

Anhang

- |     |  |                      |
|-----|--|----------------------|
| 1.  | Entplasten von MMA (Methylmethacrylate)- Schnitten:<br>3 x 20 min in MEA (2-methoxyethylacetat) [Merck 806061]                           |                      |
| 2.  | Rehydrieren der Schnitte in absteigender Alkoholreihe:<br>2 x 100 % Alkohol<br>1 x 96 % Alkohol<br>1 x 80 % Alkohol<br>1 x 70 % Alkohol, | <i>jeweils 2 min</i> |
| 3.  | Spülen in Aqua dest.   | <i>kurz</i>          |
| 4.  | Färben in 3%iger wässrigen Silbernitratlösung im Dunkeln   | <i>5 min</i>         |
| 5.  | 3 x Spülen in Aqua dest.   |                      |
| 6.  | Reduzieren in Natrium-Formaldehydlösung  | <i>2 min</i>         |
| 7.  | Wässern in Leitungswasser  | <i>10 min</i>        |
| 8.  | Fixieren in 5% Natriumthiosulfatlösung   | <i>5 min</i>         |
| 9.  | Wässern in Leitungswasser  | <i>10 min</i>        |
| 10. | Spülen in Aqua dest.   | <i>kurz</i>          |
| 11. | Färben mit Safranin Orange   | <i>8 min</i>         |
| 12. | Spülen in Aqua dest.   | <i>kurz</i>          |
| 13. | Entwässern in aufsteigender Alkoholreihe:<br>1 x 80 % Alkohol<br>1 x 96 % Alkohol<br>2 x 100 % Alkohol,                                  | <i>jeweils kurz</i>  |
| 14. | Entfetten in Xylol   | <i>2 x 5min</i>      |
| 15. | Eindecken mit Vitroclud und Deckgläschen   |                      |

**Protokoll 1 Färbeprotokoll Safranin – Orange / von Kossa für histologische Schnitte nach von Kossa (1901)**

- |     |  |                      |
|-----|--|----------------------|
| 1.  | Entplasten von MMA (Methylmethacrylate)-Schnitten:<br>3 x 20 min in MEA (2-methoxyethylacetat) [Merck 806061]                            |                      |
| 2.  | Rehydrieren der Schnitte in absteigender Alkoholreihe:<br>2 x 100 % Alkohol<br>1 x 96 % Alkohol<br>1 x 80 % Alkohol<br>1 x 70 % Alkohol, | <i>jeweils 2 min</i> |
| 3.  | Kernfärbung mit Weigerts Eisenhämatoxylin  | <i>2-4 min</i>       |
| 4.  | Auswaschen in fließendem Wasser  | <i>10 min</i>        |
| 5.  | Färben in Säurefuchsin- Ponceau  | <i>5 min</i>         |
| 6.  | Spülen in 1%iger Essigsäure  |                      |
| 7.  | Differenzieren in Phosphomolybdänsäure- Orange G<br>(bis das Bindegewebe vollständig entfärbt ist)                                       | <i>18- 20 min</i>    |
| 8.  | Spülen in 1%iger Essigsäure  |                      |
| 9.  | Gegenfärben mit Lichtgrün  | <i>10 min</i>        |
| 10. | Spülen in 1%iger Essigsäure  |                      |
| 11. | Entwässern in aufsteigender Alkoholreihe:<br>1 x 80 % Alkohol<br>1 x 96 % Alkohol<br>2 x 100 % Alkohol,                                  | <i>jeweils kurz</i>  |
| 12. | Entfetten in Xylol   | <i>2 x 5 min</i>     |
| 13. | Eindecken mit Vitroclud und Deckgläschen   |                      |

**Protokoll 2 Färbeprotokoll Trichromfärbung für histologische Schnitte nach Masson – Goldner (1938)**

- |  |              |
|--|--------------|
| 1. Entplasten von MMA (Methylmethacrylat)- Schnitten:<br>3 x 20 min in MEA (2-methoxyethylacetat) [Merck 806061] |              |
| 2. Rehydrieren der Schnitte in absteigender Alkoholreihe:<br>2 x 100 % Alkohol                                   |              |
| 1 x 96 % Alkohol   |              |
| 1 x 80 % Alkohol   | 2 min        |
| 1 x 70 % Alkohol   | 2 min        |
| 3. Spülen in Aqua dest.  | kurz         |
| 4. Färben in Safranin- Orange- Lösung  | 8- 10 min    |
| 5. 3 x Spülen in Aqua dest.  |              |
| 6. Färben in Pikrinsäure   | 10 min       |
| 7. Spülen in Aqua dest.  | kurz         |
| 8. Spülen in 1%iger Essigsäure   | kurz         |
| 9. Färben in Lichtgrünlösung   | 8- 10 min    |
| 10. Spülen in 1%iger Essigsäure  | kurz         |
| 11. Entwässern in aufsteigender Alkoholreihe:<br>1 x 80 % Alkohol  |              |
| 1 x 96 % Alkohol   |              |
| 2 x 100 % Alkohol,   | jeweils kurz |
| 12. Entfetten in Xylol   | 2 x 5 min    |
| 13. Eindecken mit Vitroclud und Deckgläschen   |              |

