

*Aus der Klinik für
Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie
und
dem Julius Wolff Institut
der Medizinischen Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin*

DISSERTATION

**6- und 12-Monats-Ergebnisse des Vergleichs zwischen
PEO-oberflächenmodifizierten und WE43-basierten
Magnesiumimplantaten ohne Oberflächenmodifikation im
Schweinemodell**

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité - Universitätsmedizin Berlin

von
Heilwig Fischer
aus Kaliningrad

Datum der Promotion: 05.03.2021

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	5
Tabellenverzeichnis	7
Abkürzungsverzeichnis	8
Abstrakt	10
Abstract	12
1. Einleitung	14
2. Hypothesen	17
3. Wissenschaftlicher Hintergrund	18
3.1 Aufbau eines langen Röhrenknochens und Knochenstoffwechsel	18
3.2 Knochenheilung	20
3.3 Miniplattenosteosynthese	21
3.4 Magnesium	23
3.4.1 WE43	23
3.4.2 Mechanische Aspekte	23
3.4.3 Biokompatibilität	25
3.4.4 Zytologische Effekte	29
3.4.5 PEO-Oberflächenmodifikation	30
3.5 Vergleich zu anderen Osteosynthesematerialien	32
3.5.1 Titan	32
3.5.2 Polylactide	33
3.6 Fragestellung und Zielsetzung der Studie	34
4. Material und Methoden	36
4.1 Implantate	36
4.2 Versuchstiere	36
4.2.1 Herkunft der Tiere	36
4.2.2 Haltung und Fütterung	37
4.3 Operation und Probengewinnung	38
4.3.1 Operation	38
4.3.2 Operations- und Euthanasiezeitpunkte	40
4.3.3 Postoperatives Regime	40
4.3.4 Intra- und postoperative Komplikationen	41

4.3.5 Euthanasie	42
4.3.6 Entnahme der Knochenproben	43
4.4 Radiologische Auswertung	43
4.4.1 Erstellen der Mikro-CTs	43
4.4.2 Analyse der Mikro-CTs	44
4.4.3 Radiologische Referenzmessungen	48
4.5 Histologische Auswertung	50
4.5.1 Vorbereitung der Proben	50
4.5.2 Fixierung, Entwässerung und Entfettung	51
4.5.3 Präinfiltration, Infiltration und Einbettung	51
4.5.4 Herstellung der Schriffe	54
4.5.5 Histomorphometrische Analyse	56
4.5.6 Bone-Implant-Contact	58
4.5.7 Quantifizierung des lamellären Knochens	58
4.5.8 Quantifizierung der Überwachung der Platte	59
4.5.9 Histologische Referenzmessungen	60
4.6 Statistische Auswertung	61
5. Ergebnisse	61
<hr/>	
5.1 Implantatdegradation	61
5.1.1 Radiologische Bestimmung der Implantatdegradation	61
5.1.2 Histologische Bestimmung der Implantatdegradation	63
5.2 Quantifizierung des Knochens	65
5.2.1 Radiologische Quantifizierung des Knochens	65
5.2.2 Histologische Quantifizierung des Knochens	67
5.3 Osseointegration	69
5.3.1 Bestimmung des Bone-Implant-Contact	69
5.3.2 Quantifizierung des lamellären Knochens	70
5.3.3 Quantifizierung der Überwachung der Platte	71
6. Diskussion	72
<hr/>	
6.1 Implantatdegradation	73
6.2 Quantifizierung des Knochens	80
6.3 Osseointegration	82
6.3.1 Bone-Implant-Contact	82
6.3.2 Quantifizierung des lamellären Knochens	84

<i>6.3.3 Quantifizierung der Überwachung der Platte</i>	86
6.4 Fazit	87
7. Literaturverzeichnis	88
<hr/> Eidesstattliche Versicherung	96
<hr/> Lebenslauf	97
<hr/> Danksagung	98
<hr/>	

*Teilergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden zur Veröffentlichung eingereicht bei:
Biomaterials (01/2021)*

3. Wissenschaftlicher Hintergrund

Abb. 3.1: Implantatdegradation im Verhältnis zum Knochenaufbau.....	25
Abb. 3.2: Magnesium-Homöostase im menschlichen Körper.....	27

4. Material und Methoden

Abb. 4.1: Implantate in unbeschichteter (links) und beschichteter Ausführung (rechts).....	36
Abb. 4.2: Platte und Schrauben in angewendeter Kombination.....	36
Abb. 4.3: Unbeschichtetes Implantat in situ.....	39
Abb. 4.4: Beschichtetes Implantat in situ.....	39
Abb. 4.5: Entnahme des Humerus.....	43
Abb. 4.6: Entnahme des Femur.....	43
Abb. 4.7: Entnommenes Femur mit einer beschichteten Platte.....	43
Abb. 4.8: Messung der Dicke der Transkortikalis.....	44
Abb. 4.9 und Abb. 4.10: Kontrolle der ermittelten Thresholdwerte.....	46
Abb. 4.11: Darstellung der VOIs im Mikro-CT.....	48
Abb. 4.12: Darstellungen des Schraubenquerschnitts.....	48
Abb. 4.13: Darstellung der Originalschraube im unkorrodierten Zustand im Mikro-CT.....	49
Abb. 4.14: 3D-Rekonstruktionen der gemessenen Volumenprozent für die Referenzmessungen.....	50
Abb. 4.15: Herstellung der Infiltrationslösung.....	53
Abb. 4.16: Vorbereitung der Einbettung.....	53
Abb. 4.17: Fertig eingebettete Probe.....	53
Abb. 4.18: Eingeblocktes Knochenstück.....	54
Abb. 4.19: Zustand nach dem Herunterschleifen und Sägen.....	54
Abb. 4.20: Gesägtes Plattenstück.	56
Abb. 4.21: Zum Schneiden vorbereiteter Block.....	56
Abb. 4.22: Gefärbter Schliff, unbeschichtete Schraube.....	56

Abb. 4.23: Gefärbter Schliff, beschichtete Schraube.....	56
Abb. 4.24: Schliff einer Originalschraube als Basis für die Erstellung der Standard-ROI.....	57
Abb. 4.25: Analyse der Kontaktfläche.....	58
Abb. 4.26: Platzierung der ROIs anhand der Originalschraube.....	59
Abb. 4.27: Differenzierung von lamellärem Knochen und Geflechtknochen.....	59
Abb. 4.28: Darstellung der Anordnung aller ROIs.....	60
Abb. 4.29: Detailaufnahme aus ROI 2.....	60

5. Ergebnisse

Abb. 5.1: SV/TV [%] VOI SC und SV/TV [%] VOI SM.....	62
Abb. 5.2: SC/ROI.Ar [%] ROI SC und SC/ROI.Ar [%] ROI SM.....	64
Abb. 5.3: BV/TV [%] VOI UC und BV/TV [%] VOI UM.....	65
Abb. 5.4: BV/TV [%] VOI GC und BV/TV [%] VOI GM.....	66
Abb. 5.5: MdB/ROI.Ar [%] ROI UC und MdB/ROI.Ar [%] ROI UM.....	68
Abb. 5.6: MdB/ROI.Ar [%] ROI GC und MdB/ROI.Ar [%] ROI GM.....	69
Abb. 5.7: BIC [%] SC und BIC [%] SM.....	70
Abb. 5.8: Lamelläre Knochen [%] in ROI 2.....	71
Abb. 5.9: MdB [mm ²] über der Platte.....	72

6. Diskussion

Abb. 6.1 Beginn der Bildung von mineralisierter Knochenmatrix in einer Unbeschichteten Schraube nach 6 Monaten.....	78
Abb. 6.2 Durchbauung der Schraube durch Knochen, unbeschichtete Schraube nach 12 Monaten.....	78
Abb. 6.3 Entwicklung von Rissen in der PEO-Oberflächenmodifikation in vitro....	78
Abb. 6.4 Schollenartige Ablösung des Magnesiums.....	78
Abb. 6.5 Osteoinduktive, -konduktive und osteogenetische Eigenschaften des Magnesiums.....	79

Tabellenverzeichnis

4. Material und Methoden

Tab. 4.1: Gewicht und Geschlecht der Versuchstiere.....	37
Tab. 4.2: Zeitpunkte der Operation und Euthanasie sowie die jeweiligen Implantate.....	40
Tab. 4.3: Gemessene Dicke der Gegenkortikalis in mm, Mittelwert auf zwei Nachkommastellen gerundet.....	45
Tab. 4.4: Referenzmessungen für die VOIs aus Kortikalis und Markraum.....	49
Tab. 4.5: Entwässerungsschema der Knochenproben.....	51
Tab. 4.6: Färbeschema der Schliffe.....	55
Tab. 4.7: Histomorphometrische Referenzmessungen.....	60

Abkürzungsverzeichnis

Aa.	Arteriae
Ar	Area
aq	wässrige Lösung
B	beschichtet
BV	Bone-Volume
Cl	Chlor
CMF	Cranio-Maxillo-Facial
Con	contact
CoT	connective Tissue
EZM	Extrazelluläre Matrix
FELASA	Federation for Laboratory Animal Science Associations
g	gasförmig
GC	Grenzbereich kortikal
GM	Grenzbereich im Markraum
hBMSCs	Human Bone Marrow-derived Mesenchymal Stem Cells
HIF1 α	Hypoxia-Inducible Factor 1-alpha
i.m.	intramuskulär
i.v.	intravenös
KGW	Körpergewicht
MdB	Mineralized bone
Mg	Magnesium
Micro-CT	Mikrocomputertomografie
OP	Operation
PEO	Plasmaelektrolytische Oxidation
PMMA	Polymethylmethacrylat
p.o.	post operationem
ROI	Region-of-Interest
s	Feststoff
SD	Standardabweichung
s.c.	subcutan
Sc	Schraube
SC	Schraube kortikal

