtung ultraschallgereinigt wurde. Der p-Wert liegt dabei bei 0,021.

Die Ultraschallreinigung der Knochenkuben zeigt verglichen mit den nativen Kuben keine tendenziellen oder signifikanten Adhäsionsunterschiede der Endothelzellen.

Der p-Wert beträgt dabei 0,380.

3.2.5.2 Proliferation

Abbildung 51: Vergleich der Endothelzellproliferation auf RGD-beschichteten Knochenkuben bezüglich der unterschiedlichen Reinigungsverfahren



Durch die vorherige Acetonreinigung der mit Peptid beschichteten Knochen können signifikant mehr Endothelzellen auf den Knochenpräparaten proliferieren als auf den nativen Knochenkuben ($p < 0,001$).

Auch verglichen mit der Ultraschallreinigung proliferieren signifikant mehr Endothelzellen auf acetongereinigtem Knochen ($p = 0,003$).

Im Vergleich mit der Nativgruppe können nach Ultraschallreinigung auf RGD-beschichtetem Knochen signifikant mehr Endothelzellen proliferieren ($p = 0,034$).

3.3 Färbungen

3.3.1 Masson-Goldner-Färbung für PMMA

In den angefärbten Präparaten nach R. Yang [Yang 2003] stellt sich Knorpel und mineralisiertes Knochengewebe grün-blau, Osteoid hingegen rot dar. Zellkerne imponieren bräunlich bzw. schwarz und Zytoplasma ziegelrot. Nachstehend werden in Abb. 52 und 53 die angefärbten, adhärierten Endothelzellen auf RGD-beschichtetem Knochen der Nativgruppe demonstriert.

Abbildung 52: Masson-Goldner-Färbung von Endothelzellen auf RGD-beschichtetem Knochen (nativ), 10fache Vergrößerung

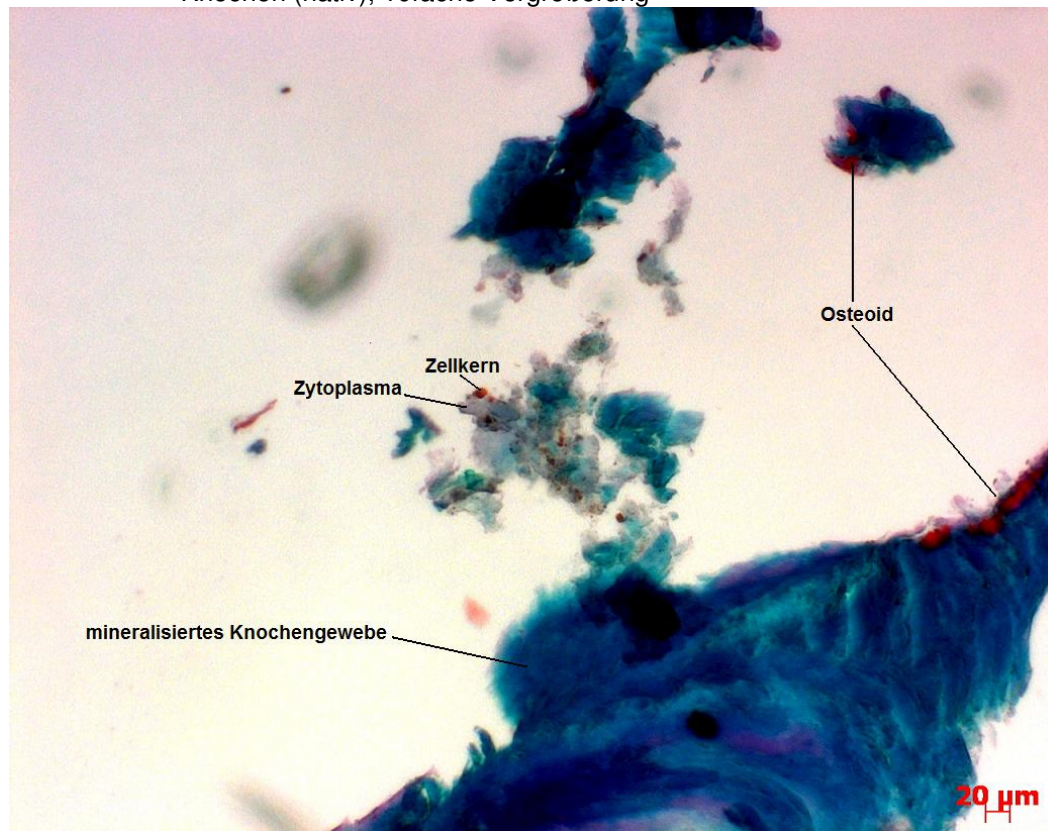


Abbildung 53: Masson-Goldner-Färbung von Endothelzellen auf RGD-beschichtetem Knochen (nativ), 32fache Vergrößerung

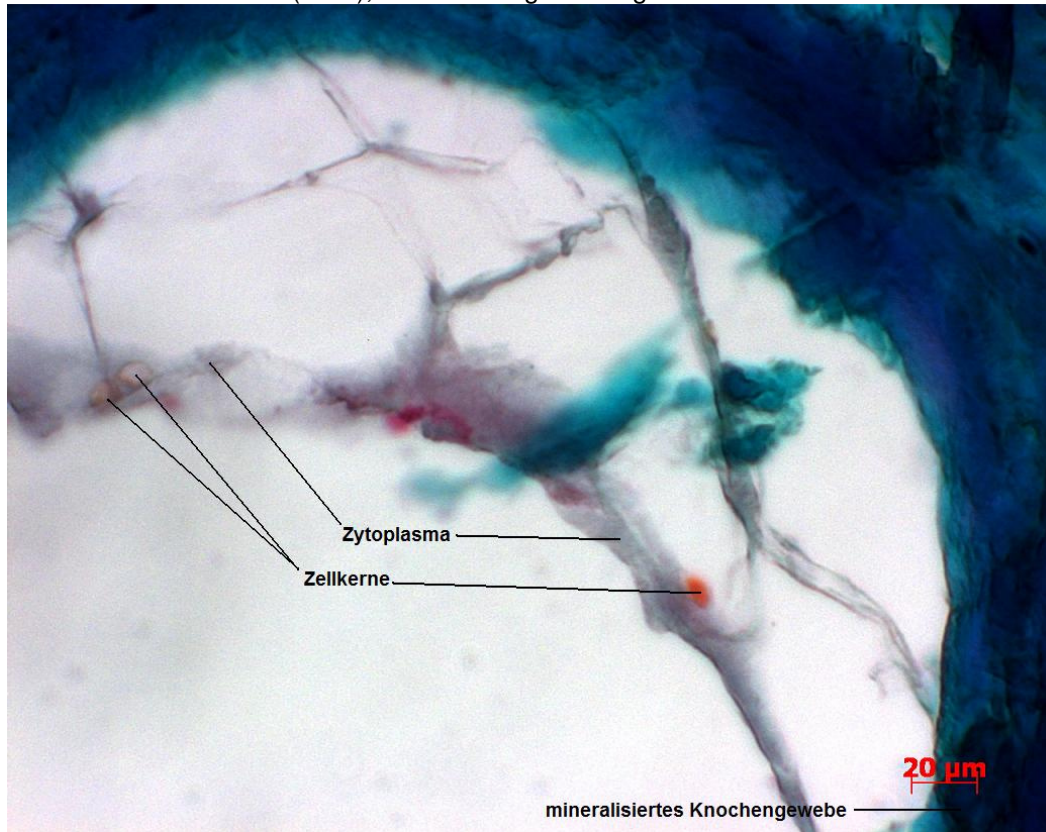


Abb. 53 zeigt, wie sich die adhärenierten Endothelzellen mit ihrem Zytoplasma auf dem mineralisierten Knochengewebe vernetzen. Im Zytoplasma sind teilweise die angeschnittenen Endothelzellkerne zu erkennen.

Abbildung 54: Masson-Goldner-Färbung von Endothelzellen auf RGD-beschichtetem Knochen (Ultraschall), 20fache Vergrößerung

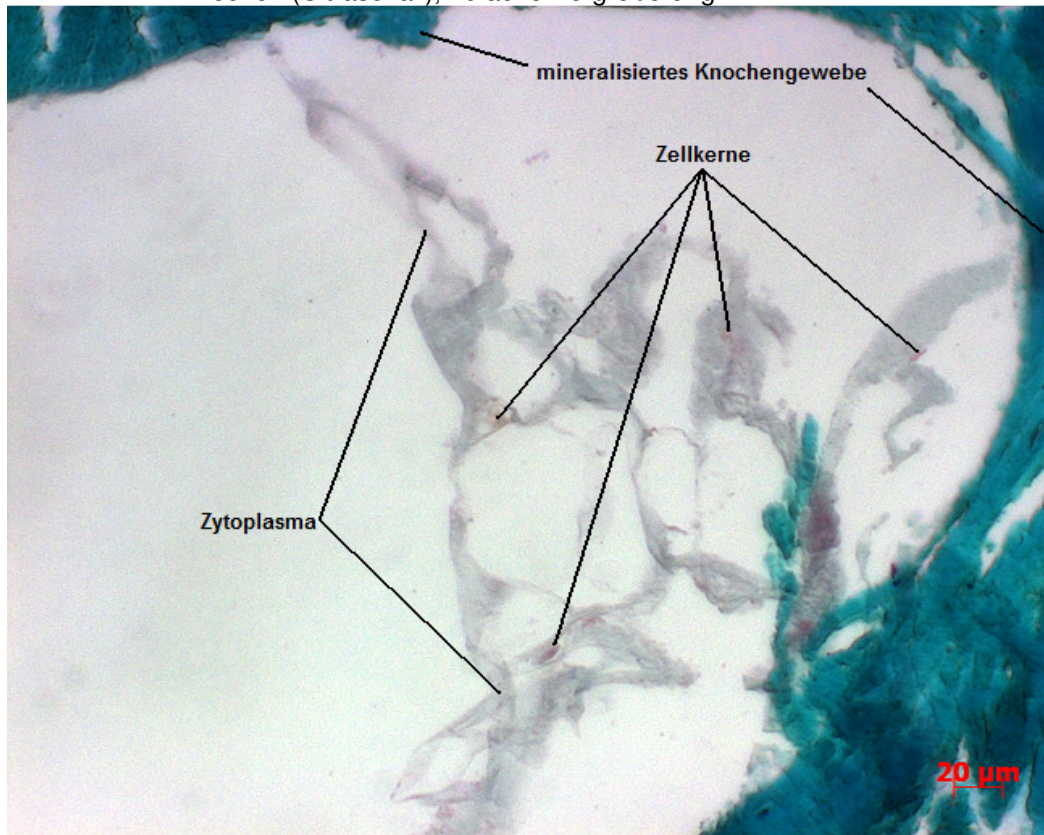
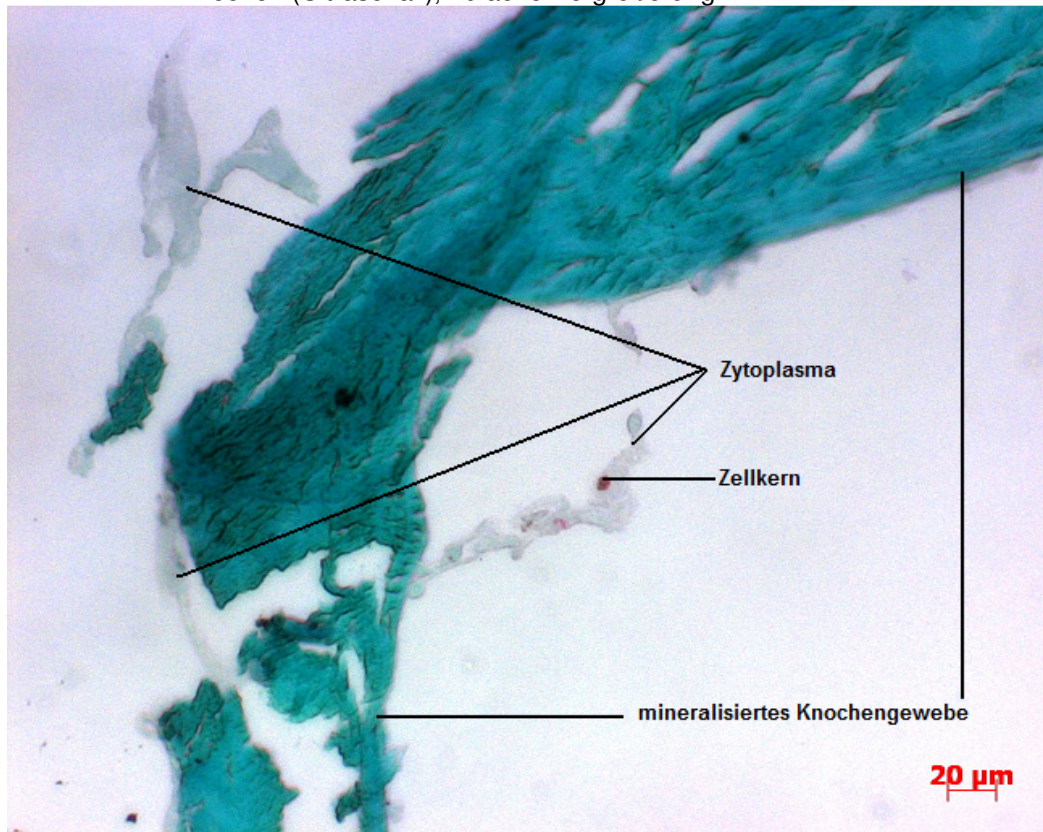


Abb. 54 präsentiert ebenfalls das vernetzte Zytoplasma der zahlreich anhaftenden Endothelzellen auf RGD-beschichtetem Knochen nach Ultraschallreinigung.

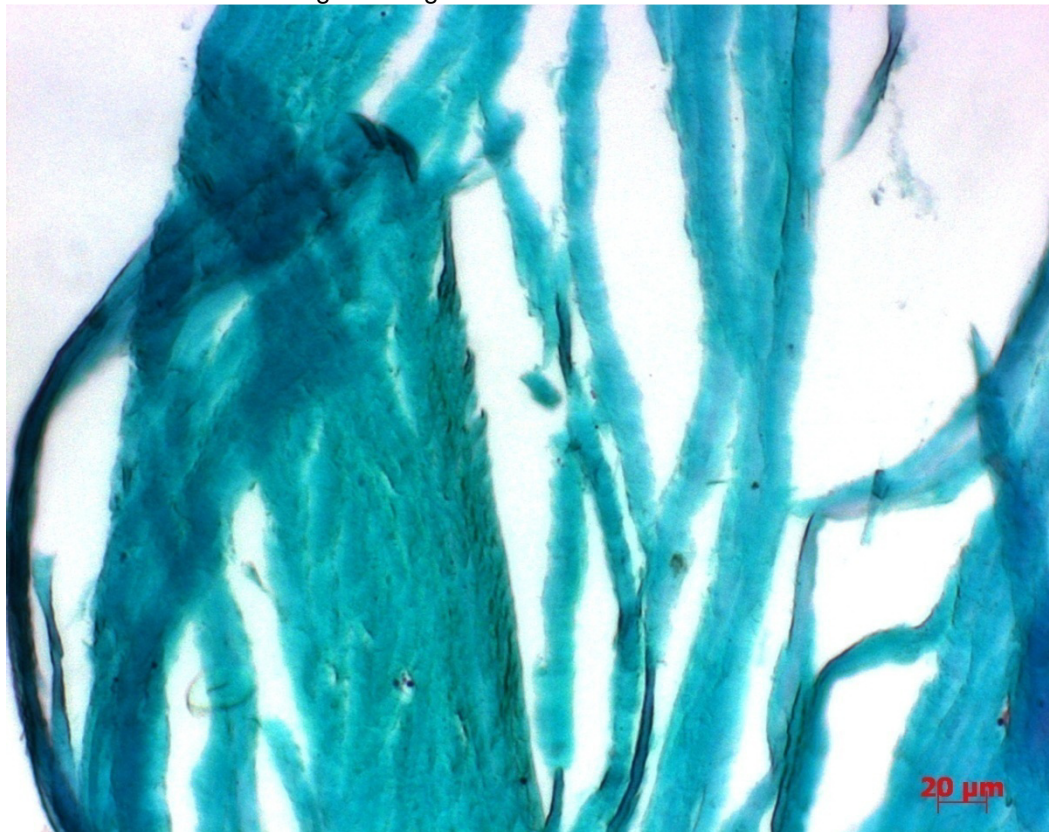
Abbildung 55: Masson-Goldner-Färbung von Endothelzellen auf RGD-unbeschichtetem Knochen (Ultraschall), 20fache Vergrößerung



In Abb. 55 finden sich Endothelzellen, die an RGD-unbeschichtetem Knochen nach Ultraschallreinigung adhärirt haben. Es sind dabei wenige Zellen auf der Knochenoberfläche zu verzeichnen, die Vernetzung des Endothelzellzytoplasmas ist nur wenig ausgeprägt.

Um die Aussagekraft der beimpften Färbungen zu steigern, wurde eine Negativprobe ohne vorherige Beimpfung mit Endothelzellen angefertigt, bei der folglich keine Endothelzellen mikroskopisch nachweisbar sind (Abb. 56).

Abbildung 56: Negativprobe Masson-Goldner-Färbung von Endothelzellen auf Knochen (nativ), 20fache Vergrößerung

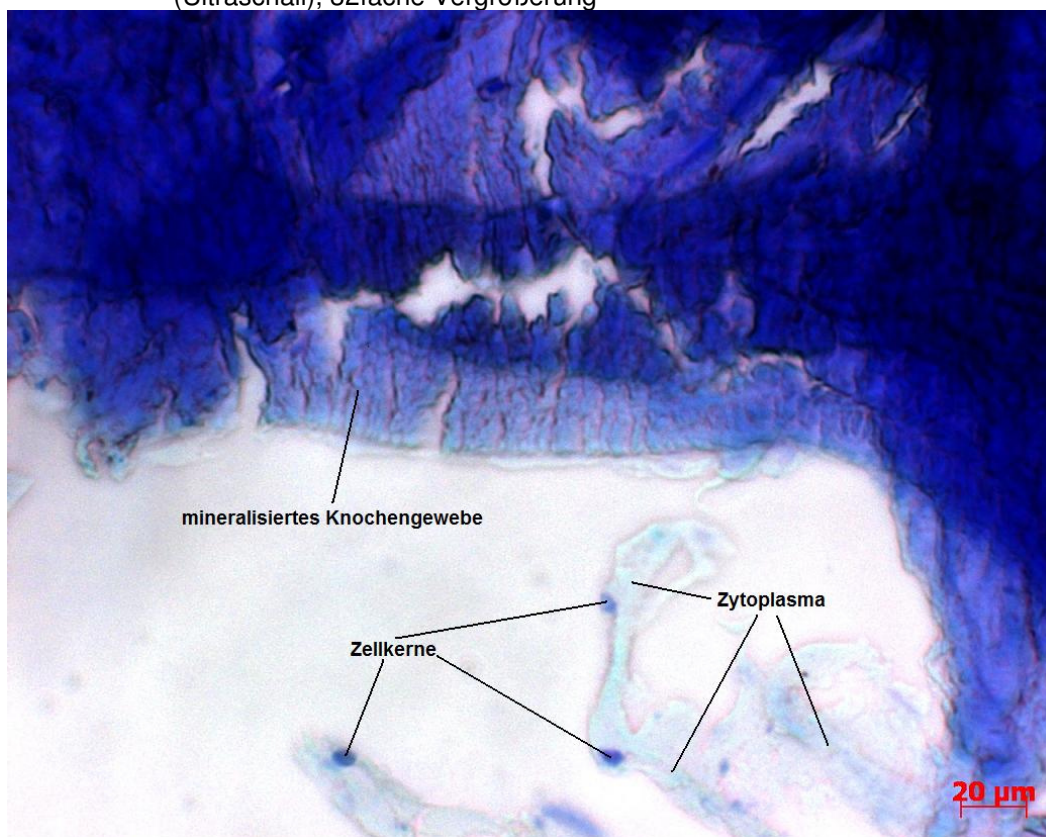


3.3.2 Toluidinblau-O-Färbung

Mikroskopisch betrachtet stellt sich mineralisiertes Hartgewebe ungefärbt bis blassblau dar, Zellen, Zytoplasma, Osteoidsäume und Kollagenfasern in verschiedenen Blautönen. Knorpelmatrix und Wundheilungsareale färben sich rot-violett, verkalkte Knorpelmatrix dunkelblau.