**Protokoll 3 Färbeprotokoll Safranin – Orange / Lichtgrün für histologische Schnitte**

- |  |                     |
|--|---------------------|
| 1. Entplasten von MMA (Methylmethacrylat)- Schnitten:<br>3 x 20 min in MEA (2-methoxyethylacetat) [Merck 806061] |                     |
| 2. Rehydrieren der Schnitte in absteigender Alkoholreihe:  |                     |
| 2 x 100 % Alkohol  |                     |
| 1 x 96 % Alkohol   |                     |
| 1 x 80 % Alkohol   | <i>2 min</i>        |
| 1 x 70 % Alkohol   | <i>2 min</i>        |
| 3. Spülen in Aqua dest.  | <i>kurz</i>         |
| 4. Färben in Astrablau 1 %   | <i>10 min</i>       |
| 5. Spülen in 1%iger Essigsäure   | <i>kurz</i>         |
| 6. Spülen in Aqua dest.  |                     |
| 7. Gegenfärbung mit Kernechtrot  | <i>5 min</i>        |
| 8. Spülen in Aqua dest.  |                     |
| 9. Entwässern in aufsteigender Alkoholreihe  |                     |
| 1 x 70 % Alkohol   |                     |
| 1 x 80 % Alkohol   |                     |
| 1 x 96 % Alkohol   |                     |
| 1 x 100 % Alkohol  | <i>jeweils kurz</i> |
| 10. Entfetten in Xylol   | <i>2 x 5 min</i>    |
| 11. Eindecken mit Vitroclud und Deckgläschen   |                     |

**Protokoll 4 Färbeprotokoll Astrablau für histologische Schnitte**

Tabelle 17 Histomorphometrische Merkmalsausprägung nach 3.6 Histologische Auswertung

Merkmal Tier-Nr.	Gewebe im Intervertebralraum	Vaskularisierung	Integration des Implantats	Sinterung des Implantats	Mineralisiertes Kollagen	Fremdkörperreaktion	Anzahl der Resorptionszonen	Ausmaß der Resorptionszonen	Fusion			Beurteilung der Kortikalis	Beurteilung des Kallus
									dorsal	Pore	ventral		
151	5	3	2	1	0	1	0	0	2	2	2	1	1
152	2	3	2	1	1	2	0	0	2	0	0	1	0
153	2	3	2	1	1	1	0	0	2	0	0	1	0
154	6	3	3	1	1	1	0	0	2	2	1	2	0
155	5	2	2	1	2	1	0	0	2	2	1	1	1
156	6	2	3	1	2	1	0	0	2	2	2	2	0
157	6	2	3	1	2	1	0	0	2	3	3	2	3
158	6	2	2	1	2	1	0	0	2	2	1	1	1
161	3	3	3	1	2	1	0	0	2	2	2	1	2
162	5	2	2	1	2	1	0	0	2	2	2	1	1
163	6	2	3	1	2	1	0	0	2	2	2	1	2
164	5	2	2	1	2	1	0	0	2	2	2	1	0
165	2	3	2	1	2	1	0	0	2	2	2	1	0
166	2	3	2	1	2	1	0	0	2	2	2	1	
167	5	2	2	1	2	1	0	0	2	2	2	1	1
168	2	3	2	1	2	1	0	0	2	2	2	1	2
171	6	1	3	1	2	1	0	0	2	3	2	1	2
172	6	2	3	1	2	1	0	0	2	2	2	1	2
173	5	1	2	1	2	1	0	0	2	2	2	1	2
174	6	2	3	1	2	1	0	0	2	2	2	1	1
175	6	2	3	1	2	1	0	0	2	2	2	1	2
176	6	2	3	1	2	1	0	0	2	3	2	1	2
177	6	2	3	1	2	1	0	0	2	2	2	1	2
178	6	2	3	1	2	1	0	0	2	3	2	1	2
181	5	2	2	1	2	1	0	0	2	3	2	1	1
182	5	2	3	1	1	1	0	0	2	2	2	1	2
183	6	2	3	1	2	1	0	0	2	2	2	1	1
184	6	2	3	1	2	1	0	0	2	2	2	1	1
185	6	2	3	1	2	1	0	0	2	2	2	1	1
186	6	2	3	1	2	1	0	0	2	3	2	1	1
187	5	2	2	1	2	1	0	0	2	2	2	1	1