SM	Schraube Markraumbereich
Thr.	Threshold
TRAP	Tartrate-Resistant Acid Phosphatase
Tt.	Total
TV	Total Volume
U	unbeschichtet
UC	Umgebung kortikal
UM	Umgebung Markraumbereich
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VOI	Volume-of-Interest
WE43	Legierung auf Magnesiumbasis

Abstrakt

Die offene Reposition und Osteosynthese mit Titanplatten gilt als Goldstandard bei der Versorgung von Frakturen im Kiefer- und Gesichtsbereich, um eine anatomische Retention und eine schnelle Funktionswiederherstellung zu ermöglichen. Kommt es jedoch zu implantatassoziierten Komplikationen oder wünscht es der Patient, müssen diese Platten wieder entfernt werden. Als resorbierbares Osteosynthesematerial bietet Magnesium den Vorteil, dass eine zweite Operation zur Materialentfernung überflüssig wird. Aufgrund seiner mechanischen Eigenschaften ist es für den Einsatz in lasttragenden Bereichen geeignet. Bei der Degradation von reinem Magnesium kommt es zu einer starken Gasbildung, die radiologisch sichtbare Lysezonen im Knochen verursacht. Durch die Verwendung einer Legierung mit passivierenden Elementen und durch Oberflächenmodifikation kann diese Gasbildung verzögert werden.

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde die Implantatdegradation und der Einfluss auf den umliegenden Knochen von WE43-basierten Magnesiumimplantaten mit und ohne PEO-Oberflächenmodifikation im Langzeitversuch untersucht. Es erfolgte die Implantation von Miniplatten in Humerus und Femur von Göttinger Minipigs und die Entnahme nach einer Standzeit von 6 und 12 Monaten. Quantifiziert wurde das Residualvolumen der Schrauben [SV/TV %] und des Knochens [BV/TV %] im Mikro-CT in definierten Volumes-of-Interest (VOIs). Histomorphometrisch wurde in definierten Regions-of-Interest (ROIs) die verbliebene Implantatfläche quantifiziert [Sc/ROI.Ar %] und die Fläche des umgebenden Knochens bestimmt [MdB/ROI.Ar %]. Der Bone-Implant-Contact wurde ermittelt und die Menge an lamellärem Knochen in einer definierten ROI um die Schraube quantifiziert [%], sowie die Überwachung der Platte [mm²] bestimmt.

Zu beiden Entnahmezeitpunkten zeigt sich eine stärkere Resorption der unbeschichteten Implantate in Histologie und Mikro-CT. Nach 6 Monaten ist das verbleibende Implantatvolumen der Schrauben im kortikalen Bereich im Mikro-CT bei den unbeschichteten Implantaten signifikant reduziert im Vergleich zu den PEO-oberflächenmodifizierten Implantaten. Histologisch zeigt sich eine signifikant stärkere Flächenreduktion der unbeschichteten Implantate nach 12 Monaten im kortikalen Bereich und im Markraum. Im kortikalen Bereich zeigt sich in der Umgebung der

beschichteten Schrauben nach 6 Monaten in Mikro-CT und Histologie ein höherer Knochenanteil, im Markraum jedoch findet eine stärkere Knochenanlagerung in der Umgebung der unbeschichteten Schrauben statt. Dies ist nachweisbar in Histologie und Mikro-CT. Zu beiden Entnahmezeitpunkten besteht bei den beschichteten Implantaten ein höherer Bone-Implant-Contact, nach 6 Monaten ist der Unterschied signifikant. Ein höherer Anteil an lamellärem Knochen um die beschichteten Schrauben ist nach 6 und 12 Monaten feststellbar. Zu beiden Entnahmezeitpunkten sind die beschichteten Platten stärker von Knochen überwachsen.

Nach einem Implantationszeitraum von 6 und 12 Monaten führt die Verwendung einer PEO-Oberflächenmodifikation zu einer signifikanten Verzögerung der Implantatdegradation im kortikalen Bereich der Schrauben, zu einer gesteigerten Knochenquantität und zur signifikant besseren Osseointegration nach 6 Monaten.

Abstract

To establish an anatomical reposition and a quick regain of function, open reduction and internal fixation by titanium plates is considered the gold standard for fracture treatment of the jaws. If implant-associated complications occur, a second operation is necessary. As a resorbable material, magnesium offers the advantage of making a second operation for screw and plate removal unnecessary. Because of its biomechanical properties, it is suitable for load-bearing indications. The degradation of pure magnesium is linked to a massive development of hydrogen gas, causing radiologically visible bone resorption. Alloys with passivating elements and surface modification are strategies to slow down the process of degradation.

In this study degradation, influence on the surrounding bone and osseointegration of WE43-based magnesium miniplates with and without PEO surface modification, implanted in humerus and femur of minipigs, after 6 and 12 months was investigated. The remaining screw volume [SV/TV %] and the surrounding bone [BV/TV %] was quantified in defined volumes of interest (VOIs) using micro-CT. The remaining implant area [Sc/ROI.Ar %] and the area covered with bone [MdB/ROI.Ar %] was quantified in regions of interest (ROIs). The bone-to-implant contact ratio (BIC) was determined and the amount of lamellar bone quantified, surrounding the screws [%]. Additionally, we measured the quantity of bone covering the plates [mm²].

At both points in time, the unmodified implants showed a faster degradation in histology and radiology. After 6 months, the remaining implant volume of the unmodified screws in the cortical area in micro-CT was significantly reduced compared to the screws with modification by PEO. Histologically there was a significant area reduction of the unmodified screws after 12 months in the cortical area and bone marrow. The cortical area shows more bone close to the surface-modified screws in micro-CT and histology, but in the bone marrow there is a higher appearance of bone close to the unmodified screws, to be seen in micro-CT and histology. The surface-modified screws present with a higher BIC. After 6 months, this difference is significant. A higher percentage of lamellar bone is to be seen in the surrounding of the screws with surface-modification and we found more bone overgrowing the surface-modified plates.

The PEO modification lead to a significant delay of implant degradation in the cortical region of the screws after the implantation period of 6 and 12 months. Additionally, there was an increased quantity of bone in the cortical region and a significantly better osseointegration after 6 months.

1. Einleitung

Als medizinischer Fachbereich befasst sich die Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie mit der Diagnostik, Therapie und Prävention von funktionellen und ästhetischen Aspekten der Fehlbildungen, Erkrankungen und Verletzungen von Zähnen, Mundhöhle, Kiefer und Gesicht.

Die häufigsten Frakturen im Gesichtsschädelbereich betreffen insbesondere die Orbita, den Unterkiefer, das Jochbein und Nasenbein,¹ wobei an häufigen Verletzungsmechanismen vor allem Autounfälle, Stürze und Gewaltdelikte zu nennen sind.^{2,3} Hierbei gilt die offene Reposition und Osteosynthese mit Miniplatten auf Titanbasis, die entweder in einer zweiten Operation wieder entfernt werden müssen oder dauerhaft im Körper verbleiben, als therapeutischer Goldstandard.^{3,4} Titanlegierungen verfügen über eine ausgezeichnete Biokompatibilität und hohe Stabilität, die ein minimalistisches Design auch beim Einsatz im lasttragenden Bereich ermöglicht.

Über die Zeit kommt es bei dem Verbleib von Metallimplantaten im Körper zu einem Partikelabrieb, der im umliegenden Gewebe, in Lymphknoten und besonders in Makrophagen nachweisbar ist.^{5,6} Trotz der höheren Korrosionsresistenz von Titan im Vergleich zu Stahl⁷ kommt es auch bei Titan über die Zeit zu einem Partikelabrieb, der, verursacht durch die Reibung zwischen Schrauben und Platte, vor allem im Bereich der Schraubenköpfe zu finden ist.⁸ Daraus kann über einen längeren Zeitraum eine Fibrosierung, Kapselbildung oder eine chronische Immunreaktion resultieren.^{6,9} Bedingt durch die große Differenz des E-Moduls zwischen Titan und Knochen¹⁰ kann es zu Stress Shielding^{11,12} und Knochenverlust¹² kommen.

Im Gegensatz zu den früher vermehrt verwendeten Implantaten aus Stahl, wodurch eine generelle Empfehlung zur Entfernung der Implantate gerechtfertigt wurde,¹³ werden heutzutage überwiegend Titanimplantate verwendet, weshalb die generelle Entfernung von asymptomatischen Osteosynthesematerialien im Mittelgesicht nicht mehr empfohlen wird.^{13,14,15,16} Aufgrund einer höheren Komplikationsrate wird jedoch die Routineentfernung von Osteosynthesematerialien vor allem am Unterkiefer diskutiert.¹⁴ Insgesamt wird eine Komplikationsrate von 6-8 % beschrieben, diese werden zu 50 % mit einer Materialentfernung therapiert.¹³ Typische Gründe für die Entfernung von Osteosynthesematerialien sind: Von außen sichtbare oder fühlbare Platten, Platten- oder Schraubenmigration, mechanische Weichteilirritationen,

Kältemissempfindungen, Parästhesien, Infektionen, oder ein anhaltendes Fremdkörpergefühl.^{13,17} Im wachsenden Skelett wird die Entfernung wiederum generell empfohlen, um die Behinderung des Knochenwachstums und eine Dislokation zu vermeiden.^{18,19} Diese zweite Operation zur Materialentfernung ist, neben den Risiken einer Narkose, mit den entsprechenden Risiken des chirurgischen Eingriffs behaftet. Dazu zählen insbesondere Verletzungen von Nerven oder Blutgefäßen und Infektionen. Mit einer zusätzlichen Operation entstehen zudem höhere Kosten im Gesundheitssystem und, sofern eine Materialentfernung auf Grund von Grunderkrankungen im stationären Rahmen notwendig wird, eine kumulativ längere Liegedauer.²⁰

Durch die Verwendung von resorbierbaren Implantaten können dem Patienten eine erneute Operation und die damit verbundenen Risiken erspart werden. Aktuell werden resorbierbare Osteosynthesysteme vorwiegend auf Basis der Polyester Polylactid (PLA) und Polyhydroxyessigsäure (PGA) der L-Isomerform von PLA (PLLA) hergestellt.