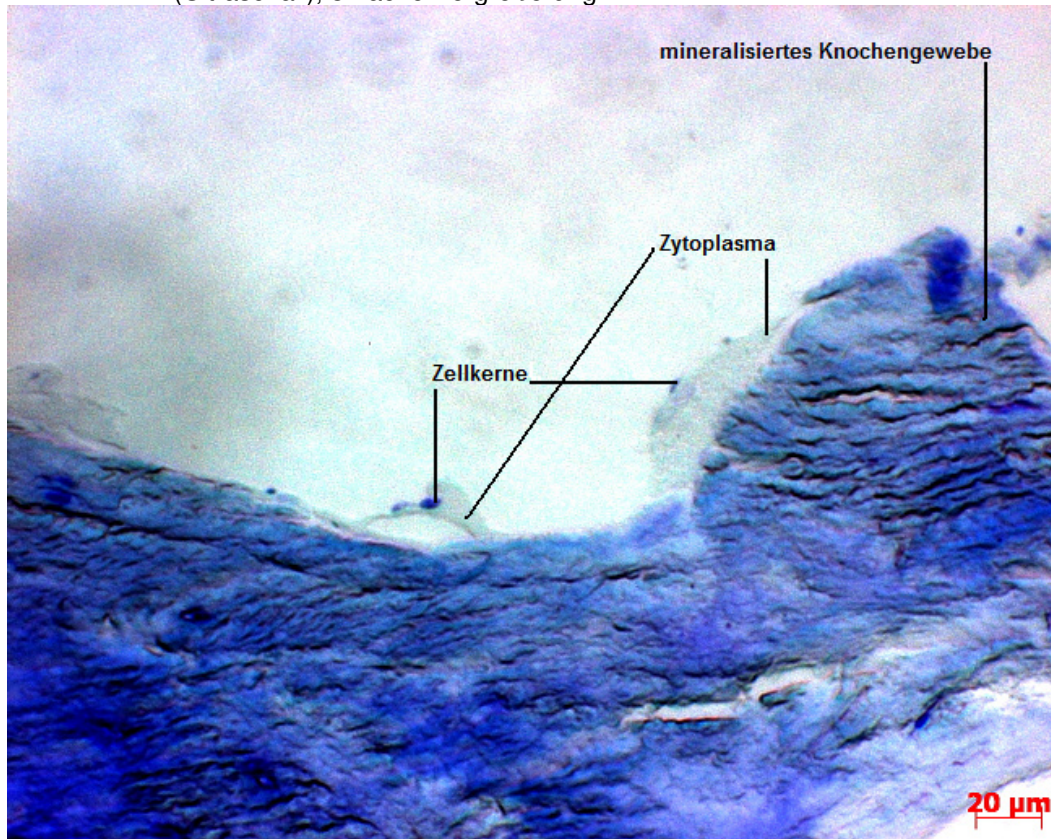
In den Abb. 57 bis 61 werden Endothelzellen auf verschiedenen gereinigten Knochnschnitten angefärbt und dargestellt.

Abbildung 57: Toluidinfärbung von Endothelzellen auf RGD-beschichtetem Knochen (Ultraschall), 32fache Vergrößerung



In Abb. 57 lassen sich reichlich Zytoplasma und Zellkerne von Endothelzellen erkennen, die am RGD-beschichteten Knochen (ultraschallgereinigt) adhärirt haben und sich dort vernetzen.

Abbildung 58: Toluidinfärbung von Endothelzellen auf RGD-unbeschichtetem Knochen (Ultraschall), 32fache Vergrößerung



Auf dem RGD-unbeschichteten Knochen (ultraschallgereinigt) sind nur wenige Zellkerne und Zytoplasma von Endothelzellen zu finden, die sich nicht vernetzen (siehe Abb. 58).

Abbildung 59: Toluidinfärbung von Endothelzellen auf RGD-beschichtetem Knochen (nativ),
32fache Vergrößerung

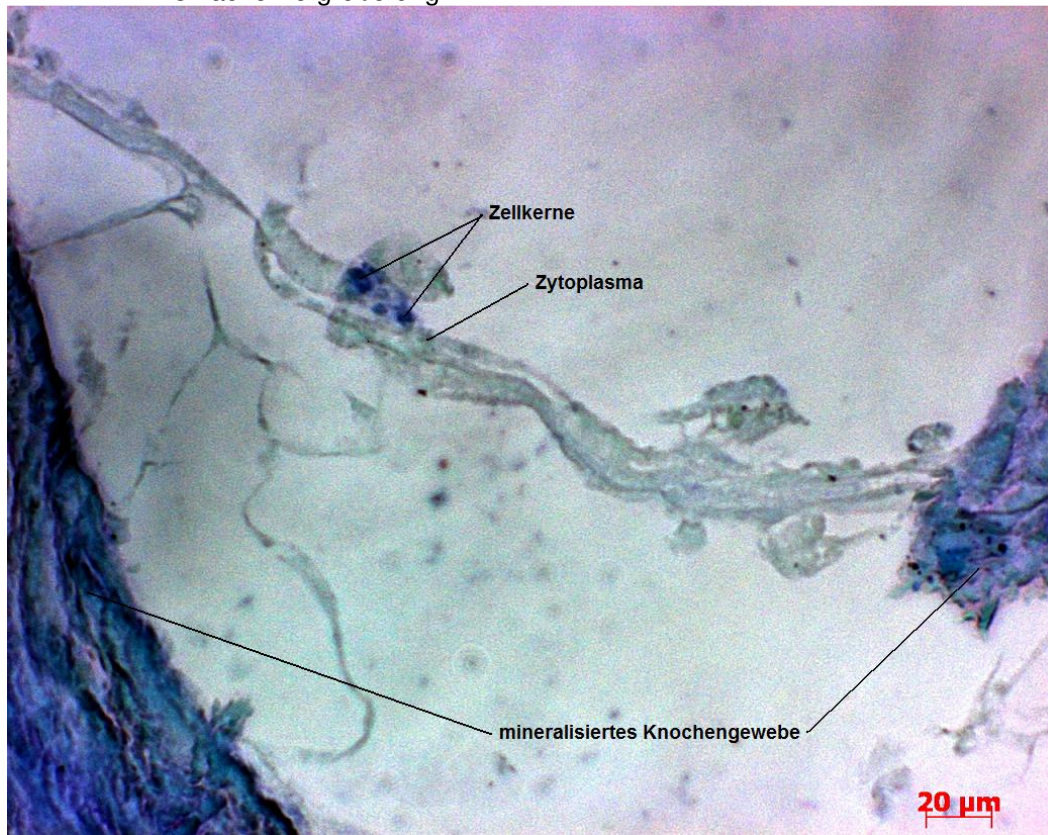
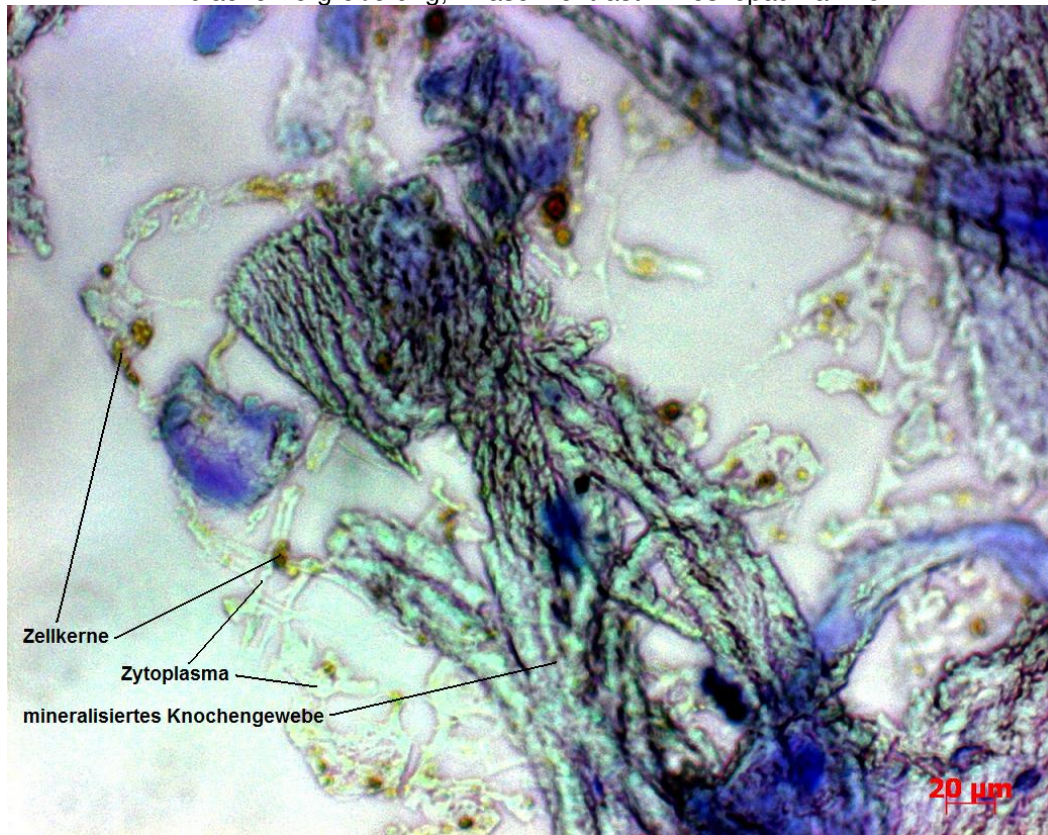


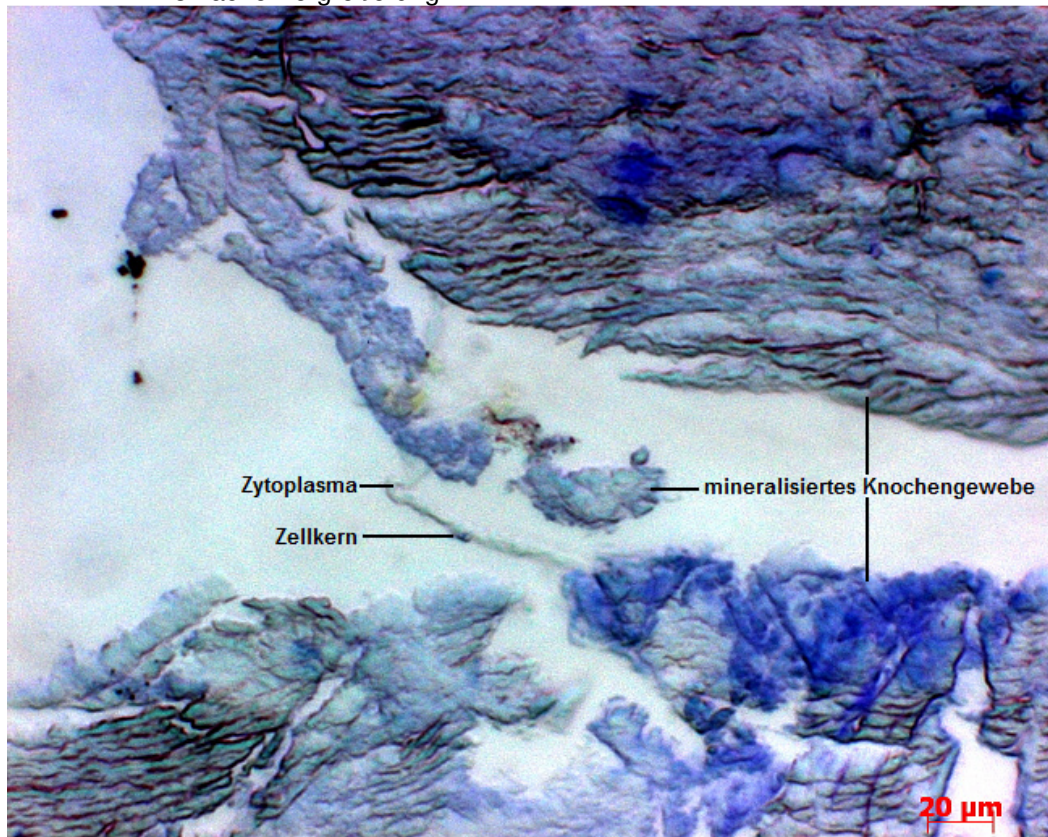
Abb. 59 zeigt das blau-grau angefärbte Zytoplasma von Endothelzellen, die sich gut auf dem RGD-beschichteten Knochen (nativ) integrieren und vernetzen. Einzelne Endothelzellkerne sind angeschnitten, die dunkelblau imponieren.

Abbildung 60: Toluidinfärbung von Endothelzellen auf RGD-beschichtetem Knochen (nativ), 20fache Vergrößerung, Phasenkontrastmikroskopaufnahme



In der Phasenkontrastmikroskopaufnahme von Abb. 60 präsentieren sich zahlreiche Endothelzellkerne, die bräunlich angefärbt sind. Ferner findet sich Endothelzellzytoplasma, das sich dem RGD-beschichteten Knochengewebe (nativ) aufgesetzt und gut vernetzt hat.

Abbildung 61: Toluidinfärbung von Endothelzellen auf RGD-unbeschichtetem Knochen (nativ), 32fache Vergrößerung



In Abb. 61 zeigen sich auf dem RGD-unbeschichteten Knochen (nativ) wenige Zellkerne und Zytoplasma von Endothelzellen, die sich kaum vernetzen.

3.3.3 Immunhistochemie nach der ABC-Methode

Lichtmikroskopisch präsentieren sich die Endothelzellen rot-bräunlich, wie auch die Positivkontrolle zeigt (Abb. 62). Auf der Negativprobe befinden sich keine Endothelzellen, weshalb darauf auch keine rot-bräunlich gefärbten Zellen zu finden sind (Abb. 63).

Abbildung 62: Positivkontrolle Endothelzellen, Hämalaungegenfärbung, 20fache Vergrößerung

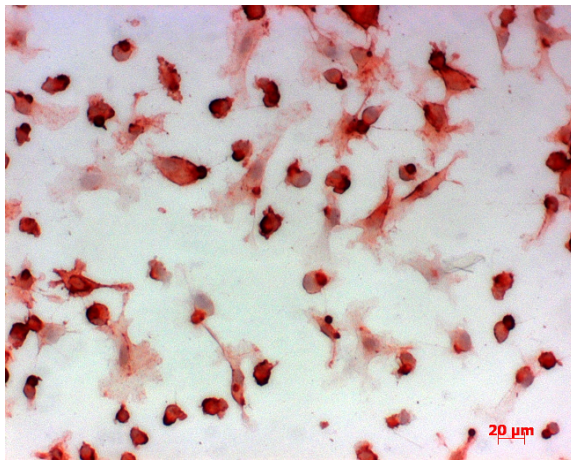
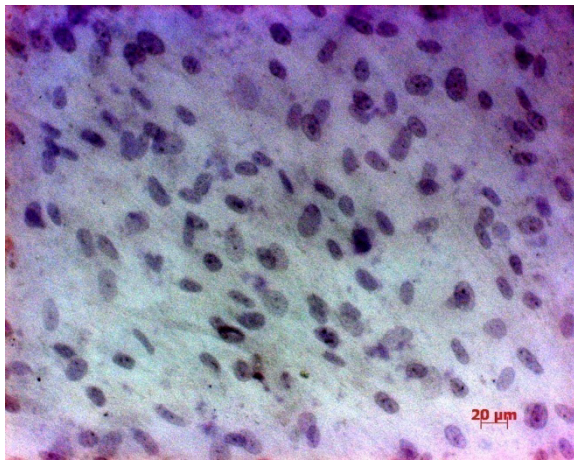


Abbildung 63: Negativkontrolle Osteoblasten, Hämalaungegenfärbung, 20fache Vergrößerung



Die Ergebnisse der Immunhistologie mit dem Antikörper CD31, die nach der Anleitung wie unter 2.2.7.2 beschrieben, angefertigt wurden, werden nachfolgend aufgeführt.

Unabhängig von der Konzentration der Antikörper lieferten die Färbungen mit vorheriger Andauung in der Mikrowelle sowie die Schnitte ohne jegliche Andauung die besten Ergebnisse.

In den Abb. 64-66 finden sich bei verschiedenen Vergrößerungen zahlreiche Endothelzellen, die auf RGD-beschichtetem Knochen der Nativgruppe adhärirt sind und sich dort vernetzen. Wie bereits erwähnt färben sich bei dieser Methode die Endothelzellen rot-bräunlich an.

Abbildung 64: Immunhistochemie CD31 von RGD-beschichtetem Knochen (nativ),
10fache Vergrößerung

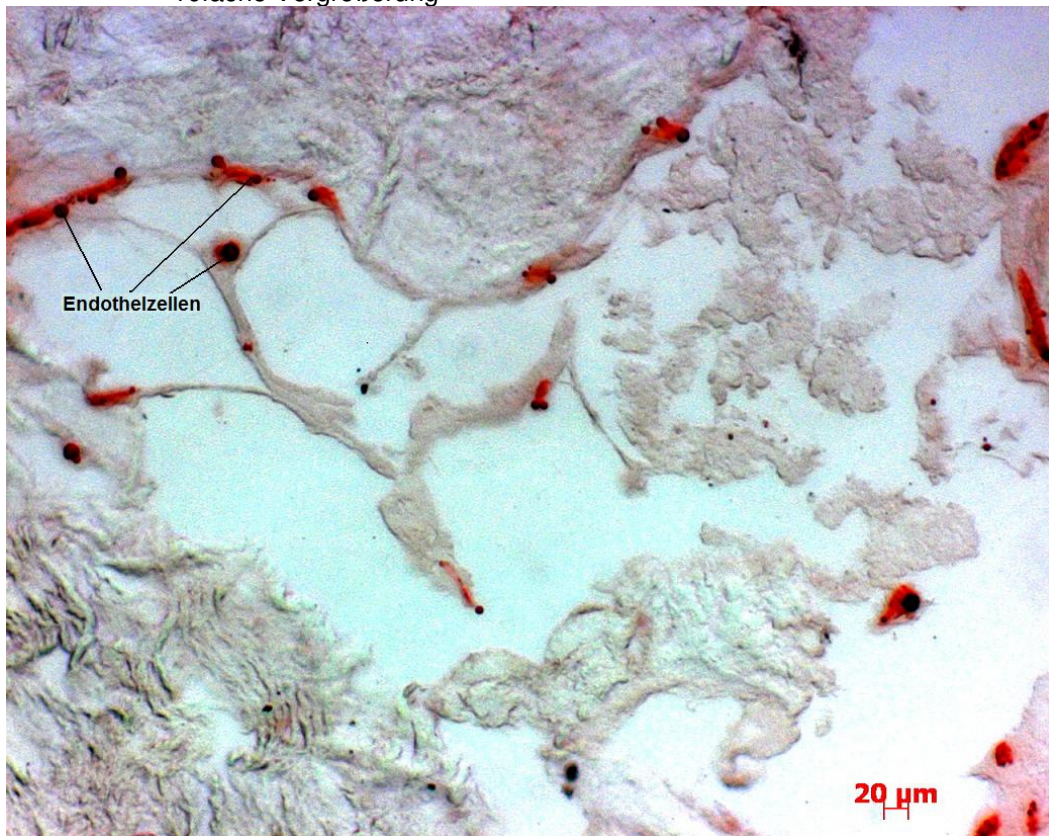


Abbildung 65: Immunhistochemie CD31 von RGD-beschichtetem Knochen (nativ),
32fache Vergrößerung

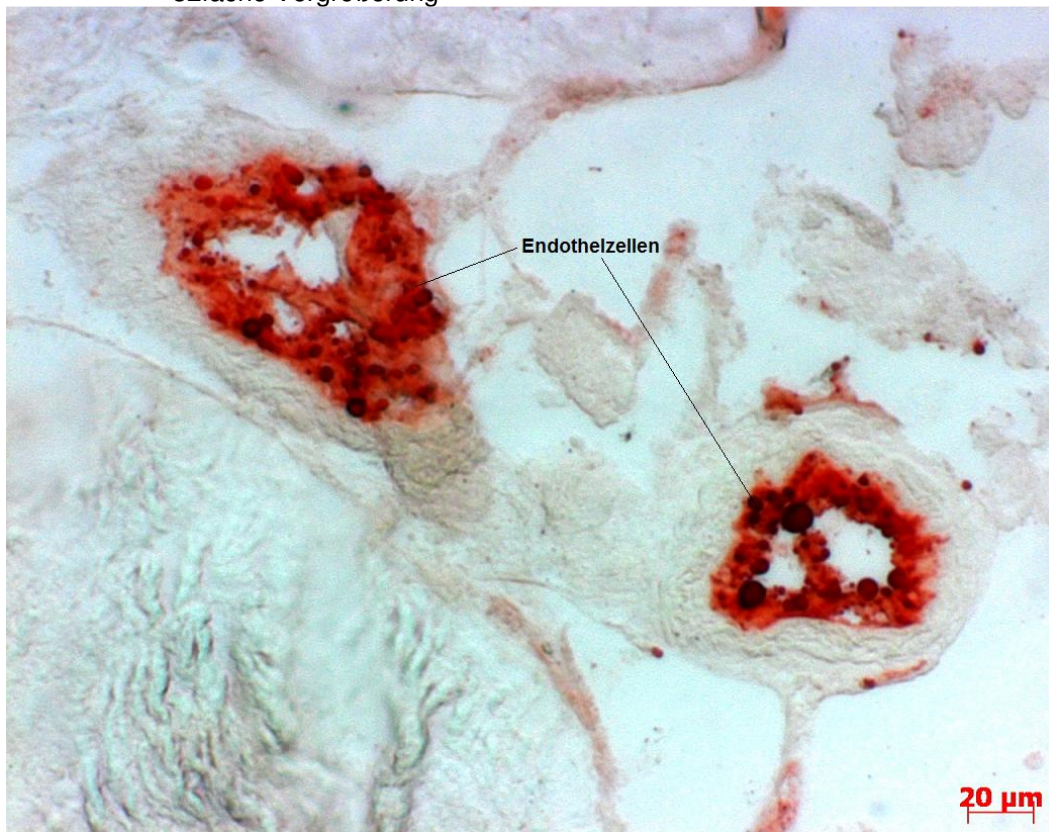
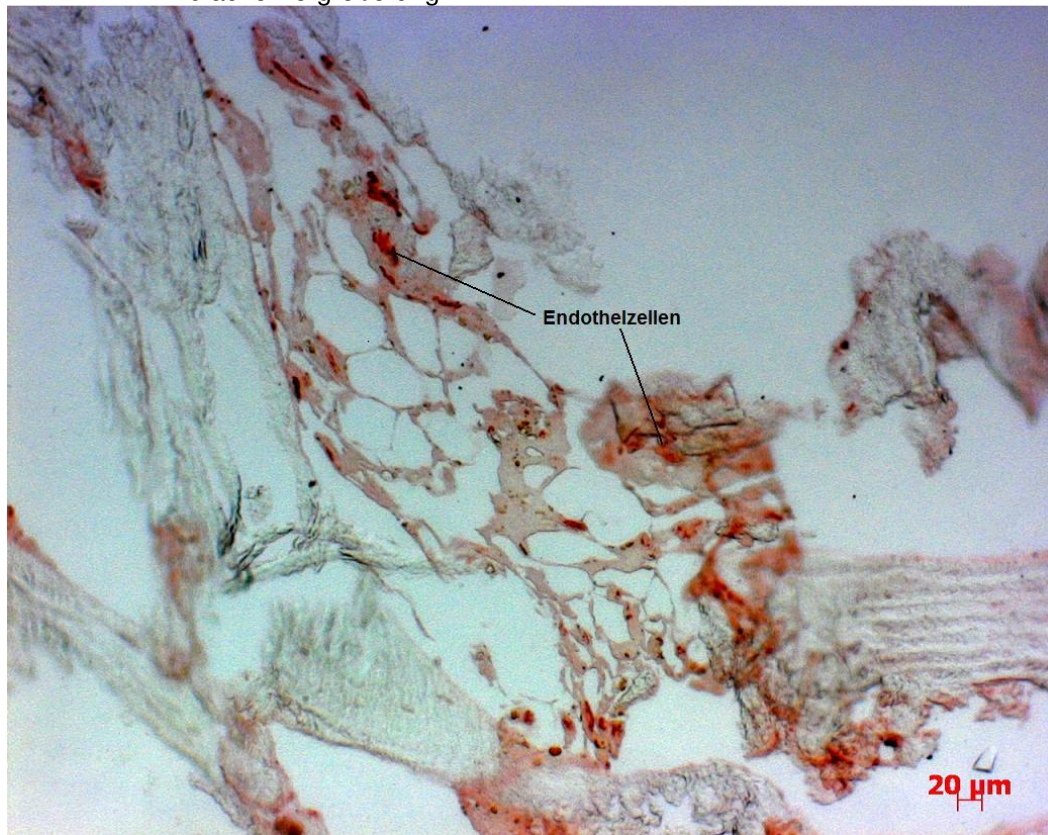


Abbildung 66: Immunhistochemie CD31 von RGD-beschichtetem Knochen (nativ),
10fache Vergrößerung



4. Diskussion

4.1 Rekonstruktion von Knochendefekten

Knochtumoren sowie traumabedingte und chronisch-infektiöse Knochendefekte sind ein zentrales Problem in der orthopädischen Chirurgie. Operative Behandlungsmöglichkeiten sind die Versorgung mittels Endoprothesen, Distraktionsosteosynthese oder die Knochensubstitution, die artifizieller, autogener oder allogener Art sein kann.