Tabelle 18 Statistische Auswertung der histomorphometrischen Ergebnisse

Gegeneinander getestete Gruppen	U – Test p	U – Test p	U – Test p	U – Test p
1) HC + mineralisiertes Kollagen 2) HC + mineralisiertes Kollagen + PRP	0,130	0,021	0,574	0,050
1) HC + mineralisiertes Kollagen 2) HC + mineralisiertes Kollagen + BMP-2	0,010	0,028	0,505	0,279
1) HC + mineralisiertes Kollagen 2) HC + mineralisiertes Kollagen + cRGD	0,009	0,006	0,189	0,121
1) HC + mineralisiertes Kollagen 2) Nativ	0,002	0,000	0,083	0,000
1) HC + mineralisiertes Kollagen + PRP 2) HC + mineralisiertes Kollagen + BMP-2	0,002	0,645	0,878	0,878
1) HC + mineralisiertes Kollagen + PRP 2) HC + mineralisiertes Kollagen + cRGD	0,001	0,232	0,397	0,955
1) HC + mineralisiertes Kollagen + PRP 2) Nativ	0,161	0,000	0,328	0,000
1) HC + mineralisiertes Kollagen + BMP-2 2) HC + mineralisiertes Kollagen + cRGD	0,867	0,189	0,536	0,867
1) HC + mineralisiertes Kollagen + BMP2 2) Nativ	0,000	0,000	0,442	0,001
1) HC + mineralisiertes Kollagen + cRGD 2) Nativ	0,000	0,000	0,694	0,000
	Knochenfläche von ROI-Fläche in Prozent	Knorpelfläche von ROI-Fläche in Prozent	Mineralisierte Knorpelfläche von ROI-Fläche in Prozent	Mineralisierte Knorpel-Fläche von Gesamt-Knorpel-Fläche in Prozent

**Tabelle 19 Korrektur der statistischen Ergebnisse nach Bonferroni-Holm** (Aickin und Mitarbeiter 1996). Dunkelgrau unterlegt sind die Gruppen in denen statistisch signifikante Unterschiede auftraten.

Zur Erklärung: 1 – HC + mineralisiertes Kollagen, 2 – HC + mineralisiertes Kollagen + PRP, 3 – HC + mineralisiertes Kollagen + BMP-2, 4 – HC + mineralisiertes Kollagen + cRGD, 5 – unbehandelte Kontrollgruppe

Korrigiertes Signifikanzniveau nach Bonferroni-Holm	Knochenfläche von ROI [%]		Knorpelfläche von ROI [%]		Mineralisierte Knorpelfläche von ROI [%]		Mineralisierte Knorpelfläche von Gesamtknorpel [%]	
	Getestete Gruppen	p-Werte	Getestete Gruppen	p-Werte	Getestete Gruppen	p-Werte	Getestete Gruppen	p-Werte
0,05	3 → 4	0,867	2 → 3	0,645	2 → 3	0,878	2 → 4	0,955
0,025	2 → 5	0,161	2 → 4	0,232	4 → 5	0,694	2 → 3	0,878
0,0167	1 → 2	0,130	3 → 4	0,189	1 → 2	0,574	3 → 4	0,867
0,0125	1 → 3	0,010	1 → 3	0,028	3 → 4	0,536	1 → 3	0,279
0,01	1 → 4	0,009	1 → 2	0,021	1 → 3	0,505	1 → 4	0,121
0,0083	1 → 5	0,002	1 → 4	0,006	3 → 5	0,442	1 → 2	0,050
0,0071	2 → 3	0,002	1 → 5	0,000	2 → 4	0,397	3 → 5	0,001
0,00625	2 → 4	0,001	2 → 5	0,000	2 → 5	0,328	1 → 5	0,000
0,00556	3 → 5	0,000	3 → 5	0,000	1 → 4	0,189	2 → 5	0,000
0,005	4 → 5	0,000	4 → 5	0,000	1 → 5	0,083	4 → 5	0,000

**Tabelle 20** Thrombozytenkonzentrationen im Vollblut und im mittels Gravitational Platelet Separation™ System konzentriertem Blut der Schafe der Gruppe 2

Tier-Nummer	Thrombozytenzahl je nl Vollblut	Thrombozytenzahl je nl Thrombozytenkonzentrat (PRP)
161	291	1113
162	345	1299
163	562	3580
164	327	2109
165	207	1326
166	212	1425
167	270	3616
168	166	920
Median	280,50	1375,50
Minimum	166	920
Maximum	562	3616

**Tabelle 21 Abkürzung und Buchstabensymbole der Aminosäuren** (nach Alberts aus Stryer L. 1996).

Aminosäure	Abkürzung	Buchstabensymbol
Valin	Val	V
Isoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Glycin	Gly	G
Alanin	Ala	A
Prolin	Pro	P
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	O
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Cystein	Cys	C
Asparagin	Asn	N
Glutamin	Glu	Q
Arginin	Arg	R
Lysin	Lys	K
Histidin	His	H
Asparaginsäure	Asp	D
Glutaminsäure	Glu	E