Durch die unterschiedliche Zusammensetzung der Polylactide ergibt sich eine unterschiedliche Stabilität und eine unterschiedliche Degradationsgeschwindigkeit in einer Zeitspanne von wenigen Monaten bis zu fünf Jahren.²¹

Auf Grund der mechanischen Eigenschaften ergibt sich jedoch eine Limitation des klinischen Einsatzes. Polylactidbasierte Implantate weisen eine deutlich niedrigere Festigkeit als Titan und eine niedrigere Festigkeit als kortikaler Knochen auf.¹⁰ Somit wird die Verwendung von polylactidbasierten Implantaten auf den Einsatz im nicht lasttragenden Bereich limitiert, da eine osteosynthetische Versorgung mit polylactidbasierten Implantaten unter der physiologischen Belastbarkeit des Knochens liegt. Im Rahmen des Degradationsprozesses von Polylactiden kann es zudem zu einer Fremdkörperreaktion mit Abkapselung kommen, die zum Teil noch mehrere Jahre nach Implantation auftreten kann.^{22,23}

Obwohl an Magnesium und Magnesiumlegierungen seit fast 200 Jahren geforscht wird,²⁴ finden Magnesiumschrauben erst seit 2013 klinische Verwendung. Mit der Zulassung der Magnesiumschraube „MAGNEZIX® CS 3.2“ erhielt die erste Magnesiumschraube 2013 die CE-Zulassung als Medizinprodukt vom TÜV Rheinland.²⁵ Magnesium ist biokompatibel und stabiler als kortikaler Knochen, ohne

eine zu Knochen ähnlich große Differenz der Elastizitätsmodule aufzuweisen, wie dies bei Titan der Fall ist. Dadurch ist es für den Einsatz in lasttragenden Bereichen potentiell geeignet und bietet gleichzeitig ein geringeres Risiko des Stress Shieldings. Zudem bietet es den großen Vorteil der Resorbierbarkeit, der eine Materialentfernung im Rahmen einer Re-Operation unnötig macht. Die bei dem Resorptionsprozess frei werdenden Löslichkeitsprodukte des Magnesiums sind nicht toxisch, gleichzeitig konnte kein erhöhter Magnesiumspiegel im Serum nachgewiesen werden.^{10,26-30} Magnesium degradiert über einen Oxidationsprozess, der über die Bildung von Magnesiumoxid Wasserstoffgas als Nebenprodukt entstehen lässt.²⁴ Das bei der Resorption freiwerdende Wasserstoffgas kann die Knochenheilung und die Integrität der Osteosynthese gefährden, da es zu an das Implantat angrenzenden Hohlräumen führt.³¹ Durch die Verwendung von Magnesiumlegierungen sowie Beschichtungen oder Oberflächenmodifikationen ist es gelungen, den Resorptionsprozess zu verlangsamen und das Material Magnesium für den klinischen Einsatz zugänglich zu machen.³²⁻³⁷ In mehreren Studien konnte bereits der erfolgreiche Einsatz im Menschen gezeigt werden. Bei der Operation eines Hallux valgus zeigen Studien, dass mit Magnesiumschrauben basierend auf der Legierung MgYREZr (Magnesium, Yttrium, Zirconium und andere Seltene Erden) klinisch zu Titanimplantaten vergleichbare Ergebnisse erzielt werden können.^{33,35} Auch im Bereich von medialem Malleolus³⁷ und distalem Unterarm und Hand konnte die erfolgreiche osteosynthetische Versorgung mit Magnesiumschrauben ohne die Notwendigkeit einer Revision durchgeführt werden.³⁶

Besonders Patienten der MKG-Chirurgie können von resorbierbaren Implantaten profitieren, da im Gesichtsbereich besonders hohe Ansprüche an Funktionalität und Ästhetik gelegt werden und die Vermeidung einer zusätzlichen Operation wünschenswert wäre.

In Bezug auf Osteosynthesysteme zeigen aktuelle Studien mit einer Standzeit von bis zu 6 Monaten im Großtiermodell vielversprechende Ergebnisse bei der Untersuchung von WE43-basierten Magnesiumlegierungen mit und ohne Plasmaelektrolytbeschichtung.³⁸⁻⁴⁰ Jedoch existieren bisher nach bestem Wissen keine Untersuchungen über diesen Zeitraum hinaus, welche eine histologische Untersuchung der Magnesiumschrauben und -platten im langen Röhrenknochen bei Großtieren im fortgeschrittenen Korrosionsstadium zeigen. Darüber hinaus ist diese

Studie nach bestem Wissen die erste Studie, die eine PEO-Oberflächenmodifikation auf WE43-basierten Magnesiumschrauben in Kombination mit Platten im langen Röhrenknochen von Großtieren untersucht. Ziel dieser Studie ist der Vergleich Implantatdegradation, Osseointegration und Reaktion des umgebenden Knochens auf WE43-basierten Magnesiumimplantaten mit und ohne PEO-Oberflächenmodifikation unter Langzeitbedingungen mit einer Standzeit von 6 und 12 Monaten im Großtiermodell. Der Fokus liegt hierbei auf der Evaluation der Degradation und der Verbesserung der Osseointegration durch die PEO-Oberflächenmodifikation zum Herabsetzen der Degradationsgeschwindigkeit.

2. Hypothesen

Für die histologische und radiologische Evaluation der nach 6 und 12 Monaten entnommenen Knochenproben wurden folgende Hypothesen aufgestellt:

Im Vergleich zwischen WE43-basierten Magnesiumimplantaten mit PEO-Oberflächenmodifikation (im Folgenden als „beschichtet“ bezeichnet) und ohne Oberflächenmodifikation („unbeschichtet“) kommt es bei PEO-oberflächenmodifizierten Implantaten nach einer 6- und 12-monatigen Nachbeobachtungszeit im Göttinger Minipig zu einem größeren Residualvolumen [SV/TV] (Screw Volume/ Total Volume).

Infolge der langsameren Resorption kommt es bei PEO-oberflächenmodifizierten Implantaten zu einer besseren Osseointegration und einer höheren Knochendichte [BV/TV] (Bone Volume/Total Volume) des dem Implantat anliegenden Knochens.

Daraus ergeben sich folgende zu bestimmende Parameter:

1. Untersuchung der Implantatresorption in Mikro-CT und Histologie durch Messung des Residualvolumens bzw. der Residualfläche der Implantate und dem Vergleich zu Originalimplantaten.
2. Quantifizierung des mineralisierten Knochens in definierten Volumes-of-Interest (VOIs) um die Schrauben in Mikro-CT und Quantifizierung des mineralisierten

Knochens in definierten Region-of-Interest (ROIs) in der Histomorphometrie für die beiden Versuchsgruppen sowie der Vergleich zu nativem Knochen.

3. Untersuchung der Osseointegration in der Histologie durch Bestimmung des Bone-Implant-Contact (BIC), Bestimmung des lamellären Knochens in einer definierten Region-of-Interest (ROI) um die Schraube und Messung der Menge an mineralisiertem Knochen über der Platte.

3. Wissenschaftlicher Hintergrund

3.1 Aufbau eines langen Röhrenknochens und Knochenstoffwechsel

Um in tierexperimentellen Studien die Belastung der Tiere zu reduzieren und ihnen eine Operation im Kopfbereich zu ersparen, kann zur Untersuchung der Implantatresorption und Osseointegration auf die langen Röhrenknochen zurückgegriffen werden, die kontrollierte Bedingungen für Tests von Biomaterialien bieten.

Lange Röhrenknochen werden makroskopisch in die Gelenkenden (Epiphysen), die an die Wachstumszone grenzenden Metaphysen und den Schaftbereich (Diaphyse) eingeteilt. Im Gegensatz zu den zum größten Teil mit Substantia spongiosa (Bälkchensubstanz) gefüllten Epi- und Metaphysen befindet sich im Inneren der Diaphyse Fettgewebe oder blutbildendes Gewebe.

Während in der Fetal- und Kleinkindzeit die langen Röhrenknochen von blutbildendem Mark gefüllt sind, werden sie im Laufe der Zeit und mit zunehmendem Alter durch Fettmark ersetzt, sodass sich beim Erwachsenen nur noch Fettmark in den langen Röhrenknochen befindet.