Ein wesentlicher Nachteil der Endoprothetik ist jedoch, dass sie, ganz abgesehen von Komplikationen wie Infektionen, aseptischen Prothesenlockerungen oder periprothetischen Frakturen [Natarajan 2003], nicht flexibel für alle Knochendefektsituationen einsetzbar ist. Ferner ist sie bezüglich der Haltbarkeit selbst bei optimaler Versorgung auf ca. 20 Jahre limitiert, was gerade bei jüngeren Patienten im Verlauf Revisionen erforderlich macht [Horowitz 1993; Mittermayer 2001].

Auch die Distraktionsosteosynthese ist, neben der langen Therapiedauer, mit einer hohen Komplikationsrate assoziiert [Hosny 2003].

Eine gute Möglichkeit zur Rekonstruktion von Knochendefekten stellen Knochen transplantate dar. Als Goldstandard zählt autogenes, spongiöses Knochenmaterial des Beckenkammes [Flören 2007] oder ein kortikospongiöses Fibulatransplantat, beides steht jedoch nur begrenzt zur Verfügung und birgt zudem bei der Entnahme Risiken hinsichtlich Blutung und Infektion [von Garrel 1998]. Alternativ gibt es künstliche Knochenersatzmaterialien und allogenen Knochen. Allogene Knochen transplantate stehen dank Knochenbanken in ausreichender Menge zur Verfügung. Gegenüber dem autogenen Knochen besitzt der allogene Knochen zwar eine geringere osteoinduktive Wertigkeit, verfügt aber dennoch über geeignete Bedingungen für eine rasche Gefäßeinsprossung, wodurch er eine hohe osteokonduktive Potenz besitzt [von Garrel 1998]. Osteoinduktion bedeutet das Induzieren der Differenzierung von Stammzellen zu Vorläuferzellen des Knochenstoffwechsels [Parikh 2002]. Die Osteokonduktion beschreibt die Fähigkeit eines Materials, als porige Leitschiene für einwachsende Knochenzellen zu wirken [Parikh 2002]. Nachteil des allogenen Knochen transplantates ist die Gefahr der Übertragung von Infektionskrankheiten wie beispielsweise Hepatitis [Shutkin 1954] oder HIV [Schratt 1996].

Aus diesem Grund ist eine Sterilisation oder Desinfektion des Knochens zur Senkung des Infektionsrisikos unabdingbar. Fakt ist jedoch, dass dadurch die biologische und biomechanische Eigenschaft des Knochentransplantates verschlechtert wird [Araki 1999; Böhm 1998, 2003]. Ziel dieser Arbeit war es daher, durch Biofunktionalisierung sterilisierter Knochentransplantate mittels RGD-Peptiden die biologischen Eigenschaften im Sinne einer erfolgreichen Osteointegration zu verbessern.

In-vivo-Studien haben durch RGD-Beschichtung von Titanimplantaten einen positiven Einfluss auf deren Einwachsverhalten nachgewiesen [Elmengaard 2005a]. Die Implantation von titanlegierten Implantaten in die proximale Tibia von Hunden zeigte ein besseres Einwachsverhalten der RGD-beschichteten Implantate gegenüber den unbeschichteten, was vermutlich auf eine gesteigerte Osteoblastenproliferation durch die optionale Beschichtung zurückzuführen ist [Elmengaard 2005b].

Ähnliche Effekte könnten auch hinsichtlich der Endothelzellproliferation durch optionale RGD-Beschichtung zu erwarten sein, da auch Endothelzellen bevorzugt an RGD binden [Holland 1996].

Da die Knochenneubildung und die Osteointegration maßgeblich von der Angiogenese abhängig sind [Schaffner 2003], soll in der vorliegenden Arbeit untersucht werden, ob die RGD-Beschichtung von thermodesinfiziertem Knochen einen positiven Einfluss auf die Endothelzelladhäsion und -proliferation hat.

4.2 Methodik und Ergebnisse

Aus der Knochenmatrix des allogenen Knochens werden Proteine und andere Wachstumsfaktoren freigesetzt, die das Knochenwachstum positiv beeinflussen. Die im Knochen befindliche Konzentration dieser Wachstumsfaktoren ist jedoch u.a. von der Transplantatbeschaffenheit, der Transplantatbehandlung sowie vom Lebensalter des Spenders abhängig und beeinflusst so die osteoinduktive Kapazität der Knochentransplantate [von Garrel 1998].

Für die Versuche wurden Hüftköpfe von Männern und Frauen mit einem Durchschnittsalter von 66 Jahren (39-80 Jahre) verwendet. Weitere interindividuelle Unterschiede wie Begleiterkrankungen wurden nicht berücksichtigt. Ab dem 40. Lebensjahr nimmt die osteoinduktive Kapazität signifikant ab [von Garrel 1998]. Außerdem ist bekannt, dass fast 50% aller Menschen über 70 Jahre eine Osteoporose haben [Krämer 2001, S. 128f.]. Um diese interindividuellen Unterschiede, die die Transplan-

tateigenschaften beeinflussen, auszuschalten, wurden die Knochenstücke vor der Einteilung in die verschiedenen Versuchsgruppen randomisiert.

Damit allogene Knochentransplantate überhaupt verwendet werden können, bedarf es der Eliminierung möglicher Krankheitserreger durch Desinfektion oder Sterilisation. Gemäß Experimenten von Hofmann et al. haben jedoch unterschiedliche Sterilisations- und Desinfektionsverfahren maßgebliche Auswirkungen auf die Transplantateigenschaft [Hofmann 2000], weshalb drei verschiedene Reinigungsverfahren bei den Versuchen angewendet wurden, um diese im Hinblick auf Adhäsion bzw. Proliferation von Endothelzellen zu vergleichen. Allen drei Vergleichsgruppen lag zu Grunde, dass zunächst eine Thermodesinfektion im Lobator sd-2 der Firma Telos stattfand, bevor sie den Gruppen zur spezifischen Weiterbehandlung zugeteilt bzw. bei der Nativgruppe ohne weitere Reinigungsschritte verwendet wurden.

Einerseits können zwar durch hohe Temperaturen wie bei dieser Art der Thermodesinfektion chemische und physikalische Eigenschaften des Knochens verändert werden [Hofmann 2000], so dass zur Testung ggf. eine Vorreinigung bei verschiedenen und niedrigeren Temperaturen anstelle der Thermodesinfektion im Lobator anzustreben gewesen wäre. Stattdessen liegt der Unterschied der Knochenaufarbeitung der Vergleichsgruppen in der optionalen Entfettung bzw. Reinigung durch Aceton oder Ultraschall.

Andererseits ist die thermische Desinfektion jedoch umso wirksamer, je höher die Temperatur und je länger die Einwirkzeit ist [Just 2007, S. 19]. Da nun zum möglichst sicheren Umgang mit allogenen Knochentransplantaten von der Bundesärztekammer u.a. die Freiheit thermostabiler Viren wie Hepatitis C Viren im Transplantat gefordert wird [Bundesärztekammer 2001, S. A1012], sind schließlich zur sicheren Inaktivierung dieser die hohen Temperaturen, wie bei der Thermodesinfektion mittels Lobator gegeben, erforderlich und damit unumgänglich. Gemäß Ergebnissen von Pruss et al. können durch die Marburger Knochenbankmethode (= Thermodesinfektion mittels Lobator) u.a. HIV-2, bovines Diarrhoevirus (BVDV) als Modellvirus für das Hepatitis C Virus zuverlässig inaktiviert werden [Pruss 2003a].

Andere Behandlungen wie radioaktive Bestrahlung oder chemische Bearbeitung zur Desinfektion sind mit Nachteilen behaftet, da chemische Agentien toxisch und mutagen wirken können. Die Bestrahlung führt eine deutliche Abnahme der Knochen-

festigkeit herbei und kann zudem ebenfalls mutagen sein [von Garrel 1998] und die osteoinduktive Eigenschaft der Transplantate herabsetzen [Pruss 2002].

Die thermodesinfizierten Knochen wurden mit Zangen und autoklavierten Handsägen unter sterilen Bedingungen von Hand in ca. 0,5x0,5x0,5 cm große Kuben zugesägt. Für die Versuche wurde bewusst Spongiosa verwendet, da durch ihr weites Trabekelsystem die ideale Voraussetzung für eine rasche Gefässeinsprossung herrscht und somit eine hohe osteokonduktive Fähigkeit gewährleistet wird, auch wenn im kortikalen Knochen eine höhere Konzentration wachstumsstimulierender Faktoren nachweisbar ist [von Garrel 1998]. Kortikalis wird jedoch wegen der verzögerten Revascularisation deutlich langsamer umgebaut als Spongiosa.

Die Aufbewahrung und Konservierung der Knochenfragmente erfolgte bis zur Verwendung bei einer Tiefkühlagerung von -80°C. Dies entspricht auch der allgemeinen Empfehlung, da zwar bei -28°C der eutektische Punkt, also der Punkt, bei dem die Gewebekomponenten in gefrorenem Zustand vorliegen, erreicht wird, jedoch erst bei -80°C das proteolytische Enzymsystem der Zellen gänzlich zum Stillstand kommt und zudem die Antigenität des allogenen Knochens reduziert wird, ohne dass daraus ein wesentlicher Festigkeitsverlust des Knochens resultiert [von Garrel 1998]. Nach Ergebnissen von Matter et al. haben die stark unterschiedlichen Kryokonservierungstemperaturen von -20°C und -80°C keinen Einfluss auf die mechanischen Eigenschaften der Spongiosa, selbst dann nicht, wenn die Lagerung bis zu zwei Jahre erfolgt [Matter 2001].

Für die Versuche wurde ein bewährtes, zyklisches RGD-Peptid verwendet, da eine zyklische Variante nicht durch Proteasen abgebaut werden kann [Schaffner 2003] und stabiler ist als lineares Peptid [Kim 2005]. Zudem weisen zyklische Peptide eine gesteigerte Aktivität auf, wirken somit potenter und sind auch spezifischer als die linearen Versionen [Schaffner 2003]. Dies liegt daran, dass die Zyklisierung der RGD-Peptide die Rezeptoraffinität sowie die Selektivität erhöht [Ishikawa 2008].

Ferner hatte das verwendete zyklische RGD-Peptid vier Phosphonatankergruppen, damit eine stabilere ionische Bindung an der anorganischen Knochenmatrix möglich ist, als es beispielsweise mit einem nur zwei Phosphonatgruppen enthaltenden Peptid möglich wäre [Magdolen 2006].

Die verwendeten Pentapeptide cyclo(-RGDfK-) sind hochselektiv für $\alpha_v\beta_3$ - und $\alpha_v\beta_5$ -Integrin-Rezeptoren [Marchi-Artzner 2001], weil der Asparaginsäure die D-Aminosäure folgt und dadurch eine Konformation der RGD-Sequenz erzeugt wird, die am besten von $\alpha_v\beta_3$ - und $\alpha_v\beta_5$ -Integrinen erkannt wird [Kantlehner 2000].

Endothelzellen enthalten diese $\alpha_v\beta_3$ - und $\alpha_v\beta_5$ -Integrin-Rezeptoren [Marchi-Artzner 2001], so dass für die Experimente ein solches cyclo(-RGDfK-)-Peptid zum Einsatz kam.

Unter den genannten Voraussetzungen hatte das RGD-Peptid ein optimales Design für die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Adhäsions- und Proliferationsversuche.

Die Reinheit der Zellkulturen ist eine wichtige Voraussetzung für die durchgeführten Untersuchungen. Um diese zu wahren, wurde unter strikter Einhaltung steriler Bedingungen gearbeitet und die verwendeten Nabelschnurendothelzellen nicht selbst isoliert, sondern gut charakterisierte Zellen (HUVEC, Art.Nr. AA-1001, Clonetics®, Cambrex Bio Science) erworben.

Da ein zu häufiges Passagieren einen Verlust der spezifischen Zelleigenschaften nach sich ziehen würde, wurden die Zellen lediglich bis zur siebten Passage verwendet und bis zum endgültigen Gebrauch kryokonserviert.

Damit eine Beeinflussung der Resultate durch variable Zusätze ausgeschlossen werden konnte, wurde für alle Versuche stets die gleiche Menge an Zusatzstoffen wie fetales Kälberserum (FCS), Vitamine, Glutamin und Antibiotika hinzugefügt, was auch für die Konzentration und Menge des RGD-Peptids zutrifft.

Um das Wachstum von Zellen in Kultur zu fördern, wurde FCS verwendet. Auch nach der Ablösung des Zellrasens wurde kälberserumhaltiges Medium benutzt, weil das Kälberserum Trypsin inaktiviert [Li 2008] und so ein Zerstoren der Endothelzellen verhindert wird.

Für die Versuche selbst kam jedoch Medium ohne FCS zum Einsatz, weil Kälberserum selbst RGD-enthaltende extrazelluläre Matrixproteine beinhalten kann [Magdolen 2006].

Zur Messung der Adhäsion und Proliferation von Endothelzellen fand der Hexosaminidase-Assay Anwendung, der allgemein als Marker der Zellzahl anerkannt ist [Landegren 1984]. Dieser ist jedoch nicht spezifisch für Endothelzellen, sondern

erfasst auch alle anderen Zellen. Da aber die verwendeten Knochen thermodesinfiziert und die Endothelzellen angezüchtet erworben wurden sowie stets unter sterilen Bedingungen gearbeitet wurde, ist zu erwarten, dass es sich bei der Messung mittels Hexosaminidase rein um die Messwerte von Endothelzellen ohne andere Zellverunreinigungen handelt. Auch die kritische Obergrenze der photometrisch gemessenen optischen Dichte, ab der aus technischen Gründen eine genaue Bestimmung nicht mehr sicher möglich ist, wurde bei den durchgeführten Experimenten nicht erreicht.

Zunächst wurde die Adhäsionsfähigkeit des RGD-Peptids auf Knochen getestet, indem das RGD mit radioaktivem Jod markiert und dann über einen Gamma Counter die Aktivität gemessen wurde, worüber schließlich quantitative Rückschlüsse auf die Adhäsion des RGD auf den Knochenwürfeln gezogen werden konnten.

Es sollte auch die Stabilität des Peptids nach einer Woche getestet werden. Da jedoch davon auszugehen ist, dass das radioaktive Jod die RGD-Peptide zerstört, wären die gemessenen Werte verfälscht worden. Aus diesem Grund konnten Versuche hinsichtlich der Stabilität von adhärennten RGD-Peptiden nicht erfolgen.

Um die durch unterschiedlich dichtes Trabekelwerk sowie durch das Zuschneiden von Hand in der Größe variierende Fläche der Knochenkuben gleich zu halten, wurde die gemessene Radioaktivität bei der Auswertung aus Gründen der Vergleichbarkeit auf ein Gramm Knochengewicht bezogen. So wurde eine mögliche Fehlerquelle bei der Gegenüberstellung der Messergebnisse eliminiert, da natürlich mehr Oberfläche auch mehr Platz für die Adhäsion der Peptide bieten würde.

Analysiert man nun die Resultate der einzelnen Versuchsreihen, so fällt auf, dass acetongereinigter Knochen im Vergleich mit den anderen beiden Reinigungsgruppen durchweg am meisten RGD-Peptid binden konnte. Eine Erklärung dafür könnte sein, dass durch das Waschen mit Aceton mehr Fett vom Knochen gelöst wird als bei den anderen Reinigungsarten und somit mehr Peptid auf der Oberfläche adhärennen kann. Auch Hildebrand bestätigt, dass das Entfetten von Knochen mit Aceton gute Resultate erzielt [Hildebrand 2004, S. 663].

Bei einer Konzentration von 1 μmol radioaktivem Peptid adhärennte nahezu signifikant mehr RGD auf den acetongereinigten Knochenproben ($p=0,050$).

Auch bei steigender Peptid-Konzentration (10 und 75 μmol) bestätigte sich gegenüber den anderen Gruppen die statistische Tendenz einer Mehradhäsion von RGD auf acetongereinigtem Knochen ($p=0,050$ bei 10 μmol , $p=0,083$ bei 75 μmol), während sich zwischen den ultraschallgereinigten und nativen Knochenstücken statistisch gesehen keine wesentlichen Unterschiede diesbezüglich finden ließen. Es ist denkbar, dass durch Ultraschallbehandlung kaum zusätzliches Fett vom Knochen gelöst werden kann und daher ähnliche Werte wie bei der Nativgruppe entstanden. Somit zeigt sich, dass die Behandlung der Knochen mit Aceton einen eindeutig besseren Reinigungseffekt hat, da es bei allen Versuchen zu besseren Messergebnissen kam als bei den Vergleichsgruppen. Selbst mit zunehmender Konzentration stieg tendenziell bei allen Gruppen die gebundene Peptidmenge, so dass bei den getesteten Konzentrationen noch keine Sättigung eintrat.

Bei den Hauptversuchen zur Adhäsion und Proliferation von Endothelzellen wurde über einen colorimetrischen Hexosaminidase-Assay die Farbintensität gemessen, die direkt proportional zur Zellmenge der lysierten Endothelzellen ist.

Dadurch konnten Rückschlüsse auf die Endothelzelladhäsion und –proliferation der verschiedenen Knochen mit und ohne RGD-Beschichtung gezogen werden.

Vergleicht man bei den Hauptversuchen der Endothelzelladhäsion die einzelnen Versuche der mit Ultraschall gereinigten Knochen, so lässt sich kein eindeutiges Ergebnis erkennen. In zwei von fünf Versuchen bestand eine Tendenz zur besseren Adhäsion der Endothelzellen auf den unbeschichteten Knochenstücken ($p=0,109$), während in den restlichen Durchgängen einmal die Tendenz zur besseren ($p=0,109$) und zweimal eine leicht vermehrte, jedoch statistisch nicht relevant bessere Adhäsion auf beschichtetem Knochen zu verzeichnen war ($p=0,285$).

Bei den acetongereinigten Knochen war die Adhäsionsrate der zusätzlich peptidbeschichteten Stücke einmal vergleichbar mit denen der unbeschichteten ($p=1,000$).

Bei drei weiteren Versuchen schnitten die zusätzlich peptidbeschichteten Knochen besser ab ($p=0,180$, $p=0,285$). Davon einmal sogar tendenziell besser mit $p=0,109$.

In der Nativgruppe ließ sich beobachten, dass einmal die unbeschichteten Knochen markant bessere Ergebnisse ($p=0,109$) und einmal die RGD-beschichteten bessere Ergebnisse ($0,285$) aufwiesen. Bei zwei weiteren Experimenten ließ sich statistisch mit $p=1,000$ keinerlei Unterschied zwischen den beiden Gruppen feststellen.