Um den ständigen Umbau, die Regulation des Calciumhaushalts und die Blutbildung zu gewährleisten, ist der Knochen in jedem Abschnitt von getrennten Gefäßen versorgt. Die zur Diaphyse ziehenden Aa. nutriciae durchbohren den kompakten Knochen in eigenen Kanälen.⁴¹

Ausgenommen von den knorpeligen Gelenkflächen wird der Knochen auf seiner Oberfläche komplett vom reich mit Blutgefäßen und Nerven versorgten Periost bedeckt, welches den Knochen zeitlebens zu Dickenwachstum befähigt.⁴² Alle

Innenräume des Knochens werden von Endost ausgekleidet, welches aus einer dünnen Schicht von nicht mineralisierten Kollagenfibrillen und, wie das Periost auch, den Lining-Cells (mesenchymale Stammzellen, Osteoprogenitorzellen, Osteoblasten) besteht. Bei Bedarf können diese Lining-Cells aktiviert werden, um ihrer physiologischen Funktion nachzukommen bzw. sich zur benötigten Entität zu differenzieren.⁴¹⁻⁴³ Direkt unter dem Periost befindet sich die Rindenschicht, welche maßgeblich für die Stabilität des Knochens verantwortlich ist. Die Dicke der Rindenschicht (Substantia corticalis) variiert, abhängig von ihrer mechanischen Beanspruchung.⁴²

Mikroskopisch besteht der Knochen vor allem aus extrazellulärer Matrix (EZM). Zusammengesetzt ist die EZM aus Kollagenfibrillen, Hydroxyapatit-Kristallen und in kleineren Mengen Proteoglykanen, verschiedenen Glykoproteinen und anorganischen Ionen wie z.B. Magnesium, Fluorid und Carbonat. Hydroxyapatit ist ein mikroskopisch kleiner, hexagonaler Kristall, der in seiner Ausrichtung von den Kollagenfibrillen bestimmt wird.⁴¹ Durch seine Affinität zu den Kollagenmolekülen entsteht eine longitudinale Anordnung. Diese führt zu einer Verbundstruktur aus druckfesten Mineralkristallen und zugfesten Kollagenfibrillen, wodurch die Biegefestigkeit des Knochens entsteht.⁴¹

Die räumliche Organisation der EZM ermöglicht eine Unterscheidung in Geflecht- und Lamellenknochen. Der Geflechtknochen besteht aus in Bündeln angeordneten Kollagenfibrillen, deren histologisches Bild an ein Flechtmuster erinnert. Bei der schnellen Bildung von Knochen entsteht zuerst Geflechtknochen, der später durch biomechanisch hochwertigeren Lamellenknochen ersetzt wird. Beim Lamellenknochen sind die Lamellen konzentrisch in Osteonen um einen Haverskanal angeordnet und entsprechend ihrer Hauptbelastungsrichtung ausgerichtet.⁴¹

Der Aufbau der Knochenmatrix findet durch die Osteoblasten statt, die zu ruhenden Osteozyten werden können, wenn sie selbst vollständig von Knochenmatrix umgeben sind. Abgelagert wird die neue Knochenmatrix immer auf schon vorhandener, mineralisierter Matrix. Osteoblasten synthetisieren Kollagen und steuern die Mineralisation der EZM. Zudem überwachen sie den Knochenabbau. Abgebaut wird die Knochenmatrix durch die Osteoklasten, die unter anderem über den Receptor Activator of NF- κ B (RANK) und seinen Liganden sowie Osteoprotegerin von den Osteoblasten reguliert werden.⁴¹

3.2 Knochenheilung

Im Gegensatz zu anderen Geweben ähnelt die Knochenheilung der Knochenbildung in der Embryonalentwicklung, wodurch eine vollständige Wiederherstellung von Struktur und Funktion möglich wird.⁴⁴

Generell unterteilt man in direkte und indirekte Frakturheilung. Als Voraussetzung für die direkte Frakturheilung wird eine stabile Fixierung und ein Abstand zwischen den Frakturrenden von weniger als 1 mm angesehen.⁴¹ In den meisten Fällen heilt der Knochen folglich indirekt, da diese Voraussetzungen oft nicht erfüllt werden.⁴⁵ Während bei der direkten Frakturheilung der Knochen direkt wieder in lamellärer Struktur aufgebaut werden kann und das Haversche System direkt wieder hergestellt wird, läuft die indirekte Frakturheilung über eine Reihe von Zwischenschritten ab.⁴⁵ In der initialen Phase spielt die Bildung des Frakturhämatoms und die dafür notwendige proinflammatorische Immunantwort eine wichtige Rolle.⁴⁶ Anschließend kommt es zur Ausbildung von Granulationsgewebe und zum Überwiegen von antiinflammatorischen Mediatoren, eine zunehmende Hypoxie im Frakturgebiet sorgt für die Ausschüttung von HIF1 α durch Immunzellen, wodurch die notwendige Revaskularisierung initiiert wird.⁴⁷ Für die Knochenbildung ist die Rekrutierung und Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen (MSCs) in osteogene Zellen notwendig. Angenommen wird, dass die MSCs nicht nur aus dem umliegenden Bindegewebe, Muskel, Knochenmark und Periost kommen, sondern auch eine systemische Rekrutierung von zirkulierenden MCSs stattfindet.⁴⁸

Das Frakturhämatom dient als Basis für die Bildung des weichen Kallus durch die Chondrozyten. Ausgehend vom Periost findet das Einwachsen von Geflechtknochen statt, welcher die Fraktur überbrückt und zur Lastaufnahme befähigt. Zusätzlich beginnt die enchondrale Ossifikation durch die Hypertrophie und Hypoxie der Chondrozyten.^{47,49} Eine voranschreitende Resorption der extrazellulären Matrix ermöglicht die weitere Vaskularisierung und somit die suffiziente Sauerstoffversorgung und Ausbildung von mineralisiertem Knochen.⁴⁷ Nach knöcherner Überbrückung der Fraktur findet ein Remodelling des Geflechtknochens in lamellären Knochen statt.⁴⁸ Das Ausfallen von Hydroxyapatitkristallen in sogenannten Mineralisationsnestern vervollständigt die Rückkehr des Knochens in seine ursprüngliche Struktur.⁵⁰

Besonders in den frühen Phasen der Knochenheilung ist eine rigide Fixierung notwendig, um die Ausbildung des weichen Kalluses zu ermöglichen. In den späteren

Phasen der Heilung spielen Mikrobewegungen eine wichtige Rolle, da sie die Knochenbildung stimulieren.^{51,52} Die Differenzierung der MSCs wird entscheidend durch die herrschende Belastung stimuliert. Mit zunehmender Belastung nimmt die chondrogene Differenzierung zu, die Bildung von Geflechtknochen hingegen ab.⁵³ Zu viel Bewegung im Frakturspalt führt zu überschießender Kallusbildung und anschließend zur Ausbildung einer hypertrophen Pseudarthrose, während zu wenig Belastung zu einer atrophen Pseudarthrose führen kann.⁵⁴

Neben der Frakturfixierung kann auch über Biomaterialien oder Medikamententräger Einfluss auf die Knochenheilung genommen werden, um die Heilung zu unterstützen und dem neugebildeten Knochen eine Stützstruktur zu bieten, in welche er einwachsen kann.⁵⁵ Zum erfolgreichen Ablaufen des mehrdimensionalen Prozesses der Knochenheilung sind neben mechanischer Stabilität und Revaskularisierung, wenn Biomaterialien eingebracht wurden, die Vorgänge der Osteogenese, Osteoinduktion und Osteokonduktion essentiell.⁵⁶ Osteogenese beschreibt den Vorgang des Durchwachsens des Knochens durch ein sich resorbierendes Material. Als osteoinduktiv hingegen wird ein Biomaterial bezeichnet, welches die Einwanderung von primitiven Zellen zeigt, welche sich daraufhin zu knochenbildenden Zellen differenzieren.⁵⁶ Osteokonduktive Materialien begünstigen das Wachstum von Knochen auf ihrer Oberfläche und in Kanälen oder Poren.⁵⁶

3.3 Miniplattenosteosynthese

Der therapeutische Goldstandard für die Frakturbehandlung im Unterkiefer- und Mittelgesichtsbereich beinhaltet die offene Reposition und Osteosynthese^{3,4}, wobei das Prinzip der Miniplattenosteosynthese zur Anwendung kommt.

Das Prinzip der Miniplattenosteosynthese wurde von Michelet et al. erstmals publiziert⁵⁷ und von Champy et al. weiterentwickelt.⁵⁸ Das Ende der 1960er und Anfang der 70er Jahre entwickelte Verfahren zur Osteosynthese am Unterkiefer, hat das Ziel der Vermeidung oder Verkürzung der mandibulo-maxillären Fixierung und einer schnellen Funktionswiederherstellung.⁵⁷ Es ersetzt die statische Kompression der Kompressionsplattenosteosynthese durch eine dynamische Kompression.⁵⁹ Von zentraler Bedeutung ist hierbei die Beachtung der Biomechanik: Durch Platzierung der

Platten entlang der Zugtrajektoren des Unterkiefers wird die Osteosynthese hauptsächlich durch Zugkräfte belastet, wodurch ein minimalistisches Design ermöglicht wird.⁵⁹ Durch die Zugbelastung der Platten entsteht ein korrespondierender Druck im basalen Abschnitt des Kiefers⁵⁹ mit dem Ziel einer primären Frakturheilung. Neben der Biomechanik ist die exakt ausgeführte OP-Technik essentiell. Die Basis bildet eine optimale Frakturposition und die Wiederherstellung der Okklusion.⁵⁷ Nach der Stellung der Fraktur wird mithilfe einer Repositionszange Kompression auf dem Frakturspalt erzeugt, die Platte wird subperiostal platziert und passgenau angeformt.⁵⁸ Alle Schrauben müssen in tragfähigen, gesunden Knochen eingebracht werden und werden monokortikal platziert, auch um eine Verletzung der Zahnwurzeln zu vermeiden.⁵⁷⁻⁵⁹ Empfohlen wird eine Versorgung innerhalb der ersten sechs Stunden nach Trauma.⁵⁸

Zwischen Schrauben und Platte kommt eine Verankerung zustande („locking“), jedoch mit der Möglichkeit einer Variabilität des Winkels zwischen Schraube und Platte einhergehend.⁵⁹ Das minimalistische Design der Miniplatten erlaubt kleine Zugänge, erleichtert intraorale Zugänge und verursacht nur geringe Weichteilirritationen durch das Implantat.⁵⁹

Für die Versorgung von Unterkieferfrakturen werden Miniplatten in einer Stärke von 0,7-1,0 mm verwendet, meistens weisen die Schrauben einen Durchmesser von 2,0 mm auf.⁶⁰ Im Gegensatz zur Dynamischen Kompressionsplatte (DCP) ist keine Kompression des Frakturspalts über die Platte möglich⁶⁰ und, anders als die ebenfalls am Unterkiefer verwendeten winkelstabilen Rekonstruktionsplatten, herrscht bei Miniplatten das Prinzip des load sharing,⁵⁹ das bedeutet, dass ein Großteil der Kraftübertragung über den Knochen stattfindet.

Neben der Versorgung von verschiedenen Frakturen des Unterkiefers können mit diesem System auch Frakturen des Mittelgesichts versorgt und osteomyokutane Transplantate am Unterkiefer fixiert werden.^{58,61} Als Ausschlusskriterien gelten hohe Kollumfrakturen und Capitulumfrakturen oder eine bestehende Infektion, die das Einbringen von Osteosynthesematerial generell ausschließt.⁵⁸

3.4 Magnesium

3.4.1 WE43

Die Klassifikation der Magnesiumlegierungen erfolgt nach der ASTM (American Society for Testing and Materials) Norm B951. Hierbei setzt sich die Bezeichnung zusammen aus den Buchstaben, welche die zwei bzw. drei Hauptlegierungselemente repräsentieren, gefolgt von deren gerundeten Gewichtsprozenten. Die Legierung WE43 besteht dementsprechend aus 4 wt. % Yttrium (W) und 3 wt. % Seltenen Erden (E) sowie 93 wt. % Magnesium.

Da reines Magnesium sehr reaktiv ist, werden für Biomaterialien bevorzugt Legierungen verwendet. Für das Korrosionsverhalten von Magnesium sind das umgebende Medium und die Legierung entscheidende Faktoren.⁶² Durch die passivierenden Elemente in der Legierung wird die Degradationsrate herabgesetzt und so die Materialeigenschaften für den geplanten Einsatzbereich als Implantatmaterial verbessert.

Neben reinem Magnesium werden verschiedene Magnesiumlegierungen für die medizinische Verwendung *in vitro* und *in vivo* getestet. Unter anderem handelt es sich dabei um Legierungen des LAE442-, AZ91E-, AZ31- und WE43-Systems.¹⁰

Das in dieser Studie verwendete WE43 weist folgende Elementkomposition auf: 0.01 % Zn + Ag, 4.1 % Y, 0.002 % Cu, 0.02 % Mn, 0.002 % Fe, 0.0 % Li, 0.000 % Ni, 2.2 % Nd, 0.5 % Zr, 0.65 % Seltene Erden, <0.01 andere Unreinheiten, alle anderen Anteile Mg.⁶³

3.4.2 Mechanische Aspekte

Damit ein Material sich für die Anwendung als Osteosynthesematerial als geeignet erweist, muss es verschiedene Kriterien erfüllen. Von zentraler biomechanischer Bedeutung ist das Elastizitätsmodul oder kurz E-Modul, welches bei linear-elastischem Verhalten den proportionalen Zusammenhang zwischen Normalspannung und Dehnung bei der Verformung eines Festkörpers unter einachsiger Beanspruchung beschreibt.⁶⁴ Folglich wächst das Elastizitätsmodul mit dem Widerstand, den ein Material seiner elastischen Verformung entgegensetzt.⁶⁴

Im Vergleich besteht zwischen den E-Modulen von kortikalem Knochen (5-23 GPa) und Magnesium (41-45 GPa) ein wesentlich geringerer Unterschied, als zwischen kortikalem Knochen und den in der Medizin verwendeten Titanlegierungen (110-117 GPa).⁶⁵ Bei der Verwendung eines Materials zur Stabilisierung von Knochen sind geeignete biomechanische Eigenschaften des Biomaterials von entscheidender Bedeutung. Denn sowohl ein wesentlich höheres als auch ein niedrigeres E-Modul kann zu Komplikationen führen. Eine große Differenz im E-Modul zweier Feststoffe kann Stress-shielding⁶⁶ und somit Frakturen verursachen. Einerseits wird der Knochen in dem vom Implantat überbrückten Bereich von der auftretenden Belastung übermäßig abgeschirmt und es kommt zur Osteopenie, andererseits verformt sich das Implantatmaterial bei Verformung des Knochens nicht in gleichem Maße wie der Knochen, sodass Frakturen in der Grenzzone begünstigt werden. Gleichzeitig ist eine mechanische Stimulation für die Knochenbildung notwendig,⁵⁵ da interfragmentäre Mikrobewegungen die Knochenneubildung und das Remodelling stimulieren.^{51,52}

Die Auswirkungen des Stress-shieldings auf die Frakturheilung konnten in der Studie von Pobloth et al. 2018⁶⁷ gezeigt werden. So führte im critical-size Defektmodell beim Schaf ein niedrigeres Stress-shielding zu einer schnelleren Defektüberbrückung und stärkeren Knochenbildung als bei der Vergleichsgruppe.⁶⁷

MSCs haben die Fähigkeit, sich zu Fettgewebe, Bindegewebe oder Knochen zu differenzieren.⁵⁵ Während sich bei niedriger Substratsteife Fettgewebe bildet, entsteht bei gesteigerter Substratsteife und niedrigem Sauerstoffpartialdruck Knorpel.⁵⁵ Erhöht sich der Sauerstoffpartialdruck, differenzieren die Zellen eher zu Bindegewebe, nur bei hohem Sauerstoffpartialdruck und hoher Substratsteife hingegen entsteht Knochen.⁵⁵

Ein Material mit einem geringeren E-Modul als kortikaler Knochen kann nur mit Einschränkungen für die Stabilisierung verwendet werden, da es der physiologischen Belastung in lasttragenden Bereichen nicht standhält. Osteosynthesen aus Polylactiden können deshalb nur für ausgewählte Indikationen im nicht lasttragenden Bereich verwendet werden.

Mit einer Dichte von $1,74 - 2,0 \text{ g/cm}^3$ besitzen Magnesium und Magnesiumlegierungen eine wesentlich geringere Dichte als medizinische Titanlegierungen ($4,43 \text{ g/cm}^3$) und eine ähnliche Dichte wie kortikaler Knochen ($1,8 - 2,1 \text{ g/cm}^3$).^{10,65}

In der Zusammenfassung ist Magnesium sowohl in Druck und Zugfestigkeit, als auch in der Elastizität dem kortikalen Knochen ähnlicher als andere verwendete Materialien wie Titan, Stahl, Polylactide, Bioglas oder Keramik^{10,68} und aus diesem Grund aus

biomechanischer Sicht besser für die Verwendung als Osteosynthesematerial geeignet. Da es eine höhere Biegefestigkeit als Polylactide, Bioglas oder Keramik aufweist, ist es als einziges resorbierbares Osteosynthesematerial für den lasttragenden Bereich geeignet.⁶⁸

Für die Frakturheilung ist die biomechanische Integrität während der Heilungsphase wichtig, um dem Knochen die nötige Stabilität zu geben⁶⁸ (siehe 3.1). Als ideales Konzept wird eine schrittweise Mehrbelastung des Knochens bis hin zu seiner physiologischen Belastung angesehen.

Ideales Degradationsverhalten von Magnesiumimplantaten

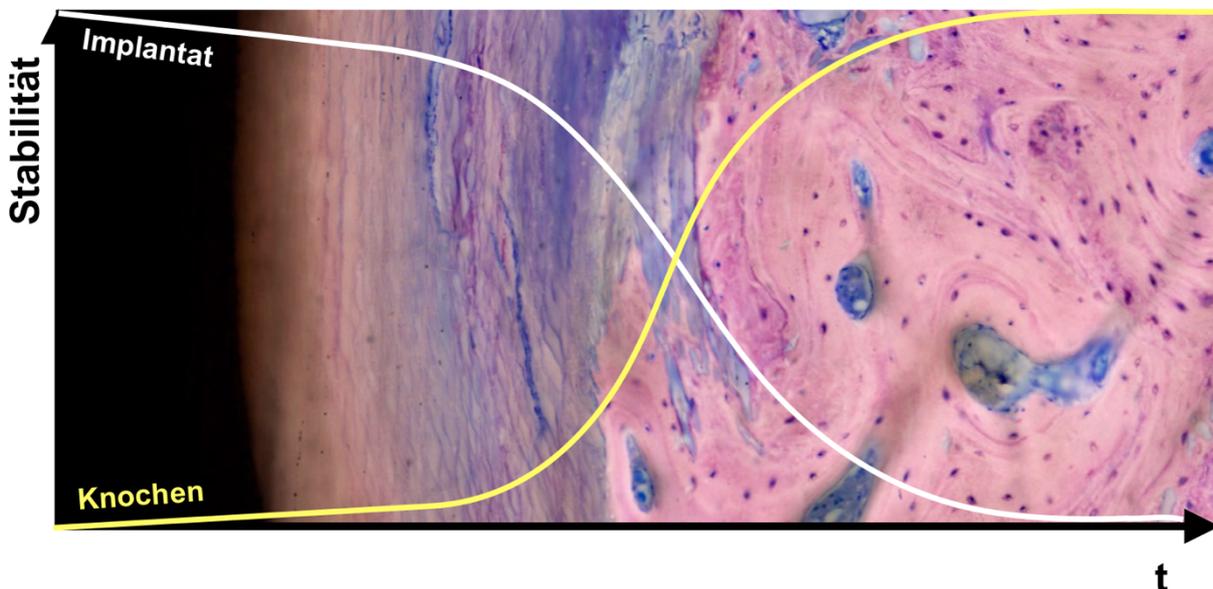


Abb. 3.1: Implantatdegradation im Verhältnis zum Knochenaufbau. Adaptiert nach Banerjee et al. 2019.