Die nachlassenden osteoinduktiven Eigenschaften mit zunehmendem Alter der Spender sowie die Nichtbeachtung gewisser Vorerkrankungen wie beispielsweise Osteoporose könnten durch die Randomisierung die Resultate derart beeinflusst haben.

Bei Versuchen bzgl. der Zelladhäsion humaner osteoblastenähnlicher Zellen auf RGD-beschichteten Oberflächen konnten Rezania und Healy zeigen, dass die initiale Adhäsion (innerhalb der ersten 30 Minuten) durch den Kollagenrezeptor $\alpha_2\beta_1$ vermittelt wird, während der $\alpha_v\beta_3$ -Rezeptor die Langzeitadhäsion regelt [Rezania 1999].

Magdolen et al. kamen zu dem Ergebnis, dass die optionale Beschichtung von Knochenchips mit RGD-Peptiden im Vergleich zu unbeschichteten zu keiner Verbesserung bzgl. der Adhäsion von humanen osteoblastenähnlichen Zellen führt. Verwendet wurden dabei RGD-Peptide, die auch selektiv für die Untereinheit $\alpha_v\beta_3$ und $\alpha_v\beta_5$ der Integrine waren [Magdolen 2006].

Wie bei den osteoblastenähnlichen Zellen lassen sich womöglich die vorliegenden Ergebnisse durch die von Rezania und Healy bereits oben beschriebene These erklären, dass die frühe Adhäsion über den $\alpha_2\beta_1$ -Rezeptor bedingt ist. Da in der vorliegenden Arbeit jedoch $\alpha_v\beta_3$ - und $\alpha_v\beta_5$ -selektives RGD zur Anwendung kam, könnte dies eine Erklärung für den wenig ausgeprägten Effekt hinsichtlich der Endothelzelladhäsion durch optionale RGD-Beschichtung sein.

Grund dafür könnte auch sein, dass zwar die Vorreinigung der Knochen wasserlösliche Komponenten und Fett entfernt, jedoch die unlösliche Kollagen-I-Matrix nicht beeinträchtigt. Kollagen I ist ein Hauptstrukturprotein des Knochens und für die Zelladhäsion auf der Knochenmatrix verantwortlich, auch dann, wenn das Kollagen denaturiert wurde. Folglich stünden durch den $\alpha_2\beta_1$ -Rezeptor, der ein Kollagen-I-Rezeptor ist, genügend Bindungsstellen für die Adhäsion zur Verfügung, so dass die zusätzliche Beschichtung mit RGD-Peptiden aufgrund der Sättigung für die Adhäsion irrelevant wäre [Magdolen 2006]. Daraus könnten Parallelen für den nicht eindeutig positiven Effekt der vorliegenden Adhäsionsversuche durch RGD-Beschichtungen gezogen werden, obgleich Rezania und Healy sowie Magdolen et al. die Tests mit osteoblastenähnlichen Zellen bzw. Osteoblasten durchgeführt haben.

Vergleicht man jedoch alle Einzelversuche innerhalb einer Reinigungsgruppe, so zeigt sich klar, dass in der Acetongruppe mit $p=0,062$ eine statistische Tendenz zur besseren Adhäsion auf Knochen mit zusätzlicher RGD-Beschichtung zu verzeichnen

war, während sich innerhalb der Ultraschallgruppe ($p=0,977$) und der Nativgruppe ($p=0,875$) bzgl. der Adhäsionsrate gegenüber unbeschichteten Stücken kaum ein Unterschied fand.

Wenn man alle Versuchsergebnisse der acetongereinigten und mit Peptid beschichteten Knochen und die anderen, ebenfalls peptidbeschichteten Gruppen nebeneinander stellt, lässt sich ebenso eine bessere Adhäsion auf den Knochen der Acetongruppe gegenüber den Vergleichsgruppen (Nativgruppe $p=0,295$) erkennen, wobei diese verglichen mit der Ultraschallgruppe sogar signifikant war ($p=0,021$).

Diese Ergebnisse erwecken folglich den Eindruck, dass zumindest bei der Endothelzelladhäsion neben $\alpha_2\beta_1$ - auch die $\alpha_v\beta_3$ - und $\alpha_v\beta_5$ -Rezeptoren eine maßgebliche Rolle spielen.

Auch bei *In-vivo*-Versuchen von Marchi-Artzner et al. führte die Beschichtung künstlicher Oberflächen mit einem synthetischen cyclo(-RGDfK-)-Lipopeptid, das selektiv von $\alpha_v\beta_3$ - und $\alpha_v\beta_5$ -Integrin-Rezeptoren erkannt wurde, zu einer signifikant höheren Endothelzelladhäsion und induzierte eine schnellere Ausbreitung dieser als bei der Vergleichsgruppe ohne RGD [Marchi-Artzner 2001].

Alternativ ist denkbar, dass der Knochen durch die Acetonreinigung besser gereinigt und entfettet wird, wodurch eine bessere Adhäsion gewährleistet werden kann. Denn auch bei den Versuchen mit radioaktiv markiertem Peptid konnten bereits mehr Peptide auf den Knochen der Acetongruppe adhäreren, was für eine bessere Reinigungskraft von Aceton gegenüber den anderen Vorbehandlungen spricht.

Unerwartet und überraschend ist jedoch, weshalb die Reinigung mit Ultraschall gegenüber der Nativgruppe einen kontraproduktiven Effekt zeigte. Denn mit einem p-Wert von 0,380 adhärten mehr Endothelzellen auf RGD-beschichtetem Nativknochen als auf RGD-beschichtetem, ultraschallgereinigtem Knochen.

Konträr dazu ist, dass sich in den Vorversuchen hinsichtlich der Adhäsion mit radioaktiv markierten Peptiden bei ultraschallgereinigtem Knochen ein minimal besseres Resultat als bei nativem fand.

Bei den fünf durchgeführten Proliferationsversuchen auf ultraschallgereinigtem Knochen lieferte die zusätzliche Beschichtung mit RGD bei allen Durchgängen bessere Ergebnisse gegenüber den unbeschichteten Knochenwürfeln. In zwei Experimenten bestand dabei mit $p=0,109$ eine statistische Tendenz zur besseren Proliferation der Endothelzellen durch die Beschichtung.

In der Acetongruppe ließ sich hingegen kein rein positiver Effekt nachweisen, da sich in zwei von vier Versuchen mit $p=1,000$ kein Unterschied zeigte. Dafür hatte in den anderen beiden Experimenten die optionale Peptidbeschichtung der acetongereinigten Knochen einen fördernden Einfluss auf die Proliferation der Endothelzellen. Statistisch ließ sich dies sogar einmal mit einer Tendenz von $p=0,109$ untermauern. Im zweiten Versuch lag der p-Wert bei $0,285$.

Auch in der Nativgruppe, also nur nach thermischer Desinfektion ohne zusätzliche Reinigung, war kein eindeutiges Ergebnis erkennbar. Denn einerseits schnitt zweimal die Gruppe mit Peptidbeschichtung besser ab (davon einmal mit $p=0,285$ und einmal mit $p=0,109$ statistisch tendenziell besser), während einmal sogar mit $p=0,593$ die unbeschichtete Vergleichsgruppe nach sechs Tagen mehr Endothelzellproliferation aufwies. Andererseits ließ sich bei einer weiteren Durchführung einmal auch kein Unterschied feststellen ($p=1,000$).

Die unterschiedlichen Resultate der Einzelversuche innerhalb der jeweiligen Reinigungsarten können unter Umständen wie auch schon bei der Adhäsion auf die teilweise schwankende Größe der Knochenkuben, unterschiedlich dichtes Trabekelwerk oder entsprechende Vorerkrankungen der Patienten zurückzuführen sein.

Retrospektiv betrachtet wäre es günstig gewesen, ähnlich wie bei den Radioaktivversuchen, die Endothelzelladhäsion und -proliferation auch auf das Knochengewicht zu beziehen, um alternierende Knochengrößen sowie unterschiedlich dichtes Trabekelwerk und die daraus resultierenden Flächenunterschiede auszugleichen.

Auch von den Altersunterschieden der Spender und den damit variierenden osteoinduktiven Eigenschaften [von Garrel 1998] könnten die abweichenden Ergebnisse innerhalb einer Reinigungsart herrühren, da die Knochenkuben vor Durchführung randomisiert wurden.

Vergleicht man nun, wie bei der Adhäsion auch, alle Versuche innerhalb einer Reinigungsgruppe miteinander, so sind beträchtliche Unterschiede erkennbar.

Die gemessene optische Dichte lag bei der Ultraschallgruppe mit zusätzlich RGD-beschichtetem Knochen mit $p=0,006$ beträchtlich höher als bei den unbeschichteten Knochen. Das heißt, dass insgesamt gesehen statistisch signifikant mehr Endothelzellen auf ultraschallgereinigtem RGD-Knochen proliferierten.

Auch wenn man alle Proliferationsversuche auf acetongereinigtem Knochen zusammenfasst und dann vergleicht, lässt sich erkennen, dass durch die zusätzliche Peptidbeschichtung des Knochens mehr Endothelzellen proliferierten ($p=0,209$).

Selbst in der Nativgruppe zeichnete sich durch zusätzliche Beschichtung des Knochens mit RGD-Peptiden bei der Gesamtbeurteilung ein besseres Ergebnis ab. Mit $p=0,126$ bestand dabei sogar statistisch gesehen eine Tendenz zur besseren Endothelzellproliferation auf optional beschichtetem Knochen.

Bei allen drei Reinigungsgruppen wirkte sich also die zusätzliche Beschichtung mit RGD-Peptiden positiv auf die Proliferationsrate der aufgetragenen Endothelzellen aus.

Am meisten profitierte die Acetongruppe von dieser Vorgehensweise. Denn im direkten Vergleich der drei verschiedenen Reinigungsgruppen mit anschließender optionaler Peptidbeschichtung wiesen die Knochen der Acetongruppe die höchste optische Dichte auf. Diese ist direkt proportional zur Zellmenge auf den Knochen. Es konnten somit durch die Kombination aus Acetonreinigung der Knochen mit anschließender Peptidbeschichtung signifikant mehr Endothelzellen auf den Knochenstücken proliferieren als auf den beiden anderen Vergleichsgruppen ($p=0,003$ gegenüber der Ultraschallgruppe bzw. $p<0,001$ gegenüber der Nativgruppe). Auch in der RGD-beschichteten Ultraschallgruppe proliferierten signifikant mehr Endothelzellen als auf den RGD-beschichteten Knochen der Nativgruppe ($p=0,034$).

In den bereits erwähnten Versuchen von Magdolen et al. konnte zwar keine verbesserte Adhäsion von osteoblastenähnlichen Zellen auf Knochen mit zusätzlicher RGD-Beschichtung, jedoch eine maßgeblich höhere Proliferationsrate dieser nachgewiesen werden [Magdolen 2006], was sich womöglich ebenfalls mit der Aussage Rezanias und Healys begründen lässt, dass der $\alpha_v\beta_3$ -Rezeptor für die Langzeidadhäsion und somit für die Proliferation bedeutsam ist [Rezania 1999].

Auch das in der vorliegenden Arbeit verwendete RGD-Peptid war spezifisch für die Untereinheiten $\alpha_v\beta_3$ und $\alpha_v\beta_5$, so dass in Anlehnung an die Erkenntnisse von Rezania

und Healy sowie Magdolen et al. analog zu den osteoblastenähnlichen Zellen davon auszugehen ist, dass der positive Effekt bei der Proliferation der Endothelzellen auf zusätzlich peptidbeschichtetem Knochen vor allem auf den Rezeptoren der Langzeitadhäsion beruht [Magdolen 2006; Rezania 1999].

Bei der Betrachtung der Ergebnisse stellt sich aber zunächst, unabhängig von der Peptidbeschichtung, die Reinigungsart der Knochen als maßgeblich im Hinblick auf die Endothelzellproliferation dar. Diese Auffassung lässt sich unter anderem dadurch belegen, dass selbst bei den unbeschichteten Knochenstücken signifikant mehr Endothelzellen auf acetongereinigtem Knochen proliferierten als auf den anderen Gruppen ($p < 0,001$) und sich wiederum mehr Zellen auf ultraschallgereinigtem als auf nativem Knochen vermehrten (siehe Abb. 67).

Es ist bekannt, dass die demineralisierte Knochenmatrix induktive Eigenschaften auf den Remodellingprozess *in vivo* hat [Hofmann 2000]. Je nach Desinfektions- bzw. Reinigungsmethode bleibt diese wohl mehr oder weniger erhalten.

Es besteht demnach die Möglichkeit, dass die bereits in den radioaktiv markierten RGD-Adhäsionsversuchen bestätigte bessere Adhäsionsfähigkeit von RGD-Peptiden auf acetongereinigtem Knochen eine höhere Peptiddichte auf Knochen ermöglicht. Eine höhere Peptiddichte korreliert mit Zellausbreitung, Zellüberleben und Proliferation [Larsen 2006]. Die Zelladhäsion ist somit abhängig von der RGD-Oberflächendichte. Es gibt dabei eine kritische Mindestdichte an RGD für die Zellantwort [Hersel 2003]. Mehrere Studien haben bereits gezeigt, dass höhere RGD-Peptiddichten auf unterschiedlichen Oberflächen eine höhere Proliferationsrate von Zellen, auch Endothelzellen, bewirken [Larsen 2006].

Durch bessere Entfettung und Knochenreinigung können mehr RGD-Peptide adhären und folglich mehr Endothelzellen daran binden und proliferieren.

Auch die Größe der Knochenkuben sowie die Dichte des Trabekelwerks sind ein Faktor für die Adhäsionsfähigkeit.

Werden schließlich noch die optischen Dichten (Tab. 16) der einzelnen Adhäsionsversuche mit denen der Proliferation verglichen, so fanden sich bei der Adhäsion fast ausschließlich höhere Werte als bei der Proliferation, was für die These der Inhibierung sprechen könnte, da die optische Dichte direkt proportional zur Zellzahl ist.

Das würde bedeuten, dass die Proliferation schließlich zur Kontaktinhibition der Endothelzellen untereinander geführt und so die Ergebnisse je nach Knochenfläche beeinflusst haben könnte.

Aintablian kam anhand humaner kornealer Endothelzellversuche ebenfalls zur Vermutung der Kontaktinhibition, da nach mehrtägiger Konfluenz und nach Erreichen bestimmter Endothelzellichten die Proliferation abnahm [Aintablian 2003, S. 42].

Dass es bei der Proliferation zum Zelltod mangels Nährstoffen kam, scheint unwahrscheinlich, da das Medium während der Inkubationsphase regelmäßig erneuert wurde.

Schlussfolgernd zeigt sich, dass die optionale Reinigung von Knochen mit Ultraschall oder Aceton einen positiven Einfluss auf die Beschichtungseffizienz von Endothelzellen und RGD-Peptiden hat. Die Endothelzellen adhäreren dabei nach Acetonreinigung am besten. Darüberhinaus ist erkennbar, dass generell die optionale RGD-Beschichtung von Knochen einen positiven Einfluss auf die Endothelzelladhäsion und -proliferation besitzt.

Dies lässt sich auch anhand der durchgeführten Färbungen bestätigen. Sowohl bei den Masson-Goldner-Färbungen (Abb. 52-55) und Toluidinblau-O-Färbungen (Abb. 57-61) als auch bei der Immunhistochemie (Abb. 64-66) zeigte sich unabhängig vom Reinigungsverfahren der Knochen eine gute Vernetzung der Endothelzellen auf RGD-beschichtetem Knochen. Die Färbungen lassen vermuten, dass diese Endothelzellvernetzung auf RGD-unbeschichteten Knochenstücken weniger stark bis kaum ausgeprägt war und die Quantität der Endothelzellen geringer ausfiel.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass *in-vitro* die Acetonreinigung mit konsekutiver RGD-Peptidbeschichtung am besten für eine Optimierung der Endothelzellbesiedelung geeignet ist.

4.3 Ausblick

Weitere Untersuchungen sollen zeigen, ob die durch RGD-Beschichtung erzielte Optimierung der Endothelzellbesiedelung folglich auch einen positiven Einfluss auf die Osteointegration von Knochentransplantaten hat. Andere Arbeiten konnten, wie bereits erwähnt, durch optionale RGD-Beschichtung einen positiven Effekt bzgl. des Einwachsverhaltens von Implantaten erreichen, weshalb die im Rahmen der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnisse vielversprechend für ein verbessertes Einwachsen von Knochentransplantaten sind. Im Rahmen von *in-vivo*-Studien soll daher die Integration reimplantierter RGD-beschichteter Knochen untersucht werden.

5. Zusammenfassung

Die RGD-Sequenz gilt als bedeutsame Bindungsstelle extrazellulärer Matrixproteine. Andere Peptide mit dieser Sequenz können die biologische Aktivität von Matrixproteinen imitieren [Kim 2005]. Als Schlussfolgerung wird postuliert, dass sich durch RGD-Beschichtung von Knochen das Einwachsverhalten durch gesteigerte Zelladhäsion und -proliferation verbessern lässt. Im Rahmen der vorliegenden *In-vitro*-Experimente wurde daher untersucht, wie sich die zusätzliche RGD-Peptidbeschichtung von unterschiedlich vorgereinigtem Knochen auf das Adhäsions- und Proliferationsverhalten aufgebrachtener Endothelzellen auswirkt.

Endothelzellen sind entscheidend für die Angiogenese [Frochot 2007], von der die *In-vivo*-Knochenfunktion abhängig ist [Schaffner 2003]. Das verwendete RGD-Peptid ist neben $\alpha_v\beta_5$ selektiv für das $\alpha_v\beta_3$ -Integrin, das wiederum selektiv auf Endothelzelloberflächen sprossender Blutgefäße überexprimiert wird [Frochot 2007] und somit ein geeignetes Zielintegrin für das verwendete Peptid darstellt.

Anhand der Adhäsionstestung mit radioaktiv markiertem RGD-Peptid konnte gezeigt werden, dass die Knochenmatrix bei allen getesteten Reinigungsverfahren gut für die Adhäsion von RGD zugänglich ist. Durch die im Anschluss an die thermische Desinfektion folgende Acetonreinigung konnten tendenziell mehr Peptide am Knochen adhären als bei den anderen beiden Reinigungsverfahren. Somit hat die optionale Reinigung mit Aceton nach der thermischen Desinfektion den förderndsten Effekt auf die Adhäsionsrate. Mit steigender Peptidkonzentration konnte bei den Radioaktivversuchen auch mehr Peptid adhären, so dass bei den getesteten Konzentrationen keine Sättigung bzgl. der Adhäsionsfähigkeit erreicht wurde.

Zusammenfassend lässt sich anhand der Gesamtbeurteilung jeder Reinigungsart feststellen, dass sich durch die zusätzliche RGD-Beschichtung der Knochenkuben lediglich in der Acetongruppe die Adhäsion von Endothelzellen tendenziell verbessert hat.

Hinsichtlich der Endothelzellproliferation wirkt sich die zusätzliche RGD-Beschichtung bei allen Reinigungsverfahren fördernd aus. In der Ultraschallgruppe wurden dabei sogar signifikant höhere, in der Nativgruppe tendenziell höhere Proliferationsraten gegenüber den unbeschichteten Knochen erreicht. Aber auch hier schnei-

det der acetongereinigte Knochen mit nachfolgender RGD-Beschichtung am besten ab.

Die Vorreinigung der Knochen scheint unabhängig von der RGD-Peptidbeschichtung eine wesentliche Bedeutung für die Endothelzellproliferation zu haben, da sowohl auf den beschichteten als auch auf den unbeschichteten acetongereinigten Knochen höhere Proliferationsraten als auf den Knochen der anderen Gruppen erzielt wurden.

Schlussfolgernd sind die vorliegenden *In-vitro*-Ergebnisse vielversprechend hinsichtlich eines verbesserten Einwachsverhaltens von allogenen Knochentransplantaten durch zusätzliche RGD-Beschichtung.

Darauf aufbauend werden weiterführende tierexperimentelle Studien die Effekte einer RGD-Beschichtung von Knochen *in-vivo* untersuchen.