3.4.3 Biokompatibilität

Magnesium ist das vierthäufigste Kation im menschlichen Körper⁶⁹ und insgesamt enthält unser Körper ca. 24 g Magnesium.⁷⁰ Mehr als 60 % davon befinden sich in Knochen und Zähnen gespeichert,⁷¹ der größte Teil davon als Substitutionen im Kristallgitter des Hydroxylapatits um die Löslichkeit der Hydroxylapatitkristalle zu erhöhen.^{70,72} Das knochenengebundene Magnesium trägt entscheidend zum Gleichgewicht des Serumlevels bei. Bei Absinken der Magnesiumkonzentration im Serum kann Magnesium von der Knochenoberfläche mobilisiert werden, ebenso kann bei einem Magnesiumüberschuss die vermehrte Bindung im Knochen stattfinden.⁷³ Bis

zu 30 % des knochenengebundenen Magnesiums wird als schnell austauschbar bezeichnet.⁷⁴

Für die Magnesium-Homöostase sind Darm, Knochen und Niere verantwortlich,⁷² ein anfallender Überschuss wird über Niere oder Stuhl ausgeschieden (siehe Abb. 3.2).⁷² Magnesium spielt eine wichtige Rolle als Enzym bei zahlreichen vor allem ATP-abhängigen Prozessen, trägt zu physiologischen Membranfunktionen wie der Zelladhäsion bei, wirkt als Kalzium-Antagonist bei Muskelkontraktion- und Relaxation, bei Neuro-transmitterausschüttung und Aktionspotentialweiterleitung und hat außerdem eine strukturgebende Funktion in beispielsweise Proteinen und Nukleinsäuren.⁷⁵

Das normale Serumlevel von Magnesium bei einem gesunden Erwachsenen wird mit 0,7-1,1 mmol/L angegeben.⁷⁶ Davon liegen ungefähr 20 % proteingebunden, 65 % als Ionen und der Rest in Komplexen mit verschiedenen Anionen wie Phosphaten oder Citraten vor.⁷⁷ Eine milde Hypo- oder Hypermagnesiämie werden als symptomarm beschrieben,⁷² während eine moderate Hypermagnesiämie mit Hypotension, Übelkeit, Durchfall, Erbrechen und Hautrötung einhergeht. Bei schweren Intoxikationen kann es außerdem zur neuromuskulären Dysfunktion, zu Areflexie und zum Koma kommen.⁷² Zu Symptomen der Hypermagnesiämie kann es beispielsweise nach vermehrter Einnahme magnesiumhaltiger Medikamente oder nach Infusion von unter anderem Magnesiumsulfat kommen.^{72,75} Hypermagnesiämie kommt meist bei Patienten mit Darm- und/oder Nierenerkrankungen vor.⁷⁵ Ab einem Serumlevel von >2,5 mmol/L wird eine Einschränkung der Muskeleigenreflexe beobachtet, steigt die Serumkonzentration über 5 mmol/L, kann eine generalisierte Muskelschwäche beobachtet werden.⁷⁶

Durch die Verwendung von Magnesiumimplantaten konnte im Tierversuch kein erhöhter Serumlevel von Magnesium nachgewiesen werden^{10,26,27,28,29,30} und es wurde bisher keine toxische Schwelle oder Nebenwirkungen von aus Implantaten freigesetzten Mg²⁺-Ionen in der Literatur berichtet.³²

Magnesium-Homöostase im menschlichen Körper

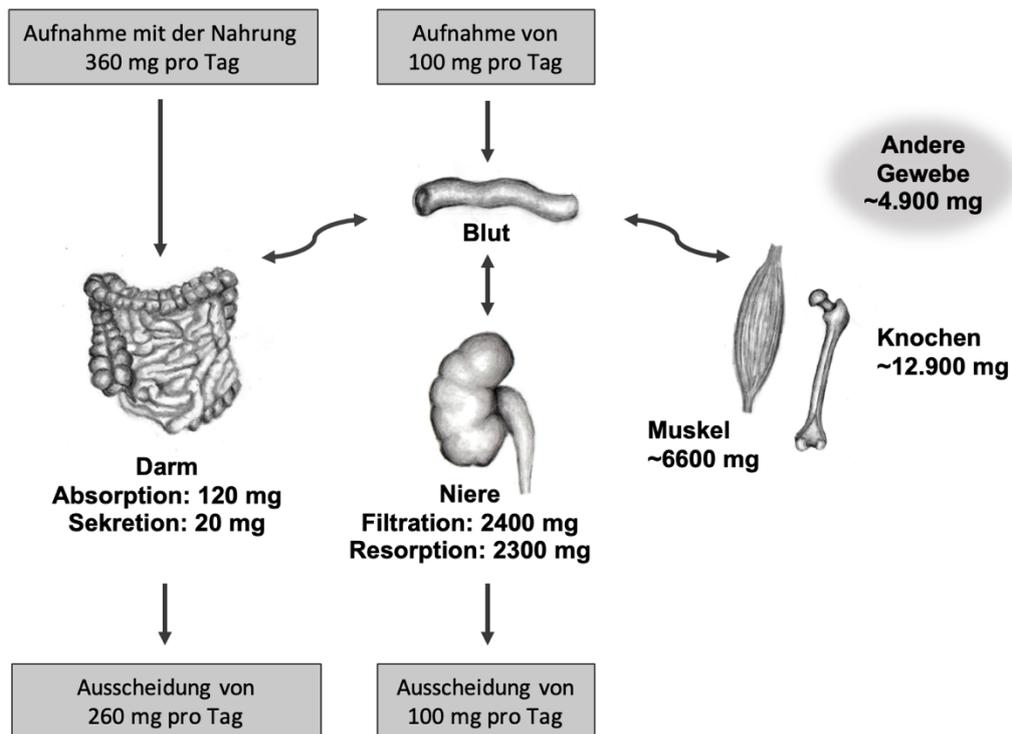


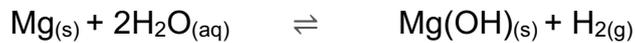
Abb. 3.2: Magnesium-Homöostase im menschlichen Körper. Addaptiert nach Jahnen-Dechent and Ketteler 2012.

Zusammenfassend werden Magnesium und Magnesiumlegierungen als nicht toxisch und als Materialien mit einer guten Biokompatibilität bezeichnet.^{20,78,79} In zahlreichen Tierversuchen wurden Magnesiumimplantate verwendet, ohne dass ein lokaler oder systemischer toxischer Effekt oder eine auf das Magnesiumimplantat zurückzuführende negative Wirkung beobachtet werden konnte.^{38–40,80–82} Im Vergleich zu WE43 ohne Oberflächenmodifikation zeigt PEO-oberflächenmodifiziertes WE43 in vitro signifikant weniger Korrosionsanzeichen im elektronenmikroskopischen Bild und eine gesteigerte Korrosionsresistenz sowie eine signifikant bessere Zytokompatibilität.⁸³ In vitro Zytokompatibilitätstests nach DIN EN ISO 10993-5/-09 und basierend auf ISO 10993-5/-12 zeigen im Vergleich zu reinem Mg und zu unbehandeltem WE43 eine höhere Korrosionsrate und korrespondierend dazu eine schlechtere Zytokompatibilität bei reinem Magnesium und WE43 ohne Oberflächenmodifikation.^{63,84}

Die Degradation von Magnesium läuft in vivo mit einer anderen Geschwindigkeit als in vitro ab⁸⁵. Die Korrosion ist in ihrer Geschwindigkeit signifikant von der

Elektrolytzusammensetzung der umgebenden Flüssigkeit abhängig,⁸⁶ aber auch andere biologische Faktoren beeinflussen die Korrosionsgeschwindigkeit wie die Temperatur, Durchblutung,⁸⁷ oder die in der Umgebung vorhandenen Proteine.¹⁰

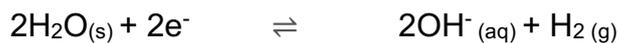
Degradation von Magnesium unter Anwesenheit von Wasser:



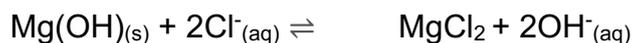
Geteilt in eine anodische Reaktion, bei der Magnesiumionen und freie Elektronen entstehen:



und eine kathodische Reaktion, bei der die frei gewordenen Elektronen mit Wasser reagieren, wodurch es zur Entstehung von Wasserstoffgas kommt:



Unter Anwesenheit von Chloridionen kommt es zur Bildung von Magnesiumchlorid und Hydroxidionen:



Gleichungen aus: Banerjee et al. 2019.

Im Laufe des Degradationsprozesses kommt es zu einer Ansammlung des Magnesiumoxids und -hydroxids auf der Oberfläche der Implantate, wodurch eine, die Oberfläche temporär vor weiterer Korrosion schützende, Schicht gebildet wird.⁸⁸ Übersteigt die Chloridkonzentration in der Umgebung jedoch 30 mmol/L, wird aus dem Magnesiumhydroxid leicht lösliches Magnesiumchlorid gebildet.¹⁰ Wird mehr Wasserstoffgas produziert, als sich in den umgebenden Geweben bzw. extrazellulärer Flüssigkeit lösen kann, kommt es zur Bildung von gasgefüllten Hohlräumen im umliegenden Gewebe.¹⁰

In vitro nehmen PEO-modifizierte WE43-Oberflächen nach 21 Tagen an Stabilität ab und die Bildung von Rissen beginnt, durch die dann Flüssigkeit eindringen kann, die mit dem Implantatinnenmaterial in Kontakt kommt.⁸⁸ Als Ausgangsort der Risse

werden die Mikroporen in der Oberflächenmodifikation angesehen, da sie die Rissbildung begünstigen.⁸⁹ In den so entstehenden Korrosionsnestern beginnt das Magnesium zu korrodieren und die Flüssigkeit dringt über die entstehenden Spalten weiter ins Materialinnere vor.⁸⁸ Durch diesen Umstand kann die Korrosion im Materialinneren schneller voranschreiten als an der Oberfläche und die, in Histologie und Mikro-CT sichtbare, für Magnesium charakteristische schollenartige Auflösung des Materials kommt zustande.

Die Menge an korrodiertem Magnesium steht in direktem Verhältnis zu der Menge an freiwerdendem Wasserstoffgas, ein Mol korrodiertes Magnesium setzt ein Mol Wasserstoffgas frei.⁸⁸

3.4.4 Zytologische Effekte

In der histologischen und radiologischen Evaluation des Degradationsprozesses von Magnesiumimplantaten ist eine auffallend große Menge an neu gebildetem Knochen festzustellen, welcher die Implantate umschließt und auch überwächst.⁸¹

Als Grund dafür wird die Anregung der Knochenbildung durch freiwerdende Magnesiumionen angesehen,⁹⁰ da eine adäquate Menge an freiwerdenden Magnesiumionen die osteoblastische Differenzierung und die Lebensfähigkeit der Zellen fördert.⁹⁰ Zusätzlich findet, durch die frei werdenden Magnesiumionen stimuliert, eine stärkere Expression von osteogenen Genen, eine gesteigerte EZM-Produktion und Mineralisierung, sowie eine stärkere Proliferation von mesenchymalen Stammzellen aus dem Knochenmark (hBMSCs) statt.⁹¹

Es konnte die stärkere Produktion von Kollagen Typ X und VEGF von osteogenen Zellen im Knochen unter Anwesenheit von Magnesium nachgewiesen werden.⁹² Magnesiumionen beeinflussen EZM-Proteine und Transkriptionsfaktoren, die für die gesteigerte Knochenbildung um korrodierende Magnesiumimplantate verantwortlich sind.⁹¹ Neben der Induktion von Osteogenese findet die Induktion der Angiogenese und neurale Stimulation durch Magnesiumionen statt.⁹³ Durch die freiwerdenden Magnesiumionen wird die Produktion von HIF1 α angeregt, welches die PGC-1 α -Produktion aktiviert und so in undifferenzierten und differenzierten hBMSCs die Produktion von VEGF stimuliert.⁹³

3.4.5 PEO-Oberflächenmodifikation

Die PEO-Oberflächenmodifikation, auch als electrolytic plasma oxidation (EPO) oder micro-arc oxidation (MAO) bezeichnet, wird durch ein elektrochemisches Verfahren aufgetragen und führt zu einer Plasmareaktion, bei der aus dem Substratmaterial WE43 eine oberflächliche Keramiksicht gebildet (MgO) wird.⁹⁴

Ähnlich der Anodisation sorgt das Verfahren für die Herstellung beziehungsweise Verstärkung von Oxidschichten⁹⁴ und kann sowohl für Magnesium, als auch für andere Metalle wie beispielsweise Titan verwendet werden.⁹⁵ Zur Herstellung der PEO-Oberflächenmodifikation werden Magnesium oder Magnesiumlegierungen in eine Elektrolytlösung getaucht und es erfolgt die Einleitung von Starkstrom.⁹⁶ Dadurch wird eine chemische Konversionsänderung des Metalls in seine Oxidform erzeugt, die sich sowohl nach innen als auch nach außen von der originalen Oberfläche ausgehend ausdehnt.^{94,96} Die so hergestellte Oberfläche besteht aus Bestandteilen der vorherigen Implantatoberfläche und enthält außerdem Elektrolyte der Umgebungslösung.⁹⁷ Es kommt zu der Ausbildung von einer dreischichtigen Oxidschicht, die äußere Schicht wird als porös, die mittlere als mäßig kompakt und die innere Schicht als dünne kompakte Schicht mit guter Anhaftung, auch als Barrierschicht bezeichnet, beschrieben.⁹⁶ Das Interface der Oberflächenmodifikation ist im allgemeinen zickzackförmig⁹⁶ und als besonders charakteristisch gelten die Mikroporen, die sich bei der PEO-Oberflächenmodifikation ausbilden.⁹⁸ Die exzellente Adhäsion der Oberflächenmodifikation entsteht einerseits aufgrund des Einwärtswachsens,⁹⁶ andererseits aber auch wegen des Vorhandenseins von Poren und Rissen an der Oberfläche, die mit für die Adhäsion verantwortlich sind.⁹⁹ Durch die Veränderung der Parameter wie Elektrolytkomposition, der Stromstärke und der Expositionszeit können Oberflächen von unterschiedlicher Dicke, Rauigkeit und Porösität erzeugt werden.^{95,96,100} Charakteristisch für PEO-oberflächenmodifizierte Implantate ist eine matte hellgraue Oberfläche, die sich makroskopisch deutlich von der typisch metallisch schimmernden Oberfläche der unmodifizierten Implantate unterscheidet.⁹⁴ Mit PEO-/MAO-Oberflächenmodifikation können Oberflächen mit einer Dicke von 5-200 µm erzeugt werden.⁹⁶ Die PEO-Oberflächenmodifikation trägt zur Verbesserung der Biokompatibilität und der mechanischen Eigenschaften von magnesiumbasierten Biomaterialien bei, da sie die Korrosionsgeschwindigkeit herabsetzt, und Schutz vor

Abrieb, Korrosion und Hitze sowie elektrische Isolation bietet.^{96,100,101} So trägt die PEO-Oberflächenmodifikation ganz entscheidend dazu bei, den Einsatz von Magnesium in lasttragende Bereiche zu ermöglichen.⁹⁶

Durch die Oberflächenmodifikation wird der Kontakt der Magnesiumoberfläche mit Flüssigkeit verhindert und so zusätzlich die Korrosion reduziert.¹⁰² Es konnte eine langsamere Korrosion und geringere Zytotoxizität im Vergleich zu purem Magnesium oder WE43 ohne Oberflächenmodifikation gezeigt werden,^{100,102} ebenso wie eine reduzierte Menge an abgegebenen Magnesiumionen, woraus eine gesteigerte Osteoblastenaktivität resultiert.^{20,102,103}

Nach ca. 21 Tagen beginnt die Stabilität der PEO-Oberfläche abzunehmen und die Entwicklung von Rissen wird begünstigt. Infolgedessen können Flüssigkeiten eindringen und so die beginnende Korrosion auslösen.⁹⁴ Die in der Oberflächenmodifikation vorhandenen Poren gelten als Ort für die beginnende Korrosion.¹⁰¹ Das bei der Korrosion entstehende Magnesiumoxid und Magnesiumhydroxid ist in wässrigen Lösungen schwer löslich und akkumuliert folglich an der Substratoberfläche als passive Schicht, die das Mg temporär vor weiterer Korrosion schützt.^{32,94} Es kommt zur Ausbildung einer hexagonalen Kristallstruktur, welche die Korrosion nur durch Diffusion erlaubt. Da Diffusion durch Kristalle relativ langsam und ungerichtet abläuft, wird so der Korrosionsprozess weiter verlangsamt.⁹⁴ Das Eindringen von Flüssigkeit und somit die Korrosion findet daher bei intakter äußerer Schicht in sogenannten Korrosionsnestern statt.⁹⁴

Die in dieser Studie verwendete PEO-Oberflächenmodifikation wurde unter Verwendung von einer Gleichrichterschaltung (Meotec M-PEO A1, Aachen, Deutschland) hergestellt. Alternierende positive und negative pulsierende galvanostatische Ströme von entweder 2 oder 3 A mit Spannungen zwischen 0 und 500 V wurden durch zwei Zuleitungskabel als Anode und Kathode eingeleitet. Die Pulsfrequenz betrug 20 Hz und die Expositionszeit der Implantate 15 min. Anschließend erfolgte die Spülung der Implantate in destilliertem Wasser und das Trocknen auf einem sterilen Tuch.¹⁰⁰

3.5 Vergleich zu anderen Osteosynthesematerialien

3.5.1 Titan

Um die Frakturposition aufrecht zu erhalten und physiologischen Belastungen zu widerstehen bis die Knochenheilung abgeschlossen ist, benötigt ein Osteosynthesematerial eine adäquate Stabilität. Gleichzeitig muss das Material flexibel genug sein, um in situ die Platten anformen zu können, da oft nur so die Aufrechterhaltung einer anatomischen Reposition möglich ist. Titan ermöglicht durch eine hohe Stabilität ein minimalistisches Design, wodurch es sich auch für lasttragende Bereiche bewährt hat.

Miniplatten aus Titan werden seit 1978 weltweit für die Frakturversorgung im Kiefer- und Gesichtsbereich verwendet und sie sind als sichere und zuverlässige Implantate etabliert.¹⁶ Auch zur Fixierung von mikrochirurgischen Transplantaten werden Titanplatten, entweder in der Form von Miniplatten oder als Rekonstruktionsplatten verwendet.¹⁰⁴ Müssen aufgrund eines Tumors größere Teile des Kiefers entfernt werden, folgt auf die Resektion und Kieferrekonstruktion eine regelmäßige Tumornachsorge.