6. Literaturverzeichnis

Aebi, M. Biologischer oder artifizierter Knochenersatz? Unfallheilkunde 216 (1991) 1-9

Aintablian, A. Untersuchungen zur Anheftung und Ausbildung interzellulärer Kontakte humaner kornealer Endothelzellen in der Zellkultur und nach Transplantation. Dissertation, Universität Hamburg (2003)

Akiyama, S.K. Integrins in Cell Adhesion and Signaling. Hum Cell. 3 (1996) 181-186

Akiyama, S.K., Hasegawa, E., Hasegawa, T., Yamada, K.M. The Interaction of Fibronectin Fragments with Fibroblastic Cells. J. Biol. Chem. 260 (1985) 13256-13260

Aplin, A.E., Howe, A., Alahari, S.K., Juliano, R.L. Signal Transduction and Signal Modulation by Cell Adhesion Receptors: the Role of Integrins, Cadherins, Immunoglobulin-Cell Adhesion Molecules, and Selectins. Pharmacol Rev. 50 (1998) 197-263

Araki, N., Myoui, A., Kuratsu, S., Hashimoto, N., Inoue, T., Kudawara, I., Ueda, T., Yoshikawa, H., Masaki, N., Uchida, A. Intraoperative Extracorporeal Autogenous Irradiated Bone Grafts in Tumor Surgery. Clin Orthop 368 (1999) 196-206

Auernheimer, J., Kessler, H. Benzylprotected Aromatic Phosphonic Acids for Anchoring Peptides on Titanium. Bioorg Med Chem Lett. 16 (2006) 271-273

Auernheimer, J., Zukowski, D., Dahmen, C., Kantlehner, M., Enderle, A., Goodman, S.L., Kessler, H. Titanium Implant Materials with Improved Biocompatibility through Coating with Phosphonate-Anchored Cyclic RGD-Peptides. Chembiochem 6 (2005) 2034-2040

Bezwada, H.P., Shah, A.R., Zambito, K., Cerynik, D.L., Johanson, N.A. Distal Femoral Allograft Reconstruction for Massive Osteolytic Bone Loss in Revision Total Knee Arthroplasty. J Arthroplasty 21 (2006) 242-248

Böhm, P., Fritz, J., Thiede, S., Budach, W. Reimplantation of Extracorporeal Irradiated Bone Segments in Musculoskeletal Tumor Surgery: Clinical Experience in Eight Patients and Review of the Literature. Langenbecks Arch Surg. 387 (2003) 355-365

Böhm, P., Springfield, R., Springer, H. Re-Implantation of Autoclaved Bone Segments in Musculoskeletal Tumor Surgery. Clinical Experience in 9 Patients Followed for 1.1-8.4 Years and Review of the Literature. Arch Orthop Trauma Surg 118 (1998) 57-65

Brooks, P.C., Clark, R.A., Cheresh, D.A. Requirement of Vascular Integrin Alpha v Beta 3 for Angiogenesis. *Science* 264 (1994) 569-571

Bundesärztekammer. Richtlinien zum Führen einer Knochenbank. *Dtsch Arztebl* 98 (2001) A1011-A1016

Chen, C.S., Mrksich, M., Huang, S., Whitesides, G.M., Ingber, D.E. Geometric Control of Cell Life and Death. *Science* 276 (1997) 1425-1428

Chen, J.D., Kim, J.P., Zhang, K., Sarret, Y., Wynn, K.C., Kramer, R.H., Woodley, D.T. Epidermal Growth Factor (EGF) Promotes Human Keratinocyte Locomotion on Collagen by Increasing the $\alpha 2$ Integrin Subunit. *Exp. Cell Res.* 209 (1993) 216-223

Clyman, R.I., Mauray, F., Kramer, R.H. $\beta 1$ and $\beta 3$ Integrins Have Different Roles in the Adhesion and Migration of Vascular Smooth Muscle Cells on Extracellular Matrix. *Exp. Cell Res.* 200 (1992) 272-284

Colombo, M., Bianchi, A. Click Chemistry for the Synthesis of RGD-Containing Integrin Ligands. *Molecules* 15 (2010) 178-197

Danen, E.H.J. Integrins: Regulators of Tissue Function and Cancer Progression. *Curr Pharm Des.* 7 (2005) 881-891

Danen, E.H.J., Yamada, K.M. Fibronectin, Integrins, and Growth Control. *J Cell Physiol* 189 (2001) 1-13

DeLisser, H.M., Christofidou-Solomidou, M., Strieter, R.M., Burdick, M.D., Robinson, C.S., Wexler, R.S., Kerr, J.S., Garlanda, C., Merwin, J.R., Madri, J.A., Albelda, S.M. Involvement of Endothelial PECAM-1/CD31 in Angiogenesis. *Am. J. Pathol* 151 (1997) 671-677

Diehl, P., Schmitt, M., Schauwecker, J., Eichelberg, K., Gollwitzer, H., Gradinger, R., Goebel, M., Preissner, K.T., Mittelmeier, W., Magdolen, U. Effect of High Hydrostatic Pressure on Biological Properties of Extracellular Bone Matrix Proteins. *Int J Mol Med* 16 (2005) 285-289

Eliceiri, B.P., Cheresh, D.A. Adhesion Events in Angiogenesis. *Curr. Opin. Cell Biol.* 13 (2001) 563-568

Elmengaard, B., Bechtold, J.E., Søballe, K. In Vivo Effects of RGD-Coated Titanium Implants Inserted in Two Bone-Gap Models. *J Biomed Mater Res A.* 75 (2005a) 249-255

Elmengaard, B., Bechtold, J.E., Søballe, K. In Vivo Study of the Effect of RGD Treatment on Bone Ongrowth on Press-Fit Titanium Alloy Implants. *Biomaterials* 26 (2005b) 3521-3526

Engelhard, E. Adhäsion und Differenzierung humaner mesenchymaler Progenitorzellen auf Poly-Ethylen-Glykol-beschichteten und durch lineare und zyklische RGD-Peptide funktionalisierten Oberflächen. Dissertation, Universität Ulm (2005)

Europäisches Parlament und Europäischer Rat. Richtlinie 2004/23/EG des Europäischen Parlaments und des Rates vom 31. März 2004 zur Festlegung von Qualitäts- und Sicherheitsstandards für die Spende, Beschaffung, Testung, Verarbeitung, Konservierung, Lagerung und Verteilung von menschlichen Geweben und Zellen. ABI. EU L 102 (2004) 48-58

Farid, Y., Lin, P.P., Lewis, V.O., Yasko, A.W. Endoprosthetic and Allograft-Prosthetic Composite Reconstruction of the Proximal Femur for Bone Neoplasms. Clin Orthop 442 (2006) 223-229

Finsinger, D. Peptidische und peptidanaloge Antagonisten des Integrins $\alpha\beta 3$ – Beiträge zum Verständnis zellulärer Adhäsion. Dissertation, Technische Universität München (1997)

Flören, M., Kappe, T., Reichel, H. Effektivitätsanalyse einer klinikinternen allogenen Knochenbank. Orthopäde 36 (2007) 667-672

Folkman, H., Klagsbrun, M. Angiogenic Factors. Science 235 (1987) 442-447

Friedlander, M., Brooks, P.C., Shaffer, R.W., Kincaid, C.M., Varner, J.A., Cheresch, D.A. Definition of Two Angiogenic Pathways by Distinct αv Integrins. Science 270 (1995) 1500-1502

Frochot, C., Di Stasio, B., Vanderesse, R., Belgy, M.-J., Dodeller, M., Guillemin, F., Viriot, M.-L., Barberi-Heyob, M. Interest of RGD-Containing Linear or Cyclic Peptide Targeted Tetraphenylchlorin as Novel Photosensitizers for Selective Photodynamic Activity. Bioorg Chem 35 (2007) 205–220

Gamradt, S.C., Lieberman, J.R. Bone Graft For Revision Hip Arthroplasty: Biology and Future Applications. Clin Orthop 417 (2003) 183-194

Gasparini, G. Prognostic and Predictive Value of Intra-Tumoral Microvessel Density in Human Solid Tumours. In "Tumour Angiogenesis", Bicknell, R., Lewis, C.E., Ferrara, N. (Eds.), Oxford University Press, Oxford-New York, 1997, 29-44

Harris, J. Differentiated Cells and the Maintenance of Tissues. In "Molecular Biology of the Cell", Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J.D. (Eds.), Garland Publishing, New York, 1994, 3rd Edition, 1139-1194

Hersel, U., Dahmen, C., Kessler, H. RGD Modified Polymers: Biomaterials for Stimulated Cell Adhesion and Beyond. Biomaterials 24 (2003) 4385-4415

Hildebrand, M. Entfetten. In: „Vergleichende und funktionelle Anatomie der Wirbeltiere“, Distler, C. (Hrsg.), Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, 2004, 1. Auflage, 663

Hofmann, A., Hofmann, C., Gotzen, L. Einfluß verschiedener Knochendesinfektions- und Sterilisationsverfahren auf die Osteoblastenfunktion. Unfallchirurg 103 (2000) 380-388

Holland, J., Hersh, L., Bryhan, M., Onyiriuka, E., Ziegler, L. Culture of Human Vascular Endothelial Cells on an RGD-Containing Synthetic Peptide Attached to a Starch-Coated Polystyrene Surface: Comparison with Fibronectin-Coated Tissue Grade Polystyrene. Biomaterials 17 (1996) 2147-2156

Horak, E.R., Leek, R., Klenk, N., LeJeune, S., Smith, K., Stuart, N., Greenall, M., Stepniwska, K., Harris, A.L. Angiogenesis, Assessed by Platelet/Endothelial Cell Adhesion Molecule Antibodies, as Indicator of Node Metastases and Survivals in Breast Cancer. Lancet 340 (1992) 1120-1124

Hornicek, F.J., Gebhardt, M.C., Tomford, W.W., Sorger, J.I., Zavatta, M., Menzner, J.P., Mankin, H.J. Factors Affecting Nonunion of the Allograft-Host Junction. Clin Orthop 382 (2001) 87-98

Horowitz, S.M., Glasser, D.B., Lane, J.M., Healey, J.H. Prosthetic and Extremity Survivorship After Limb Salvage for Sarcoma. How Long Do the Reconstructions Last? Clin Orthop 293 (1993) 280-286

Hosny, G., Fadel, M. Ilizarov External Fixator for Open Fractures of the Tibial Shaft. Int Orthop. 27 (2003) 303-306

Hynes, R.O. Integrins: Versatility, Modulation, and Signaling in Cell Adhesion. Cell 69 (1992) 11-25

Hynes, R.O. A Reevaluation of Integrins as Regulators of Angiogenesis. Science 8 (2002) 918-921

Illario, M., Cavallo, A.L., Monaco, S., Di Vito, E., Mueller, F., Marzano, L.A., Troncone, G., Fenzi, G., Rossi, G., Vitale, M. Fibronectin-Induced Proliferation in Thyroid Cells is Mediated by Alpha v Beta 3 Integrin Through Ras/Raf-1/MEK/ERK and Calcium/CaMKII Signals. J Clin Endocrinol Metab. 90 (2005) 2865-2873

Ishikawa, A., Zhou, Y.-M., Kambe, N., Nakayama, Y. Enhancement of Star Vector-Based Gene Delivery to Endothelial Cells by Addition of RGD-Peptide. Bioconjug Chem. 19 (2008) 558-561

James, J.I.P. Tuberculosis Transmitted by Banked Bone. J Bone Joint Surg 35-B (1953) 578-586

Just, H.-M., Roggenkamp, E. Hygiene in der Medizintechnik. In: „Medizintechnik: Verfahren - Systeme - Informationsverarbeitung“, Kramme, R. (Hrsg.), Springer Medizin Verlag, Heidelberg, 2007, 3. Auflage, 15-36

- Kainer, M.A., Linden, J.V., Whaley, D.N., Holmes, H.T., Jarvis, W.R., Jernigan, D.B., Archibald, L.K. Clostridium Infections Associated with Musculoskeletal-Tissue Allografts. *N Engl J Med* 350 (2004) 2564-2571
- Kantlehner, M., Schaffner, P., Finsinger, D., Mayer, J., Jonczyk, A., Diefenbach, B., Nies, B., Hölzermann, G., Goodman, S.L., Kessler, H. Surface Coating with Cyclic RGD Peptides Stimulates Osteoblast Adhesion and Proliferation as well as Bone Formation. *Chembiochem* 1 (2000) 107-114
- Kim, J., Hong, S.-Y., Park, H.-S., Kim, D.-S., Lee, W. Structure and Function of RGD Peptides Derived from Disintegrin Proteins. *Mol. Cells* 19 (2005) 205-211
- Kim, S., Bell, K., Mousa, S.A., Varner, J.A. Regulation of Angiogenesis In Vivo by Ligation of Integrin Alpha5Beta1 with the Central Cell-Binding Domain of Fibronectin. *Am J Pathol.* 156 (2000) 1345-1362
- Krämer, J., Grifka, J. "Orthopädie". Kap. 4.2 Metabolische Knochenerkrankungen und Knochenumbaustörungen. Springer-Verlag, Heidelberg-Berlin, 2002, 6. Auflage, 127-142
- Kumar, C.C., Malkowski, M., Yin, Z., Tanghetti, E., Yaremko, B., Nechuta, T., Varner, J., Liu, M., Smith, E.M., Neustadt, B., Presta, M., Armstrong, L. Inhibition of Angiogenesis and Tumor Growth by SCH221153, a Dual $\alpha\beta 3$ and $\alpha\beta 5$ Integrin Receptor Antagonist. *Cancer Res.* 61 (2001) 2232-2238
- Landegren, U. Measurements of Cell Numbers by the Means of the Endogenous Enzyme Hexosaminidase. *J Immun Methods* 67 (1984) 379-388
- Larsen, C.C., Kligman, F., Kottke-Marchant, K., Marchant, R.E. The Effect of RGD Fluorosurfactant Polymer Modification of ePTFE on Endothelial Cell Adhesion, Growth, and Function. *Biomaterials* 27 (2006) 4846-4855
- Lemarchand, P., Jaffe, H.A., Danel, C., Cid, M.C., Kleinman, H.K., Stratford-Perricaudet, L.D., Perricaudet, M., Pavirani, A., Lecoq, J.P., Crystal, R.G. Adenovirus-Mediated Transfer of a Recombinant Human Alpha 1-Antitrypsin cDNA to Human Endothelial Cells. *Proc. Natl. Acac. Sci. USA* 89 (1992) 6482-6486
- Li, J., Ding, M., Fu, Q., Tan, H., Xie, X., Zhong, Y. A Novel Strategy to Graft RGD Peptide on Biomaterials Surfaces for Endothelization of Small-Diameter Vascular Grafts and Tissue Engineering Blood Vessel. *J Mater Sci Mater Med* 19 (2008) 2595–2603
- Lindl, T. „Zell- und Gewebekultur: Einführung in die Grundlagen sowie ausgewählte Methoden und Anwendungen". Kap. 5.5 Langzeitlagerung und Kryokonservierung von Zellen. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg-Berlin, 2002, 5., überarbeitete und erweiterte Auflage, 115-119

Liotta, L.A. Tumor Invasion and Metastases – Role of the Extracellular Matrix. *Cancer Res.* 46 (1986) 1-7

Lorger, M., Krueger, J.S., O'Neal, M., Staflin, K., Felding-Habermann, B. Activation of Tumor Cell Integrin $\alpha\beta 3$ Controls Angiogenesis and Metastatic Growth in the Brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 106 (2009) 10666-10671

Magdolen, U., Auernheimer, J., Dahmen, C., Schauwecker, J., Gollwitzer, H., Tübel, J., Gradinger, R., Kessler, H., Schmitt, M., Diehl, P. Growth Promoting In Vitro Effect of Synthetic Cyclic RGD-Peptides on Human Osteoblastlike Cells Attached to Cancellous Bone. *Int J Mol Med.* 17 (2006) 1017-1021

Malinda, K.M., Kleinman, H.K. The Laminins. *Int J Biochem Cell Biol.* 28 (1996) 957-959

Marchi-Artzner, V., Lorz, B., Hellerer, U., Kantlehner, M., Kessler, H., Sackmann, E. Selective Adhesion of Endothelial Cells to Artificial Membranes with a Synthetic RGD-Lipopeptide. *Chem. Eur. J.* 7 (2001) 1095-1101

Marcus, R., Peritz, E., Gabriel, K.R. On Closed Testing Procedures with Special Reference to Ordered Analysis of Variance. *Biometrika* 63 (1976) 655-660

Matter, H.-P., von Garrel, T., Bilderbeek, U., Mittelmeier, W. Biomechanical Examinations of Cancellous Bone Concerning the Influence of Duration and Temperature of Cryopreservation. *J Biomed Mater Res.* 55 (2001) 40-44

Mittermayer, F., Krepler, P., Dominkus, M., Schwameis, E., Sluga, M., Heinzl, H., Kotz, R. Long-term Followup of Uncemented Tumor Endoprostheses for the Lower Extremity. *Clin Orthop* 388 (2001) 167-177

Miyamoto, S., Akiyama, S.K., Yamada, K.M. Synergistic Roles for Receptor Occupancy and Aggregation in Integrin Transmembrane Function. *Science* 267 (1995) 883-885

Mortarini, R., Gismondi, A., Santoni, A., Parmiani, G., Anichini, A. Role of the Alpha 5 Beta 1 Integrin Receptor in the Proliferative Response of Quiescent Human Melanoma Cells to Fibronectin. *Cancer Res* 52 (1992) 4499-4506

Natarajan, M.V., Sivaseelam, A., Rajkumar, G., Hussain, S.H.J. Custom Mega-prosthetic Replacement for Proximal Tibial Tumours. *Int Orthop.* 27 (2003) 334-337

Parikh, S.N. Bone Graft Substitutes: Past, Present, Future. *J Postgrad Med.* 48 (2002) 142-148

Parums, D.V., Cordell, J.L., Micklem, K., Heryet, A.R., Gatter, K.C., Mason, D.Y. JC70: A New Monoclonal Antibody That Detects Vascular Endothelium Associated Antigen on Routinely Processed Tissue Sections. *J Clin Pathol* 43 (1990) 752-757

- Pierschbacher, M.D., Ruoslahti, E. Cell Attachment Activity of Fibronectin Can Be Duplicated by Small Synthetic Fragments of the Molecule. *Nature* 309 (1984) 30-33
- Pruss, A., Kao, M., Gohs, U., Koscielny, J., von Versen, R., Pauli, G. Effect of Gamma Irradiation on Human Cortical Bone Transplants Contaminated with Enveloped and Non-enveloped Viruses. *Biologicals* 30 (2002) 125–133
- Pruss, A. Chemische und physikalische Verfahren zur Inaktivierung von pathogenen Mikroorganismen in allogenen Knochentransplantaten. Habilitationsschrift, Medizinische Fakultät Charité, Berlin (2004)
- Pruss, A., Kao, M., von Garrel, T., Frommelt, L., Gürtler, L., Benedix, F., Pauli, G. Virus Inactivation in Bone Tissue Transplantats (Femoral Heads) by Moist Heat with the "Marburg Bone Bank System". *Biologicals* 31 (2003a) 75-82
- Pruss, A., Seibold, M., Benedix, F., Frommelt, L., von Garrel, T., Gürtler, L., Dörffel, Y., Pauli, G., Göbel, U.B. Validation of the "Marburg Bone Bank System" for Thermoinactivation of Allogenic Femoral Head Transplants Using Selected Bacteria, Fungi, and Spores. *Biologicals* 31 (2003b) 287-294
- Rezania, A., Healy, K.E. Integrin Subunits Responsible for Adhesion of Human Osteoblast-Like Cells to Biomimetic Peptide Surfaces. *J. Orthop. Res.* 17 (1999) 615-623
- Romeis, B. „Mikroskopische Technik“. Kap. 10 Die Färbung, 677. R. Oldenbourg Verlag, München, 1948, 15. Auflage, 160f.
- Rueger, J.M. Knochenersatzmittel. Heutiger Stand und Ausblick. *Der Orthopäde* 27 (1998) 72-79
- Ruoslahti, E. RGD and Other Recognition Sequences for Integrins. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 12 (1996) 697-715
- Ruoslahti, E., Pierschbacher, M.D. New Perspectives in Cell Adhesion: RGD and Integrins. *Science* 238 (1987) 491-497
- Rupp, P.A., Little, C.D. Integrins in Vascular Development. *Circ. Res.* 89 (2001) 566-572
- Samanen, J., Jonak, Z., Rieman, D., Yue, T.L. Vascular Indications for Integrin α_v Antagonists. *Curr. Pharm. Des.* 3 (1997) 545-584
- Sarkar, M.R., Kinzl, L., Harwig, E. Defektrekonstruktion bei Tumoren des Knochens und der Gelenke. *Akt Traumatol* 33 (2003) 215-227
- Schaffner, P., Dard, M.M. Structure and Function of RGD Peptides Involved in Bone Biology. *Cell Mol Life Sci.* 60 (2003) 119-132
- Schratt, H.E., Regel, G., Kieseewetter, B., Tscherne, H. HIV-Infektion nach allogener Knochentransplantation. *Unfallchirurg* 99 (1996) 679-684

Schwartz, I., Seger, D., Shaltiel, S. Vitronectin. *Int J Biochem Cell Biol.* 31 (1999) 539-544

Sepp, N.T., Li, L.J., Lee, K.H., Brown, E.J., Caughman, S.W., Lawley, T.J., Swerlick, R.A. Basic Fibroblast Growth Factor Increases Expression of the Alpha v Beta 3 Integrin Complex on Human Microvascular Endothelial Cells. *J Invest Dermatol.* 103 (1994) 295-299

Shattil, S.J. Function and Regulation of the Beta 3 Integrins in Hemostasis and Vascular Biology. *Thromb Haemost.* 74 (1995) 149-155

Sheu, J.R., Yen, M.H., Kan, Y.C., Hung, W.C., Chang, P.T., Luk, H.N. Inhibition of Angiogenesis In Vitro and In Vivo: Comparison of the Relative Activities of Triflavin, an Arg-Gly-Asp-Containing Peptide and Anti-Alpha(v)Beta3 Integrin Monoclonal Antibody. *Biochim Biophys Acta* 1336 (1997) 445-454

Shibata, H., Yagi, T. Rate Assay of N-Acetyl-Beta-D-Hexosaminidase with 4-Nitrophenyl N-Acetyl-Beta-D-Glucosaminide as an Artificial Substrate. *Clinica Chim Acta* 251 (1996) 53-64

Shutkin, N.M. Homologous-Serum Hepatitis Following the Use of Refrigerated Bone-Bank Bone. Report of a Case. *J Bone Joint Surg* 36-A (1954) 160-162

Sorger, J.I., Hornicek, F.J., Zavatta, M., Menzner, J.P., Gebhardt, M.C., Tomford, W.W., Mankin, H.J. Allograft Fractures Revisited. *Clin Orthop* 382 (2001) 66-74

Steinhauser, E., Liebendörfer, A., Enderle, A., Bader, R., Kerschbaumer, S., Brill, T., Busch, R., Gradinger, R. In vivo-Studie zur knöchernen Integration von RGD-Peptid-beschichteten und unbeschichteten metallischen Implantaten. *Materialprüfung* 47 (2005) 197-202

Stevenson, S. Enhancement of Fracture Healing with Autogenous and Allogenic Bone Grafts. *Clin Orthop* 355 (1998) 239-246

Strömblad, S., Becker, J.C., Yebra, M., Brooks, P.C., Cheresch, D.A. Suppression of p53 Activity and p21WAF1/CIP1 Expression by Vascular Cell Integrin $\alpha\beta 3$ During Angiogenesis. *J. Clin. Invest.* 98 (1996) 426-433

Sugimoto, M., Takahashi, S., Toguchida, J., Kotoura, Y., Shibamoto, Y., Yamamuro, T. Changes in Bone After High-Dose Irradiation. *Biomechanics and Histomorphology.* *J Bone Joint Surg Br* 73 (1991) 492-497

Timpl, R., Rhode, H., Robey, P.G., Rennard, S.I., Foidart, J.M., Martin, G.R. Laminin-a Glycoprotein from Basement Membranes. *J Biol Chem.* 254 (1979) 9933-9937

Verrier, S., Pallu, S., Bareille, R., Jonczyk, A., Meyer, J., Dard, M., Amédée, J. Function of Linear and Cyclic RGD-Containing Peptides in Osteoprogenitor Cells Adhesion Process. *Biomaterials* 23 (2002) 585-596

von Garrel, T., Gotzen, L. Allogenic Bone Transplantation and Bone Banking. Unfallchirurg 101 (1998) 713-727

Ware, J.A. Cellular Mechanisms of Angiogenesis. In "Angiogenesis and Cardiovascular Disease", Ware, J.A., Simons, M. (Eds.), Oxford University Press, New York, 1999, 30-59

Weaver, V.M., Roskelley, C.D. Extracellular Matrix: The Central Regulator of Cell and Tissue Homeostasis. Trends Cell Biol 7 (1997) 40-42

Winter, E., Weller, S., Höntzsch, D. Die Pfannenaufbauplastik bei Revisionseingriffen nach operativem Hüftgelenkersatz. Op Journal 10 (1994) 273-279

Wissenschaftlicher Beirat der Bundesärztekammer. Richtlinien zum Führen einer Knochenbank. Dtsch Arztebl 87 (1990) A59-A62

Wu, K.K., Thiagarajan, P. Role of Endothelium in Thrombosis and Hemostasis. Annu. Rev. Med. 47 (1996) 315-331

Yang, R., Davies, C.M., Archer, C.W., Richards, R.G. Immunohistochemistry of Matrix Markers in Technovit 9100 New®-Embedded Undecalcified Bone Sections. Eur Cell Mater 6 (2003) 57-71

Zoricic, S., Bobinac, D., Lah, B., Maric, I., Cvijanovic, O., Bajek, S., Golubovic, V., Mihelic, R. Study of the Healing Process After Transplantation of Pasteurized Bone Grafts in Rabbits. Acta Med Okayama 56 (2002) 121-128

7. Anhang

7.1 Statistische Ergebnisse

Nota bene: Im Folgenden werden die Dezimalzahlen aufgrund des verwendeten Programms (SPSS V.15.0) wie in der englischen Sprache üblich mit Dezimalpunkt geschrieben statt wie im Deutschen mit Komma.

7.1.1 Vergleich der Radioaktiv-RGD-Adhäsion auf den unterschiedlich gereinigten Knochenkuben innerhalb einer Konzentration

7.1.1.1 Konzentration 1 µmol:

Reinigungsart des Knochens	Adhärentes Radioaktiv-RGD pro Gramm Knochengewicht							
	Median	Percentile 05	Percentile 95	Minimum	Maximum	Mean	Standard Deviation	Count
Aceton	9.5	7.1	12.6	7.1	12.6	9.8	2.8	3
Nativ	2.6	2.5	3.0	2.5	3.0	2.7	.3	3
Ultraschall	3.3	1.7	3.6	1.7	3.6	2.9	1.0	3
Total	3.3	1.7	12.6	1.7	12.6	5.1	3.8	9

Test Statistics (a,b)

	RGD pro Gewicht
Chi-Square	5.600
df	2
Asymp. Sig.	.061

a Kruskal Wallis Test

b Grouping Variable: Art

Mann-Whitney Test

Ranks

Art	N	Mean Rank	Sum of Ranks
RGD pro Gewicht Aceton	3	5.00	15.00
Nativ	3	2.00	6.00
Total	6		

Test Statistics (b)

	RGD pro Gewicht
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	6.000
Z	-1.964
Asymp. Sig. (2-tailed)	.050
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.100 (a)

a Not corrected for ties.

b Grouping Variable: Art

Mann-Whitney Test

Ranks

Art	N	Mean Rank	Sum of Ranks
RGD pro Gewicht Aceton	3	5.00	15.00
Ultraschall	3	2.00	6.00
Total	6		

Test Statistics (b)

	RGD pro Gewicht
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	6.000
Z	-1.964
Asymp. Sig. (2-tailed)	.050
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.100 (a)

a Not corrected for ties.

b Grouping Variable: Art

Mann-Whitney Test

Ranks

Art	N	Mean Rank	Sum of Ranks
RGD pro Gewicht Nativ	3	3.00	9.00
Ultraschall	3	4.00	12.00
Total	6		

Test Statistics (b)

	RGD pro Gewicht
Mann-Whitney U	3.000
Wilcoxon W	9.000
Z	-.655
Asymp. Sig. (2-tailed)	.513
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.700 (a)

a Not corrected for ties.

b Grouping Variable: Art

7.1.1.2 Konzentration 10 µmol:

Reinigungsart des Knochens	Adhärentes Radioaktiv-RGD pro Gramm Knochengewicht							
	Median	Percentile 05	Percentile 95	Minimum	Maximum	Mean	Standard Deviation	Count
Aceton	67.9	58.3	76.9	58.3	76.9	67.7	9.3	3
Ultraschall	20.4	15.4	29.1	15.4	29.1	21.6	6.9	3
Total	43.7	15.4	76.9	15.4	76.9	44.7	26.3	6

Test Statistics (b)

	RGD pro Gewicht
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	6.000
Z	-1.964
Asymp. Sig. (2-tailed)	.050
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.100 (a)

a Not corrected for ties.

b Grouping Variable: Art

7.1.1.3 Konzentration 72 µmol:

Reinigungsart des Knochens	Adhärentes Radioaktiv-RGD pro Gramm Knochengewicht							
	Median	Percentile 05	Percentile 95	Minimum	Maximum	Mean	Standard Deviation	Count
Aceton	534.4	526.2	542.6	526.2	542.6	534.4	11.6	2
Nativ	198.5	166.0	246.3	166.0	246.3	203.6	40.4	3
Ultraschall	254.1	118.6	335.3	118.6	335.3	236.0	109.5	3
Total	250.2	118.6	542.6	118.6	542.6	298.4	159.2	8

Test Statistics (a,b)

	RGD pro Gewicht
Chi-Square	4.250
df	2
Asymp. Sig.	.119

a Kruskal Wallis Test

b Grouping Variable: Art

Mann-Whitney Test

Ranks

	Art	N	Mean Rank	Sum of Ranks
RGD pro Gewicht	Aceton	2	4.50	9.00
	Nativ	3	2.00	6.00
	Total	5		

Test Statistics (b)

	RGD pro Gewicht
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	6.000
Z	-1.732
Asymp. Sig. (2-tailed)	.083
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.200 (a)

a Not corrected for ties.

b Grouping Variable: Art

Mann-Whitney Test

Ranks

Art		N	Mean Rank	Sum of Ranks
RGD pro Gewicht	Aceton	2	4.50	9.00
	Ultraschall	3	2.00	6.00
	Total	5		

Test Statistics (b)

	RGD pro Gewicht
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	6.000
Z	-1.732
Asymp. Sig. (2-tailed)	.083
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.200 (a)

a Not corrected for ties.

b Grouping Variable: Art

Mann-Whitney Test

Ranks

Art		N	Mean Rank	Sum of Ranks
RGD pro Gewicht	Nativ	3	3.00	9.00
	Ultraschall	3	4.00	12.00
	Total	6		

Test Statistics (b)

	RGD pro Gewicht
Mann-Whitney U	3.000
Wilcoxon W	9.000
Z	-.655
Asymp. Sig. (2-tailed)	.513
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.700 (a)

a Not corrected for ties.

b Grouping Variable: Art

7.1.2 Vergleich der Radioaktiv-RGD-Adhäsion bei unterschiedlichen Konzentrationen innerhalb einer Reinigungsart

7.1.2.1 Aceton

Konzentration	Adhärentes Radioaktiv-RGD pro Gramm Knochengewicht							
	Median	Percentile 05	Percentile 95	Minimum	Maximum	Mean	Standard Deviation	Count
1	9.5	7.1	12.6	7.1	12.6	9.8	2.8	3
10	67.9	58.3	76.9	58.3	76.9	67.7	9.3	3
72	534.4	526.2	542.6	526.2	542.6	534.4	11.6	2
Total	63.1	7.1	542.6	7.1	542.6	162.6	231.1	8

Test Statistics (a,b)

	RGD pro Gewicht
Chi-Square	6.250
df	2
Asymp. Sig.	.044

a Kruskal Wallis Test

b Grouping Variable: Konzentration

Mann-Whitney Test

Ranks

	Konzentration	N	Mean Rank	Sum of Ranks
RGD pro Gewicht	1	3	2.00	6.00
	10	3	5.00	15.00
	Total	6		

Test Statistics (b)

	RGD pro Gewicht
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	6.000
Z	-1.964
Asymp. Sig. (2-tailed)	.050
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.100 (a)

a Not corrected for ties.

b Grouping Variable: Konzentration

Mann-Whitney Test

Ranks

	Konzentration	N	Mean Rank	Sum of Ranks
RGD pro Gewicht	10	3	2.00	6.00
	72	2	4.50	9.00
	Total	5		

Test Statistics (b)

	RGD pro Gewicht
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	6.000
Z	-1.732
Asymp. Sig. (2-tailed)	.083
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.200 (a)

a Not corrected for ties.

b Grouping Variable: Konzentration

7.1.2.2 Nativ

Konzentration	Adhärentes Radioaktiv-RGD pro Gramm Knochengewicht							
	Median	Percentile 05	Percentile 95	Minimum	Maximum	Mean	Standard Deviation	Count
1	2.6	2.5	3.0	2.5	3.0	2.7	.3	3
72	198.5	166.0	246.3	166.0	246.3	203.6	40.4	3
Total	84.5	2.5	246.3	2.5	246.3	103.1	113.0	6

Test Statistics (b)

	RGD pro Gewicht
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	6.000
Z	-1.964
Asymp. Sig. (2-tailed)	.050
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.100 (a)

a Not corrected for ties.

b Grouping Variable: Konzentration

7.1.2.3 Ultraschall

Konzentration	Adhärentes Radioaktiv-RGD pro Gramm Knochengewicht							
	Median	Percentile 05	Percentile 95	Minimum	Maximum	Mean	Standard Deviation	Count
1	3.3	1.7	3.6	1.7	3.6	2.9	1.0	3
10	20.4	15.4	29.1	15.4	29.1	21.6	6.9	3
72	254.1	118.6	335.3	118.6	335.3	236.0	109.5	3
Total	20.4	1.7	335.3	1.7	335.3	86.8	124.9	9

Test Statistics (a,b)

	RGD pro Gewicht
Chi-Square	7.200
df	2
Asymp. Sig.	.027

a Kruskal Wallis Test

b Grouping Variable: Konzentration

Mann-Whitney Test

Ranks

	Konzentration	N	Mean Rank	Sum of Ranks
RGD pro Gewicht	1	3	2.00	6.00
	10	3	5.00	15.00
	Total	6		

Test Statistics (b)

	RGD pro Gewicht
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	6.000
Z	-1.964
Asymp. Sig. (2-tailed)	.050
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.100 (a)

a Not corrected for ties.

b Grouping Variable: Konzentration

Mann-Whitney Test

Ranks

	Konzentration	N	Mean Rank	Sum of Ranks
RGD pro Gewicht	10	3	2.00	6.00
	72	3	5.00	15.00
	Total	6		

Test Statistics (b)

	RGD pro Gewicht
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	6.000
Z	-1.964
Asymp. Sig. (2-tailed)	.050
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.100 (a)

a Not corrected for ties.

b Grouping Variable: Konzentration

7.1.3 Hauptversuche Endothelzelladhäsion und -proliferation

7.1.3.1 Messreihen Adhäsion

Anhang

Adhäsion	Knochen ohne Endothelzellen,			Knochen mit Endothelzellen,			Knochen mit Endothelzellen,			Knochenverunreinigung,			vom Knochen gefallene Endothelzellen,			vom Knochen gefallene Endothelzellen,		
	ohne RGD (Leerwert)			ohne RGD			mit RGD			ohne RGD			ohne RGD			mit RGD		
Versuch	Wdh. 1	Wdh. 2	Wdh. 3	Wdh. 1	Wdh. 2	Wdh. 3	Wdh. 1	Wdh. 2	Wdh. 3	Wdh. 1	Wdh. 2	Wdh. 3	Wdh. 1	Wdh. 2	Wdh. 3	Wdh. 1	Wdh. 2	Wdh. 3
1 (Ultraschall)	0,084	0,076	0,102	0,228	0,219	0,238	0,214	0,218	0,215									
2 (Ultraschall)	0,233	0,354	0,331	0,689	0,736	0,946	0,644	0,554	0,570	0,072	0,078		0,711	0,716		0,719	0,665	
3 (Aceton)	0,272	0,226	0,252	0,517	0,532	0,588		0,653	0,623	0,084	0,077		0,533	0,451		0,384	0,303	
4 (nativ)	0,182	0,152	0,164	0,587	0,580	0,569	0,530	0,567	0,568	0,090	0,095	0,102	0,262	0,753	0,889	0,692	0,817	0,457
5 (nativ)	0,179	0,228	0,209	0,499	0,314	0,377	0,323	0,349	0,442	0,084	0,087	0,098	0,197	0,260	0,129	0,296	0,215	0,191
6 (nativ)	0,145	0,173	0,219	0,414	0,471	0,378	0,423	0,305	0,502	0,084	0,088	0,091	0,256	0,214	0,445	0,278	0,229	0,454
7 (Aceton)	0,151	0,141	0,130	0,533	0,436	0,333	0,326	0,474	0,519	0,089	0,094	0,093	0,361	0,132	0,552	0,499	0,205	0,280
8 (Aceton)	0,143	0,152	0,144	0,274	0,395	0,414	0,413	0,470	0,481	0,095	0,094	0,090	0,304	0,355	0,304	0,213	0,155	0,260
9 (nativ)	0,138	0,168	0,201	0,308	0,333	0,323	0,383	0,370	0,315	0,076	0,082	0,101	0,131	0,088	0,118	0,123	0,147	0,111
10 (Ultraschall)	0,130	0,114	0,117	0,319	0,418	0,328	0,374	0,411	0,445	0,086	0,088	0,098	0,170	0,122	0,102	0,112	0,193	0,107
11 (Ultraschall)	0,114	0,139	0,109	0,28	0,291	0,288	0,284	0,304	0,345	0,083	0,085	0,090	0,102	0,092	0,224	0,097	0,114	0,112
12 (Aceton)	0,321	0,314	0,290	0,464	0,487	0,433	0,498	0,460	0,475	0,315	0,278	0,346	0,417	0,368	0,395	0,347	0,311	0,300
13 (Ultraschall)	0,196	0,154	0,181	0,224	0,243	0,253	0,284	0,309	0,223	0,089	0,089	0,090	0,151	0,104	0,111	0,098	0,092	0,123

Anhang

Adhäsion	Kontrollen											
	10.000 Endothelzellen ohne RGD, ohne Knochen			20.000 Endothelzellen ohne RGD, ohne Knochen			40.000 Endothelzellen ohne RGD, ohne Knochen			keine Zellen, kein RGD, kein Knochen (Blankwert)		
Versuch	Wdh. 1	Wdh. 2	Wdh. 3	Wdh. 1	Wdh. 2	Wdh. 3	Wdh. 1	Wdh. 2	Wdh. 3	Wdh. 1	Wdh. 2	Wdh. 3
1 (Ultraschall)	0,092	0,107	0,125	0,241	0,233	0,237	0,359	0,422	0,375	0,069	0,075	0,069
2 (Ultraschall)	0,174	0,127		0,261	0,215		0,872	0,461		0,083		
3 (Aceton)	0,154			0,295	0,293		1,022	0,673		0,076		
4 (nativ)	0,163	0,121	0,129	0,350	0,246	0,235	0,456	0,491	0,476	0,097	0,096	0,099
5 (nativ)	0,091	0,101	0,095	0,126	0,118	0,131	0,170	0,098	0,118	0,082	0,087	0,089
6 (nativ)	0,097	0,098	0,089	0,105	0,098	0,094	0,134	0,124	0,155	0,088	0,092	0,083
7 (Aceton)	0,158	0,144	0,133	0,179	0,172	0,159	0,182	0,198	0,187	0,102	0,097	0,094
8 (Aceton)	0,123	0,125	0,137	0,183	0,162	0,201	0,264	0,396	0,226	0,091	0,092	0,088
9 (nativ)	0,149	0,136	0,105	0,148	0,150	0,121	0,214	0,194	0,211	0,093	0,094	0,092
10 (Ultraschall)	0,148	0,202	0,172	0,270	0,280	0,127	0,424	0,452	0,490	0,081	0,086	0,088
11 (Ultraschall)	0,139	0,115	0,138	0,130	0,131	0,133	0,214	0,261	0,124	0,086	0,098	0,096
12 (Aceton)	0,437	0,459	0,356	0,552	0,549	0,597	0,663	0,758	0,562	0,302	0,309	0,307
13 (Ultraschall)	0,119	0,128	0,104	0,180	0,187	0,150	0,331	0,354	0,185	0,085	0,088	0,088

7.1.3.2 Messreihen Proliferation

Versuch	Knochen ohne Endothelzellen,			Knochen mit Endothelzellen,			Knochen mit Endothelzellen,			Knochenverunreinigung,			vom Knochen gefallene Endothelzellen,			vom Knochen gefallene Endothelzellen,		
	Wdh. 1 ohne RGD (Leerwert)	Wdh. 2	Wdh. 3	Wdh. 1	Wdh. 2	Wdh. 3	Wdh. 1	Wdh. 2	Wdh. 3	Wdh. 1	Wdh. 2	Wdh. 3	Wdh. 1	Wdh. 2	Wdh. 3	Wdh. 1	Wdh. 2	Wdh. 3
1 (Ultraschall)	0,128	0,115	0,123	0,132	0,212	0,257	0,190	0,236	0,218	0,064	0,062	0,069	0,093	0,127	0,456	0,094	0,194	0,179
2 (Ultraschall)	0,148	0,167	0,148	0,169	0,161	0,169	0,157	0,177	0,188	0,111	0,100	0,098	0,741	1,041	1,131	0,459	0,821	0,249
3 (Aceton)	0,250	0,275	0,215	0,189	0,246	0,192	0,233	0,186	0,246	0,114	0,087	0,088	0,605	1,330	1,262	0,911	1,255	0,228
4 (nativ)	0,149	0,162	0,152	0,206	0,234	0,237	0,222	0,285	0,261	0,153	0,165	0,094	0,841	1,018	1,222	0,491	0,770	0,862
5 (nativ)	0,167	0,153	0,139	0,158	0,187	0,168	0,186	0,183	0,201	0,086	0,080	0,081	0,405	0,158	0,248	0,282	0,304	0,300
6 (nativ)	0,141	0,200	0,156	0,248	0,216	0,234	0,223	0,231	0,221	0,095	0,084	0,092	0,499	0,433	0,363	0,463	0,458	0,482
7 (Aceton)	0,142	0,129	0,151	0,274	0,287	0,245	0,304	0,284	0,295	0,091	0,083	0,095	0,750	0,648	0,661	0,183	0,293	0,600
8 (Aceton)	0,161	0,149	0,127	0,246	0,303	0,234	0,264	0,304	0,277	0,076	0,080	0,082	0,653	0,797	0,685	0,366	0,617	0,167
9 (nativ)	0,137	0,153	0,215	0,202	0,187	0,165	0,222	0,163	0,182	0,111	0,101	0,105	0,108	0,110	0,183	0,136	0,126	0,132
10 (Ultraschall)	0,145	0,108	0,117	0,280	0,242	0,209	0,308	0,255	0,292	0,083	0,083	0,086	0,237	0,112	0,261	0,416	0,095	0,277
11 (Ultraschall)	0,114	0,154	0,185	0,176	0,213	0,190	0,224	0,198	0,237	0,080	0,084	0,087	0,179	0,294	0,316	0,312	0,139	0,144
12 (Aceton)	0,600	0,598	0,733	0,802	0,994	1,007	0,877	1,060	0,917	0,119	0,130	0,143	0,226	0,304	0,288	0,446	0,483	0,561
13 (Ultraschall)	0,247	0,166	0,199	0,305	0,254	0,272	0,392	0,366	0,347	0,076	0,082	0,074	0,277	0,302	0,161	0,134	0,278	0,131

Anhang

Proliferation	Kontrollen											
	10.000 Endothelzellen ohne RGD, ohne Knochen			20.000 Endothelzellen ohne RGD, ohne Knochen			40.000 Endothelzellen ohne RGD, ohne Knochen			keine Zellen, kein RGD, kein Knochen (Blankwert)		
Versuch	Wdh. 1	Wdh. 2	Wdh. 3	Wdh. 1	Wdh. 2	Wdh. 3	Wdh. 1	Wdh. 2	Wdh. 3	Wdh. 1	Wdh. 2	Wdh. 3
1 (Ultraschall)	0,973	0,826	1,046	1,030	0,845	1,146	0,996	1,141	1,234	0,064	0,062	0,065
2 (Ultraschall)	0,513	0,595	0,342	0,801	0,708	0,743	0,721	0,898	0,630	0,101	0,096	0,100
3 (Aceton)	0,368	0,750	0,857	1,197	1,366	1,320	1,431	1,351	1,285	0,087	0,083	0,084
4 (nativ)	0,164	0,170	0,109	0,233	0,222	0,318	0,500	0,464	0,560	0,092	0,088	0,085
5 (nativ)	0,106	0,107	0,103	0,127	0,160	0,101	0,266	0,150	0,122	0,075	0,083	0,080
6 (nativ)	0,134	0,133	0,089	0,175	0,117	0,114	0,256	0,357	0,281	0,085	0,087	0,087
7 (Aceton)	0,122	0,196	0,124	0,387	0,267	0,147	0,386	0,451	0,233	0,079	0,083	0,085
8 (Aceton)	0,124	0,089	0,096	0,291	0,286	0,162	0,437	0,351	0,172	0,082	0,072	0,078
9 (nativ)	0,124	0,144	0,134	0,185	0,147	0,129	0,232	0,205	0,163	0,111	0,104	0,112
10 (Ultraschall)	0,339	0,444	0,207	0,317	0,227	0,338	0,488	0,790	0,944	0,075	0,075	0,074
11 (Ultraschall)	0,094	0,137	0,101	0,169	0,210	0,133	0,212	0,507	0,349	0,082	0,081	0,087
12 (Aceton)	0,419	0,426	0,358	0,558	0,523	0,434	0,812	0,594	0,576	0,130	0,113	0,115
13 (Ultraschall)	0,242	0,165	0,218	0,189	0,219	0,243	0,204	0,220	0,256	0,150	0,140	0,133

7.1.3.3 Adhäsion und Proliferation der Endothelzellen auf den verschiedenen Knochen

7.1.3.3.1 Versuch 1 (Ultraschall)

Descriptive Statistics (a)

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum	Percentiles		
		50th (Median)	75th	25th	50th (Median)	75th	25th	50th (Median)
Adhäsion ohne RGD	3	.14133	.009504	.132	.151	.13200	.14100	.15100
Proliferation ohne RGD	3	.0783	.06331	.01	.14	.0100	.0900	.1350
Adhäsion mit RGD	3	.12867	.002082	.127	.131	.12700	.12800	.13100
Proliferation mit RGD	3	.09267	.023180	.068	.114	.06800	.09600	.11400

a ID = Versuch 1

Wilcoxon Signed Ranks Test

Ranks (g)

		N	Mean Rank	Sum of Ranks
Adhäsion mit RGD -	Negative Ranks	3 (a)	2.00	6.00
Adhäsion ohne RGD	Positive Ranks	0 (b)	.00	.00
	Ties	0 (c)		
	Total	3		
Proliferation mit RGD -	Negative Ranks	1 (d)	2.00	2.00
Proliferation ohne RGD	Positive Ranks	2 (e)	2.00	4.00
	Ties	0 (f)		
	Total	3		

a Adhäsion mit RGD < Adhäsion ohne RGD

b Adhäsion mit RGD > Adhäsion ohne RGD

c Adhäsion mit RGD = Adhäsion ohne RGD

d Proliferation mit RGD < Proliferation ohne RGD

e Proliferation mit RGD > Proliferation ohne RGD

f Proliferation mit RGD = Proliferation ohne RGD

g ID = Versuch 1

Test Statistics (c,d)

Anhang

	Adhäsion mit RGD – Adhäsion ohne RGD	Proliferation mit RGD – Proliferation ohne RGD
Z	-1.604 (a)	-.535 (b)
Asymp. Sig. (2-tailed)	.109	.593

a Based on positive ranks.

b Based on negative ranks.

c Wilcoxon Signed Ranks Test

d ID = Versuch 1

7.1.3.3.2 Versuch 2 (Ultraschall)

Descriptive Statistics (a)

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum	Percentiles		
		50th (Median)	75th	25th	50th (Median)	75th	25th	50th (Median)
Adhäsion ohne RGD	3	.48433	.136844	.383	.640	.38300	.43000	.64000
Proliferation ohne RGD	3	.0123	.00462	.01	.02	.0070	.0150	.0150
Adhäsion mit RGD	3	.28333	.048014	.248	.338	.24800	.26400	.33800
Proliferation mit RGD	3	.02000	.015716	.003	.034	.00300	.02300	.03400

a ID = Versuch 2

Wilcoxon Signed Ranks Test

Ranks (g)

		N	Mean Rank	Sum of Ranks
Adhäsion mit RGD – Adhäsion ohne RGD	Negative Ranks	3 (a)	2.00	6.00
	Positive Ranks	0 (b)	.00	.00
	Ties	0 (c)		
	Total	3		
Proliferation mit RGD – Proliferation ohne RGD	Negative Ranks	1 (d)	1.00	1.00
	Positive Ranks	2 (e)	2.50	5.00
	Ties	0 (f)		
	Total	3		

a Adhäsion mit RGD < Adhäsion ohne RGD

b Adhäsion mit RGD > Adhäsion ohne RGD

c Adhäsion mit RGD = Adhäsion ohne RGD

d Proliferation mit RGD < Proliferation ohne RGD

e Proliferation mit RGD > Proliferation ohne RGD

f Proliferation mit RGD = Proliferation ohne RGD

Anhang

g ID = Versuch 2

Test Statistics (c,d)

	Adhäsion mit RGD – Adhäsion ohne RGD	Proliferation mit RGD – Proliferation ohne RGD
Z	-1.604 (a)	-1.069 (b)
Asymp. Sig. (2-tailed)	.109	.285

a Based on positive ranks.

b Based on negative ranks.

c Wilcoxon Signed Ranks Test

d ID = Versuch 2

7.1.3.3.3 Versuch 3 (Aceton)

Descriptive Statistics (a)

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum	Percentiles		
		50th (Median)	75th	25th	50th (Median)	75th	25th	50th (Median)
Adhäsion ohne RGD	3	.29567	.037421	.267	.338	.26700	.28200	.33800
Proliferation ohne RGD	3	.2090	.03208	.19	.25	.1890	.1920	.2460
Adhäsion mit RGD	2	.38800	.021213	.373	.403	.27975	.38800	.36375
Proliferation mit RGD	3	.22167	.031565	.186	.246	.18600	.23300	.24600

a ID = Versuch 3

Wilcoxon Signed Ranks Test

Ranks (g)

		N	Mean Rank	Sum of Ranks
Adhäsion mit RGD – Adhäsion ohne RGD	Negative Ranks	0 (a)	.00	.00
	Positive Ranks	2 (b)	1.50	3.00
	Ties	0 (c)		
Total		2		
Proliferation mit RGD – Proliferation ohne RGD	Negative Ranks	1 (d)	3.00	3.00
	Positive Ranks	2 (e)	1.50	3.00
	Ties	0 (f)		
Total		3		

a Adhäsion mit RGD < Adhäsion ohne RGD

b Adhäsion mit RGD > Adhäsion ohne RGD

Anhang

- c Adhäsion mit RGD = Adhäsion ohne RGD
- d Proliferation mit RGD < Proliferation ohne RGD
- e Proliferation mit RGD > Proliferation ohne RGD
- f Proliferation mit RGD = Proliferation ohne RGD
- g ID = Versuch 3

Test Statistics (c,d)

	Adhäsion mit RGD – Adhäsion ohne RGD	Proliferation mit RGD – Proliferation ohne RGD
Z	-1.342 (a)	.000 (b)
Asymp. Sig. (2-tailed)	.180	1.000

- a Based on negative ranks.
- b The sum of negative ranks equals the sum of positive ranks.
- c Wilcoxon Signed Ranks Test
- d ID = Versuch 3

7.1.3.3.4 Versuch 4 (Nativ)

Descriptive Statistics (a)

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum	Percentiles		
		50th (Median)	75th	25th	50th (Median)	75th	25th	50th (Median)
Adhäsion ohne RGD	3	.41267	.009074	.403	.421	.40300	.41400	.42100
Proliferation ohne RGD	3	.0717	.01710	.05	.08	.0520	.0800	.0830
Adhäsion mit RGD	3	.38900	.021656	.364	.402	.36400	.40100	.40200
Proliferation mit RGD	3	.10200	.031796	.068	.131	.06800	.10700	.13100

- a ID = Versuch 4

Wilcoxon Signed Ranks Test

Ranks (g)

		N	Mean Rank	Sum of Ranks
Adhäsion mit RGD –	Negative Ranks	3 (a)	2.00	6.00
Adhäsion ohne RGD	Positive Ranks	0 (b)	.00	.00
	Ties	0 (c)		
	Total	3		
Proliferation mit RGD –	Negative Ranks	0 (d)	.00	.00
Proliferation ohne RGD	Positive Ranks	3 (e)	2.00	6.00
	Ties	0 (f)		
	Total	3		

- a Adhäsion mit RGD < Adhäsion ohne RGD
- b Adhäsion mit RGD > Adhäsion ohne RGD
- c Adhäsion mit RGD = Adhäsion ohne RGD
- d Proliferation mit RGD < Proliferation ohne RGD
- e Proliferation mit RGD > Proliferation ohne RGD
- f Proliferation mit RGD = Proliferation ohne RGD
- g ID = Versuch 4

Test Statistics (c,d)

	Adhäsion mit RGD – Adhäsion ohne RGD	Proliferation mit RGD – Proliferation ohne RGD
Z	-1.604 (a)	-1.604 (b)
Asymp. Sig. (2-tailed)	.109	.109

- a Based on positive ranks.
- b Based on negative ranks.
- c Wilcoxon Signed Ranks Test
- d ID = Versuch 4

7.1.3.3.5 Versuch 5 (Nativ)

Descriptive Statistics (a)

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum	Percentiles		
	25th	50th (Median)	75th	25th	50th (Median)	75th	25th	50th (Median)
Adhäsion ohne RGD	3	.19167	.094055	.109	.294	.10900	.17200	.29400
Proliferation ohne RGD	3	.0180	.01473	.01	.03	.0050	.0150	.0340
Adhäsion mit RGD	3	.16633	.062565	.118	.237	.11800	.14400	.23700
Proliferation mit RGD	3	.03700	.009644	.030	.048	.03000	.03300	.04800

a ID = Versuch 5

Wilcoxon Signed Ranks Test

Ranks (g)

	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Adhäsion mit RGD – Negative Ranks	1 (a)	3.00	3.00
Adhäsion ohne RGD Positive Ranks	2 (b)	1.50	3.00
Ties	0 (c)		
Total	3		
Proliferation mit RGD – Negative Ranks	1 (d)	1.00	1.00
Proliferation ohne RGD Positive Ranks	2 (e)	2.50	5.00
Ties	0 (f)		
Total	3		

a Adhäsion mit RGD < Adhäsion ohne RGD

b Adhäsion mit RGD > Adhäsion ohne RGD

c Adhäsion mit RGD = Adhäsion ohne RGD

d Proliferation mit RGD < Proliferation ohne RGD

e Proliferation mit RGD > Proliferation ohne RGD

f Proliferation mit RGD = Proliferation ohne RGD

g ID = Versuch 5

Test Statistics (c,d)

	Adhäsion mit RGD – Adhäsion ohne RGD	Proliferation mit RGD – Proliferation ohne RGD
Z	.000 (a)	-1.069 (b)
Asymp. Sig. (2-tailed)	1.000	.285

a The sum of negative ranks equals the sum of positive ranks.

- b Based on negative ranks.
- c Wilcoxon Signed Ranks Test
- d ID = Versuch 5

7.1.3.3.6 Versuch 6 (Nativ)

Descriptive Statistics (a)

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum	Percentiles		
		50th (Median)	75th	25th	50th (Median)	75th	25th	50th (Median)
Adhäsion ohne RGD	3	.24200	.046893	.199	.292	.19900	.23500	.29200
Proliferation ohne RGD	3	.0667	.01604	.05	.08	.0500	.0680	.0820
Adhäsion mit RGD	3	.23100	.099141	.126	.323	.12600	.24400	.32300
Proliferation mit RGD	3	.05900	.005292	.055	.065	.05500	.05700	.06500

a ID = Versuch 6

Wilcoxon Signed Ranks Test

Ranks (g)

		N	Mean Rank	Sum of Ranks
Adhäsion mit RGD –	Negative Ranks	1 (a)	3.00	3.00
Adhäsion ohne RGD	Positive Ranks	2 (b)	1.50	3.00
	Ties	0 (c)		
	Total	3		
Proliferation mit RGD –	Negative Ranks	2 (d)	2.00	4.00
Proliferation ohne RGD	Positive Ranks	1 (e)	2.00	2.00
	Ties	0 (f)		
	Total	3		

- a Adhäsion mit RGD < Adhäsion ohne RGD
- b Adhäsion mit RGD > Adhäsion ohne RGD
- c Adhäsion mit RGD = Adhäsion ohne RGD
- d Proliferation mit RGD < Proliferation ohne RGD
- e Proliferation mit RGD > Proliferation ohne RGD
- f Proliferation mit RGD = Proliferation ohne RGD
- g ID = Versuch 6

Test Statistics (c,d)

	Adhäsion mit RGD – Adhäsion ohne RGD	Proliferation mit RGD – Proliferation ohne RGD
Z	.000 (a)	-.535 (b)
Asymp. Sig. (2-tailed)	1.000	.593

a The sum of negative ranks equals the sum of positive ranks.

b Based on positive ranks.

c Wilcoxon Signed Ranks Test

d ID = Versuch 6

7.1.3.3.7 Versuch 7 (Aceton)

Descriptive Statistics (a)

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum	Percentiles		
		50th (Median)	75th	25th	50th (Median)	75th	25th	50th (Median)
Adhäsion ohne RGD	3	.29300	.100015	.192	.392	.19200	.29500	.39200
Proliferation ohne RGD	3	.1277	.02150	.10	.15	.1040	.1330	.1460
Adhäsion mit RGD	3	.29867	.100977	.185	.378	.18500	.33300	.37800
Proliferation mit RGD	3	.15333	.010017	.143	.163	.14300	.15400	.16300

a ID = Versuch 7

Wilcoxon Signed Ranks Test

Ranks (g)

		N	Mean Rank	Sum of Ranks
Adhäsion mit RGD –	Negative Ranks	1 (a)	3.00	3.00
Adhäsion ohne RGD	Positive Ranks	2 (b)	1.50	3.00
	Ties	0 (c)		
	Total	3		
Proliferation mit RGD –	Negative Ranks	1 (d)	1.00	1.00
Proliferation ohne RGD	Positive Ranks	2 (e)	2.50	5.00
	Ties	0 (f)		
	Total	3		

a Adhäsion mit RGD < Adhäsion ohne RGD

b Adhäsion mit RGD > Adhäsion ohne RGD

c Adhäsion mit RGD = Adhäsion ohne RGD

d Proliferation mit RGD < Proliferation ohne RGD

e Proliferation mit RGD > Proliferation ohne RGD

f Proliferation mit RGD = Proliferation ohne RGD

g ID = Versuch 7

Test Statistics (c,d)

	Adhäsion mit RGD – Adhäsion ohne RGD	Proliferation mit RGD – Proliferation ohne RGD
Z	.000 (a)	-1.069 (b)
Asymp. Sig. (2-tailed)	1.000	.285

a The sum of negative ranks equals the sum of positive ranks.

b Based on negative ranks.

c Wilcoxon Signed Ranks Test

d ID = Versuch 7

7.1.3.3.8 Versuch 8 (Aceton)

Descriptive Statistics (a)

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum	Percentiles		
		50th (Median)	75th	25th	50th (Median)	75th	25th	50th (Median)
Adhäsion ohne RGD	3	.21500	.075941	.128	.268	.12800	.24900	.26800
Proliferation ohne RGD	3	.1150	.03686	.09	.16	.0880	.1000	.1570
Adhäsion mit RGD	3	.30867	.036501	.267	.335	.26700	.32400	.33500
Proliferation mit RGD	3	.13567	.020404	.118	.158	.11800	.13100	.15800

a ID = Versuch 8

Wilcoxon Signed Ranks Test

Ranks (g)

		N	Mean Rank	Sum of Ranks
Adhäsion mit RGD –	Negative Ranks	0 (a)	.00	.00
Adhäsion ohne RGD	Positive Ranks	3 (b)	2.00	6.00
	Ties	0 (c)		
	Total	3		
Proliferation mit RGD –	Negative Ranks	0 (d)	.00	.00
Proliferation ohne RGD	Positive Ranks	3 (e)	2.00	6.00
	Ties	0 (f)		
	Total	3		

Anhang

- a Adhäsion mit RGD < Adhäsion ohne RGD
- b Adhäsion mit RGD > Adhäsion ohne RGD
- c Adhäsion mit RGD = Adhäsion ohne RGD
- d Proliferation mit RGD < Proliferation ohne RGD
- e Proliferation mit RGD > Proliferation ohne RGD
- f Proliferation mit RGD = Proliferation ohne RGD
- g ID = Versuch 8

Test Statistics (b,c)

	Adhäsion mit RGD – Adhäsion ohne RGD	Proliferation mit RGD – Proliferation ohne RGD
Z	-1.604 (a)	-1.604 (a)
Asymp. Sig. (2-tailed)	.109	.109

- a Based on negative ranks.
- b Wilcoxon Signed Ranks Test
- c ID = Versuch 8

7.1.3.3.9 Versuch 9 (Nativ)

Descriptive Statistics (a)

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum	Percentiles		
		50th (Median)	75th	25th	50th (Median)	75th	25th	50th (Median)
Adhäsion ohne RGD	3	.15233	.012583	.139	.164	.13900	.15400	.16400
Proliferation ohne RGD	3	.0167	.01861	.00	.03	-.0030	.0190	.0340
Adhäsion mit RGD	3	.18700	.036097	.146	.214	.14600	.20100	.21400
Proliferation mit RGD	3	.02100	.030116	-.005	.054	-.00500	.01400	.05400

- a ID = Versuch 9

Wilcoxon Signed Ranks Test

Ranks (g)

		N	Mean Rank	Sum of Ranks
Adhäsion mit RGD –	Negative Ranks	1 (a)	1.00	1.00
Adhäsion ohne RGD	Positive Ranks	2 (b)	2.50	5.00
	Ties	0 (c)		
	Total	3		
Proliferation mit RGD –	Negative Ranks	1 (d)	3.00	3.00
Proliferation ohne RGD	Positive Ranks	2 (e)	1.50	3.00
	Ties	0 (f)		
	Total	3		

- a Adhäsion mit RGD < Adhäsion ohne RGD
- b Adhäsion mit RGD > Adhäsion ohne RGD
- c Adhäsion mit RGD = Adhäsion ohne RGD
- d Proliferation mit RGD < Proliferation ohne RGD
- e Proliferation mit RGD > Proliferation ohne RGD
- f Proliferation mit RGD = Proliferation ohne RGD
- g ID = Versuch 9

Test Statistics (c,d)

	Adhäsion mit RGD – Adhäsion ohne RGD	Proliferation mit RGD – Proliferation ohne RGD
Z	-1.069 (a)	.000 (b)
Asymp. Sig. (2-tailed)	.285	1.000

- a Based on negative ranks.
- b The sum of negative ranks equals the sum of positive ranks.
- c Wilcoxon Signed Ranks Test
- d ID = Versuch 9

7.1.3.3.10 Versuch 10 (Ultraschall)

Descriptive Statistics (a)

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum	Percentiles		
	25th	50th (Median)	75th	25th	50th (Median)	75th	25th	50th (Median)
Adhäsion ohne RGD	3	.23500	.054745	.199	.298	.19900	.20800	.29800
Proliferation ohne RGD	3	.1207	.03553	.09	.16	.0860	.1190	.1570
Adhäsion mit RGD	3	.29000	.035511	.254	.325	.25400	.29100	.32500
Proliferation mit RGD	3	.16200	.027185	.132	.185	.13200	.16900	.18500

a ID = Versuch 10

Wilcoxon Signed Ranks Test

Ranks (g)

	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Adhäsion mit RGD – Negative Ranks	1 (a)	1.00	1.00
Adhäsion ohne RGD Positive Ranks	2 (b)	2.50	5.00
Ties	0 (c)		
Total	3		
Proliferation mit RGD – Negative Ranks	0 (d)	.00	.00
Proliferation ohne RGD Positive Ranks	3 (e)	2.00	6.00
Ties	0 (f)		
Total	3		

a Adhäsion mit RGD < Adhäsion ohne RGD

b Adhäsion mit RGD > Adhäsion ohne RGD

c Adhäsion mit RGD = Adhäsion ohne RGD

d Proliferation mit RGD < Proliferation ohne RGD

e Proliferation mit RGD > Proliferation ohne RGD

f Proliferation mit RGD = Proliferation ohne RGD

g ID = Versuch 10

Test Statistics (b,c)

	Adhäsion mit RGD – Adhäsion ohne RGD	Proliferation mit RGD – Proliferation ohne RGD
Z	-1.069 (a)	-1.604 (a)
Asymp. Sig. (2-tailed)	.285	.109

a Based on negative ranks.

b Wilcoxon Signed Ranks Test

c ID = Versuch 10

7.1.3.3.11 Versuch 11 (Ultraschall)

Descriptive Statistics (a)

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum	Percentiles		
	25th	50th (Median)	75th	25th	50th (Median)	75th	25th	50th (Median)
Adhäsion ohne RGD	3	.16633	.004041	.162	.170	.16200	.16700	.17000
Proliferation ohne RGD	3	.0420	.01868	.03	.06	.0250	.0390	.0620
Adhäsion mit RGD	3	.19000	.031097	.163	.224	.16300	.18300	.22400
Proliferation mit RGD	3	.06867	.019858	.047	.086	.04700	.07300	.08600

a ID = Versuch 11

Wilcoxon Signed Ranks Test

Ranks (g)

		N	Mean Rank	Sum of Ranks
Adhäsion mit RGD –	Negative Ranks	0 (a)	.00	.00
Adhäsion ohne RGD	Positive Ranks	3 (b)	2.00	6.00
	Ties	0 (c)		
	Total	3		
Proliferation mit RGD –	Negative Ranks	1 (d)	1.00	1.00
Proliferation ohne RGD	Positive Ranks	2 (e)	2.50	5.00
	Ties	0 (f)		
	Total	3		

a Adhäsion mit RGD < Adhäsion ohne RGD

b Adhäsion mit RGD > Adhäsion ohne RGD

c Adhäsion mit RGD = Adhäsion ohne RGD

d Proliferation mit RGD < Proliferation ohne RGD

e Proliferation mit RGD > Proliferation ohne RGD

f Proliferation mit RGD = Proliferation ohne RGD

g ID = Versuch 11

Test Statistics (b,c)

	Adhäsion mit RGD – Adhäsion ohne RGD	Proliferation mit RGD – Proliferation ohne RGD
Z	-1.604 (a)	-1.069 (a)
Asymp. Sig. (2-tailed)	.109	.285

a Based on negative ranks.

b Wilcoxon Signed Ranks Test

c ID = Versuch 11

7.1.3.3.12 Versuch 12 (Aceton)

Descriptive Statistics (a)

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum	Percentiles		
		50th (Median)	75th	25th	50th (Median)	75th	25th	50th (Median)
Adhäsion ohne RGD	3	.15333	.027099	.125	.179	.12500	.15600	.17900
Proliferation ohne RGD	3	.2903	.11479	.16	.36	.1580	.3500	.3630
Adhäsion mit RGD	3	.16967	.019140	.152	.190	.15200	.16700	.19000
Proliferation mit RGD	3	.30733	.096210	.233	.416	.23300	.27300	.41600

a ID = Versuch 12

Wilcoxon Signed Ranks Test

Ranks (g)

		N	Mean Rank	Sum of Ranks
Adhäsion mit RGD –	Negative Ranks	1 (a)	1.00	1.00
Adhäsion ohne RGD	Positive Ranks	2 (b)	2.50	5.00
	Ties	0 (c)		
	Total	3		
Proliferation mit RGD –	Negative Ranks	1 (d)	3.00	3.00
Proliferation ohne RGD	Positive Ranks	2 (e)	1.50	3.00
	Ties	0 (f)		
	Total	3		

a Adhäsion mit RGD < Adhäsion ohne RGD

b Adhäsion mit RGD > Adhäsion ohne RGD

c Adhäsion mit RGD = Adhäsion ohne RGD

d Proliferation mit RGD < Proliferation ohne RGD

e Proliferation mit RGD > Proliferation ohne RGD

Anhang

f Proliferation mit RGD = Proliferation ohne RGD

g ID = Versuch 12

Test Statistics (c,d)

	Adhäsion mit RGD – Adhäsion ohne RGD	Proliferation mit RGD – Proliferation ohne RGD
Z	-1.069 (a)	.000 (b)
Asymp. Sig. (2-tailed)	.285	1.000

a Based on negative ranks.

b The sum of negative ranks equals the sum of positive ranks.

c Wilcoxon Signed Ranks Test

d ID = Versuch 12

7.1.3.3.13 Versuch 13 (Ultraschall)

Descriptive Statistics (a)

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum	Percentiles		
		50th (Median)	75th	25th	50th (Median)	75th	25th	50th (Median)
Adhäsion ohne RGD	3	.06300	.014731	.047	.076	.04700	.06600	.07600
Proliferation ohne RGD	3	.0730	.02587	.05	.10	.0500	.0680	.1010
Adhäsion mit RGD	3	.09500	.044238	.046	.132	.04600	.10700	.13200
Proliferation mit RGD	3	.16433	.022591	.143	.188	.14300	.16200	.18800

a ID = Versuch 13

Wilcoxon Signed Ranks Test

Ranks (g)

		N	Mean Rank	Sum of Ranks
Adhäsion mit RGD –	Negative Ranks	1 (a)	1.00	1.00
Adhäsion ohne RGD	Positive Ranks	2 (b)	2.50	5.00
	Ties	0 (c)		
	Total	3		
Proliferation mit RGD –	Negative Ranks	0 (d)	.00	.00
Proliferation ohne RGD	Positive Ranks	3 (e)	2.00	6.00
	Ties	0 (f)		
	Total	3		

a Adhäsion mit RGD < Adhäsion ohne RGD

- b Adhäsion mit RGD > Adhäsion ohne RGD
- c Adhäsion mit RGD = Adhäsion ohne RGD
- d Proliferation mit RGD < Proliferation ohne RGD
- e Proliferation mit RGD > Proliferation ohne RGD
- f Proliferation mit RGD = Proliferation ohne RGD
- g ID = Versuch 13

Test Statistics (b,c)

	Adhäsion mit RGD – Adhäsion ohne RGD	Proliferation mit RGD – Proliferation ohne RGD
Z	-1.069 (a)	-1.604 (a)
Asymp. Sig. (2-tailed)	.285	.109

- a Based on negative ranks.
- b Wilcoxon Signed Ranks Test
- c ID = Versuch 13

7.1.3.4 Vergleich aller Adhäsionen und Proliferationen innerhalb einer Knochenreinigungsgruppe

7.1.3.4.1 Ultraschall

Descriptive Statistics (a)

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum	Percentiles		
		50th (Median)	75th	25th	50th (Median)	75th	25th	50th (Median)
Adhäsion ohne RGD	15	.21800	.159346	.047	.640	.13200	.16700	.29800
Proliferation ohne RGD	15	.0653	.04822	.01	.16	.0150	.0620	.1010
Adhäsion mit RGD	15	.19740	.087285	.046	.338	.12800	.18300	.26400
Proliferation mit RGD	15	.10153	.060401	.003	.188	.04700	.09600	.16200

- a Gruppe = Ultraschall

Wilcoxon Signed Ranks Test

Ranks (g)

		N	Mean Rank	Sum of Ranks
Adhäsion mit RGD –	Negative Ranks	8 (a)	7.44	59.50
Adhäsion ohne RGD	Positive Ranks	7 (b)	8.64	60.50
	Ties	0 (c)		
	Total	15		
Proliferation mit RGD –	Negative Ranks	3 (d)	4.00	12.00
Proliferation ohne RGD	Positive Ranks	12 (e)	9.00	108.00
	Ties	0 (f)		
	Total	15		

- a Adhäsion mit RGD < Adhäsion ohne RGD
- b Adhäsion mit RGD > Adhäsion ohne RGD
- c Adhäsion mit RGD = Adhäsion ohne RGD
- d Proliferation mit RGD < Proliferation ohne RGD
- e Proliferation mit RGD > Proliferation ohne RGD
- f Proliferation mit RGD = Proliferation ohne RGD
- g Gruppe = Ultraschall

Test Statistics (b,c)

	Adhäsion mit RGD – Adhäsion ohne RGD	Proliferation mit RGD – Proliferation ohne RGD
Z	-.028 (a)	-2.726 (a)
Asymp. Sig. (2-tailed)	.977	.006

- a Based on negative ranks.
- b Wilcoxon Signed Ranks Test
- c Gruppe = Ultraschall

7.1.3.4.2 Aceton

Descriptive Statistics (a)

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum	Percentiles		
		50th (Median)	75th	25th	50th (Median)	75th	25th	50th (Median)
Adhäsion ohne RGD	12	.23925	.084172	.125	.392	.16175	.25800	.29175
Proliferation ohne RGD	12	.1855	.09127	.09	.36	.1113	.1575	.2325
Adhäsion mit RGD	11	.28245	.093559	.152	.403	.18500	.32400	.37300
Proliferation mit RGD	12	.20450	.083238	.118	.416	.14575	.17450	.24275

- a Gruppe = Aceton

Wilcoxon Signed Ranks Test

Ranks (g)

		N	Mean Rank	Sum of Ranks
Adhäsion mit RGD –	Negative Ranks	2 (a)	6.00	12.00
Adhäsion ohne RGD	Positive Ranks	9 (b)	6.00	54.00
	Ties	0 (c)		
	Total	11		
Proliferation mit RGD –	Negative Ranks	3 (d)	7.67	23.00
Proliferation ohne RGD	Positive Ranks	9 (e)	6.11	55.00
	Ties	0 (f)		
	Total	12		

- a Adhäsion mit RGD < Adhäsion ohne RGD
- b Adhäsion mit RGD > Adhäsion ohne RGD
- c Adhäsion mit RGD = Adhäsion ohne RGD
- d Proliferation mit RGD < Proliferation ohne RGD
- e Proliferation mit RGD > Proliferation ohne RGD
- f Proliferation mit RGD = Proliferation ohne RGD
- g Gruppe = Aceton

Test Statistics (b,c)

	Adhäsion mit RGD – Adhäsion ohne RGD	Proliferation mit RGD – Proliferation ohne RGD
Z	-1.867 (a)	-1.255 (a)
Asymp. Sig. (2-tailed)	.062	.209

- a Based on negative ranks.
- b Wilcoxon Signed Ranks Test
- c Gruppe = Aceton

7.1.3.4.3 Nativ

Descriptive Statistics (a)

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum	Percentiles		
		50th (Median)	75th	25th	50th (Median)	75th	25th	50th (Median)
Adhäsion ohne RGD	12	.24967	.113205	.109	.421	.15650	.21700	.37575
Proliferation ohne RGD	12	.0433	.03064	.00	.08	.0160	.0420	.0770
Adhäsion mit RGD	12	.24333	.105508	.118	.402	.14450	.22550	.35375
Proliferation mit RGD	12	.05475	.037163	-.005	.131	.03075	.05450	.06725

a Gruppe = Nativ

Wilcoxon Signed Ranks Test

Ranks (g)

		N	Mean Rank	Sum of Ranks
Adhäsion mit RGD –	Negative Ranks	6 (a)	6.17	37.00
Adhäsion ohne RGD	Positive Ranks	6 (b)	6.83	41.00
	Ties	0 (c)		
	Total	12		
Proliferation mit RGD –	Negative Ranks	4 (d)	4.88	19.50
Proliferation ohne RGD	Positive Ranks	8 (e)	7.31	58.50
	Ties	0 (f)		
	Total	12		

a Adhäsion mit RGD < Adhäsion ohne RGD

b Adhäsion mit RGD > Adhäsion ohne RGD

c Adhäsion mit RGD = Adhäsion ohne RGD

d Proliferation mit RGD < Proliferation ohne RGD

e Proliferation mit RGD > Proliferation ohne RGD

f Proliferation mit RGD = Proliferation ohne RGD

g Gruppe = Nativ

Test Statistics (b,c)

	Adhäsion mit RGD – Adhäsion ohne RGD	Proliferation mit RGD – Proliferation ohne RGD
Z	-.157 (a)	-1.530 (a)
Asymp. Sig. (2-tailed)	.875	.126

a Based on negative ranks.

b Wilcoxon Signed Ranks Test

c Gruppe = Nativ

7.1.3.5 Vergleich der Endothelzelladhäsion und -proliferation auf RGD-beschichteten Knochenkuben bezüglich der unterschiedlichen Reinigungsverfahren

7.1.3.5.1 Adhäsion

	Adhäsion mit RGD							
Gruppe	Median	Percentile 05	Percentile 95	Minimum	Maximum	Mean	Standard Deviation	Count
Aceton	.324	.152	.403	.152	.403	.282	.094	12
Nativ	.226	.118	.402	.118	.402	.243	.106	12
Ultraschall	.183	.046	.338	.046	.338	.197	.087	15
Total	.231	.107	.402	.046	.403	.237	.099	39

Test Statistics (a,b)

	Adhäsion mit RGD
Chi-Square	4.893
df	2
Asymp. Sig.	.087

a Kruskal Wallis Test

b Grouping Variable: Gruppe

Mann-Whitney Test

Ranks

	Gruppe	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Adhäsion mit RGD	Aceton	11	13.55	149.00
	Nativ	12	10.58	127.00
	Total	23		

Test Statistics (b)

	Adhäsion mit RGD
Mann-Whitney U	49.000
Wilcoxon W	127.000
Z	-1.046
Asymp. Sig. (2-tailed)	.295
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.316 (a)

a Not corrected for ties.

b Grouping Variable: Gruppe

Mann-Whitney Test

Ranks

	Gruppe	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Adhäsion mit RGD	Aceton	11	17.55	193.00
	Ultraschall	15	10.53	158.00
	Total	26		

Test Statistics (b)

	Adhäsion mit RGD
Mann-Whitney U	38.000
Wilcoxon W	158.000
Z	-2.310
Asymp. Sig. (2-tailed)	.021
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.020 (a)

a Not corrected for ties.

b Grouping Variable: Gruppe

Mann-Whitney Test

Ranks

	Gruppe	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Adhäsion mit RGD	Nativ	12	15.50	186.00
	Ultraschall	15	12.80	192.00
	Total	27		

Test Statistics (b)

	Adhäsion mit RGD
Mann-Whitney U	72.000
Wilcoxon W	192.000
Z	-.878
Asymp. Sig. (2-tailed)	.380
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.399 (a)

a Not corrected for ties.

b Grouping Variable: Gruppe

7.1.3.5.2 Proliferation

Gruppe	Proliferation mit RGD							
	Median	Percentile 05	Percentile 95	Minimum	Maximum	Mean	Standard Deviation	Count
Aceton	.175	.118	.416	.118	.416	.205	.083	12
Nativ	.055	-.005	.131	-.005	.131	.055	.037	12
Ultraschall	.096	.003	.188	.003	.188	.102	.060	15
Total	.114	.003	.273	-.005	.416	.119	.086	39

Test Statistics (a,b)

	Proliferation mit RGD
Chi-Square	19.674
df	2
Asymp. Sig.	.000

a Kruskal Wallis Test

b Grouping Variable: Gruppe

Mann-Whitney Test

Ranks

	Gruppe	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Proliferation mit RGD	Aceton	12	18.38	220.50
	Nativ	12	6.63	79.50
	Total	24		

Test Statistics (b)

	Proliferation mit RGD
Mann-Whitney U	1.500
Wilcoxon W	79.500
Z	-4.072
Asymp. Sig. (2-tailed)	.000
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.000 (a)

a Not corrected for ties.

b Grouping Variable: Gruppe

Mann-Whitney Test

Ranks

	Gruppe	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Proliferation mit RGD	Aceton	12	19.13	229.50
	Ultraschall	15	9.90	148.50
	Total	27		

Test Statistics (b)

	Proliferation mit RGD
Mann-Whitney U	28.500
Wilcoxon W	148.500
Z	-3.002
Asymp. Sig. (2-tailed)	.003
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.002 (a)

a Not corrected for ties.

b Grouping Variable: Gruppe

Mann-Whitney Test

Ranks

	Gruppe	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Proliferation mit RGD	Nativ	12	10.38	124.50
	Ultraschall	15	16.90	253.50
	Total	27		

Test Statistics (b)

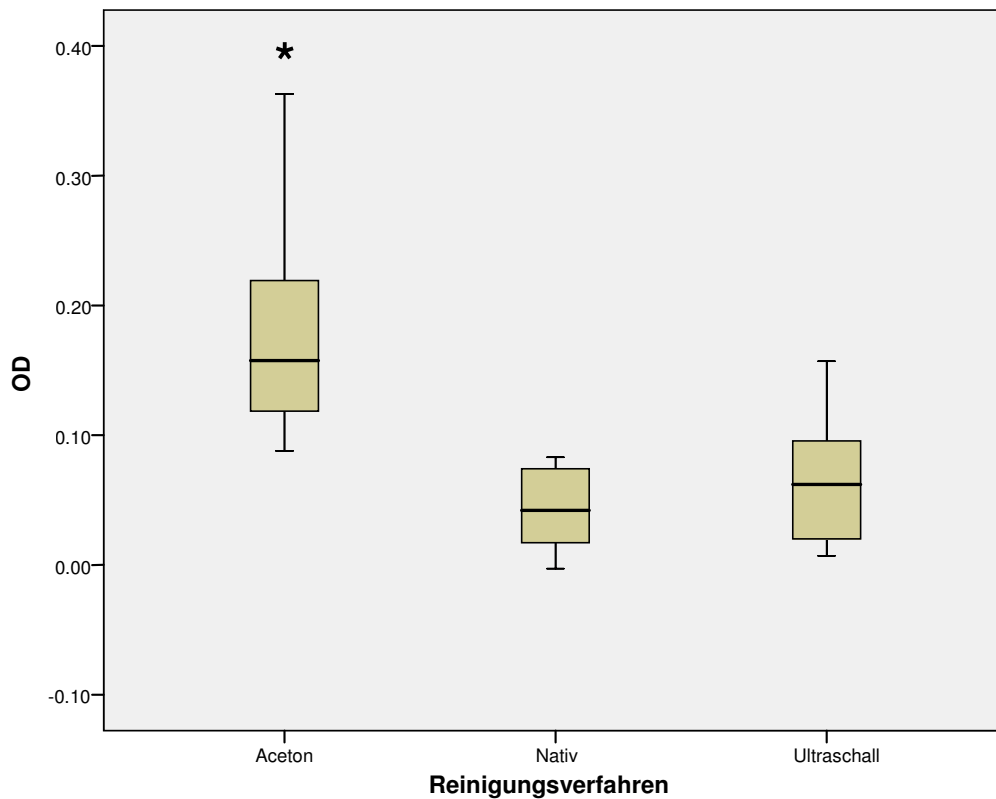
	Proliferation mit RGD
Mann-Whitney U	46.500
Wilcoxon W	124.500
Z	-2.123
Asymp. Sig. (2-tailed)	.034
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.032 (a)

a Not corrected for ties.

b Grouping Variable: Gruppe

7.1.3.6 Vergleich der Endothelzellproliferation auf RGD-unbeschichteten Knochenkuben bezüglich der unterschiedlichen Reinigungsverfahren

Abbildung 67: Vergleich der Endothelzellproliferation auf RGD-unbeschichteten Knochenkuben bezüglich der unterschiedlichen Reinigungsverfahren



Gruppe	Proliferation ohne RGD							
	Median	Percentile 05	Percentile 95	Minimum	Maximum	Mean	Standard Deviation	Count
Aceton	.16	.09	.36	.09	.36	.19	.09	12
Nativ	.04	.00	.08	.00	.08	.04	.03	12
Ultraschall	.06	.01	.16	.01	.16	.07	.05	15
Total	.08	.01	.35	.00	.36	.10	.09	39

7.2 Danksagung

Zunächst möchte ich

Herrn Prof. Dr. med. Reiner Gradinger meinen Dank für die Möglichkeit aussprechen, die vorliegende Arbeit in seiner orthopädischen Abteilung durchführen und die exzellenten Arbeitsbedingungen in den Räumen des orthopädischen Forschungslabors wahrnehmen zu können.

Ferner bedanke ich mich besonders bei

Herrn PD Dr. med. Rainer Burgkart und

Herrn Dr. med. Johannes Schauwecker für die zuverlässige Betreuung, konstruktive Kritik und Beratung bei der Niederschrift der Arbeit sowie bei

Herrn PD Dr. med. Peter Diehl für die Überlassung des Themas.

Mein weiterer Dank gilt

Frau Dipl. biol. Dr. Ulla Magdolen sowie

Frau Jutta Tübel für die Unterstützung bei Versuchsplanung und praktischer Durchführung sowie für die Unterweisung im Arbeiten mit kultivierten Zellen,

Dr. rer. nat. Jörg Auernheimer für die Synthetisierung der RGD-Peptide,

Frau Dipl. Math. Raymonde Busch für die Beratung bei Fragen zur statistischen Auswertung,

allen Patienten für die Einwilligung, Ihre Hüftköpfe der Wissenschaft bereitzustellen,

der Firma Biomet Deutschland GmbH für ihre Kooperationsbereitschaft,

der Firma Telos GmbH für die kostenlose Bereitstellung des Lobator sd-2 sowie

non postremo meiner Familie und engen Freunden für die moralische Unterstützung sowie deren Verständnis und Nachsichtigkeit.

7.3 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, vorliegende Arbeit selbständig und ohne die Hilfe anderer als der erlaubten Mittel angefertigt zu haben.

.....
Ort, Datum

.....
Unterschrift