Als Nachteile bei der Verwendung von Titanimplantaten sind radiologische Artefakte zu nennen. Obwohl Titan geringere radiologische Artefakte als andere verwendete Metalle verursacht, kommt es in der radiologischen Bildgebung zu Artefakten, die die Beurteilung erschweren.¹⁰⁵ Bei der Radiotherapie kann durch Titanimplantate ein Abschirmungseffekt entstehen.¹⁰⁵ Neben der Röntgendiagnostik verursachen Titanplatten auch im MRT signifikant mehr Artefakte als alternative Osteosynthesematerialien.¹⁰⁶ Von besonderem Nachteil ist das Entstehen von Artefakten bei der radiologischen Bildgebung für die Tumornachsorge. Durch diese wird die Beurteilung der radiologischen Bildgebung erschwert, so dass sowohl Tumorrezidive, als auch implantatassoziierte Komplikationen leichter übersehen werden können.¹⁰⁶

Über die Zeit kann es zu einem Partikelabrieb kommen, der eine Immunreaktion im Sinne einer low-grade-Infektion oder Fremdkörperreaktion mit Abkapselung des Implantates verursachen kann. Im umliegenden Gewebe, in Lymphknoten und besonders in Makrophagen, lässt sich bei dem längeren Verbleib von Titanimplantaten im Körper ein Partikelabrieb nachweisen.^{5,6} Daraus kann über einen längeren Zeitraum

eine Fibrosierung, Kapselbildung oder eine chronische Immunreaktion resultieren.^{6,9,107}

Zusätzlich besteht das Risiko der Wanderung des Osteosynthesematerials oder Schrauben- bzw. Plattenbruch. Bedingt durch die große Differenz des E-Moduls zwischen Titan und Knochen¹⁰ kann es zu Stress Shielding^{11,12} und Knochenverlust¹² kommen. Durch die Anpassung des Knochens an seine Belastung nach dem Gesetz der Transformation der Knochen¹⁰⁸ kommt es bei der dauerhaften Entlastung des Knochens, beispielsweise durch eine stabile Osteosynthese, zur Abnahme der Knochendichte und so zur Begünstigung einer implantatnahen Fraktur und Lockerung der Implantate.^{11,12}

Aufgrund von klinischen Symptomen, wegen einem geplanten Zweiteingriff oder im wachsenden Skelett kann eine Materialentfernung als zweite Operation mit allen dazugehörigen Risiken notwendig werden.¹⁵

Zu den häufigen Gründen für eine Materialentfernung zählen: Palpables Osteosynthesematerial, Platten- und/oder Schraubenlockerung, Schmerzen, Infektion, Wunddehiszenz und die Entfernung im Rahmen einer weiteren Operation.¹⁷ Im wachsenden Skelett wird die Entfernung generell empfohlen, um die Behinderung des Knochenwachstums und Dislokation zu vermeiden.^{18,19}

3.5.2 Polylactide

Für die Frakturversorgung mit einem resorbierbaren Osteosynthesesystem stehen verschiedene Polylactide zur Verfügung. Die zumeist aus Polylactid (PLA) und/oder Polyhydroxyessigsäure (PGA) sowie aus der L-Isomerform von PLA (PLLA) beziehungsweise aus einer Kombination selbiger hergestellten Platten und Schrauben ermöglichen eine temporäre Fixierung für die Zeit der Frakturheilung, ohne dauerhaft im Körper zu verbleiben. Ideal sind solche Implantate für den Einsatz im wachsenden Skelett und unter nicht lasttragenden Bedingungen, beispielsweise für Frakturen im Mittelgesichtsbereich.

In Bezug auf die Resorptionsgeschwindigkeit weisen die verschiedenen Implantate große Unterschiede auf. Sie reicht von wenigen Monaten bei Polyglycolid bis zu fünf Jahren bei poly-L-Lactid²¹. Im Rahmen des Degradationsprozesses kann es zu einer Fremdkörperreaktion mit Abkapselung zum Teil noch mehrere Jahre nach Implantation kommen.^{22,23}

Polyactidbasierte Implantate weisen eine deutlich niedrigere Festigkeit auf als Titan (TiAl6V4 114 GPa, DL-PLA 1.9-2.4 GPa¹⁰) und eine niedrigere Festigkeit als Knochen (Kortikaler Knochen: 5-23 GPa¹⁰) auf. Im Vergleich zwischen Miniplatten aus Polyactid und Titan weisen Titanplatten bei gleicher Plattendicke eine signifikant höhere Zerreißfestigkeit und Steifigkeit auf.¹⁰⁹ Somit wird die Verwendung von polyactidbasierten Implantaten auf den Einsatz in nicht lasttragenden Bereichen limitiert.

3.6 Fragestellung und Zielsetzung der Studie

Vor dem Hintergrund aktueller wissenschaftlicher Erkenntnisse wurden folgende Fragestellungen formuliert:

- Kommt es zu den Untersuchungszeitpunkten von 6 und 12 Monaten zu einer schnelleren Degradation der WE43-basierten Magnesiumimplantate ohne Oberflächenmodifikation im Vergleich zu PEO-oberflächenmodifizierten Implantaten?
- Lässt sich, im Vergleich zwischen WE43-basierten Magnesiumimplantaten ohne Oberflächenmodifikation zu PEO-oberflächenmodifizierten Implantaten, zu den genannten Untersuchungszeitpunkten eine Veränderung der Knochenquantität und -struktur feststellen?
- Findet im Vergleich zwischen WE43-basierten Magnesiumimplantaten ohne Oberflächenmodifikation zu PEO-oberflächenmodifizierten Implantaten eine unterschiedliche Osseointegration statt?

Ziel dieser Studie ist es somit, mit Hilfe eines Langzeitversuchs im Minipigmodell, die Degradation, Knochenquantität und -struktur sowie die Osseointegration von WE43-basierten Magnesiumimplantaten ohne Oberflächenmodifikation mit WE43-basierten Magnesiumimplantaten mit PEO-Oberflächenmodifikation zu vergleichen, um die PEO-oberflächenmodifizierten Implantate für einen möglichen klinischen Einsatz zu evaluieren. Durch die herabgesetzte Degradationsgeschwindigkeit der PEO-oberflächenmodifizierten Implantate können die Nebeneffekte der

Magnesiumdegradation wie die Reduktion der Knochendichte im angrenzenden Knochen verringert und eine höhere Stabilität erreicht werden. Diese Arbeit soll die Unbedenklichkeit des Einsatzes der PEO-oberflächenmodifizierten Magnesiumimplantate zeigen, um diese im klinischen Alltag ohne Bedenken verwenden zu können.

Das Minipig wurde als Versuchstier ausgewählt, da es, durch seine dem Menschen ähnlichen Knochendimensionen, die Untersuchung von Implantaten in Originalgröße ermöglicht. Es handelt sich um ein etabliertes Versuchstier, welches neben anderen Untersuchungen für Implantattests zum Einsatz kommt. ^{38,40,82,110},

Im Hinblick auf Makro- und Mikrostruktur, Knochenzusammensetzung und Geschwindigkeit des Bone-Remodelling sind Schweineknochen dem menschlichen Knochen ähnlicher als die Knochen von Schaf, Ziege und Kaninchen.¹¹¹ Auch die lamelläre Struktur und Mineraliendichte ist vergleichbar zu der des Menschen.¹¹¹ Als ideales Modell werden die Knochen von Affen und Hundeknochen angesehen¹¹¹, beide scheiden jedoch aus ethischen Gründen als Versuchstier aus.

Bei der radiologischen Untersuchung mit Hilfe des Mikro-CTs handelt es sich um eine hochauflösende dreidimensionale Darstellung von Knochen und Implantatmaterial, die besonders für die oben genannte Fragestellung geeignet ist, da Magnesium keine Artefakte in der radiologischen Bildgebung verursacht und gleichzeitig eine andere Radiogenität als Knochen aufweist. Neben der Messung von Knochen- und Implantatvolumen zur Evaluation der Degradation kann die Bestimmung der Knochenquantität in definierten VOIs stattfinden, die, im Vergleich zu der Referenzmessung des nativen Knochens, auf die Osseointegration der Implantate schließen lässt.

Die histomorphometrische Auswertung ermöglicht die Bestimmung zusätzlicher Parameter und die Untersuchung nicht mineralisierter Gewebe. So können, neben der Definition der Implantatdegradation und Bestimmung der Knochenquantität, in definierten ROIs die direkte Kontaktfläche und die Knochenstruktur analysiert werden. Dadurch kann eine Aussage über die direkte Kontaktfläche und das Ausmaß der stattgefundenen Umbauvorgänge getroffen werden. Zusätzlich ermöglicht die histomorphometrische Auswertung die Quantifizierung der Überwachung der Platte und somit der, durch das Magnesium angeregten, Knochenneubildung.

4. Material und Methoden

4.1 Implantate

Verglichen wurden WE43-basierte Magnesiumimplantate ohne Oberflächenmodifikation mit PEO-oberflächenmodifizierten WE43-basierten Magnesiumimplantaten nach einer Standzeit von 6 und 12 Monaten. Pro Frakturplatte verwendeten wir 4 CMF-Schrauben von 11 mm Länge in gleichem Oberflächencharakter (siehe Abb. 4.1 und 4.2). Die Verteilung der Implantate auf Humerus und Femur wurde für jedes Tier randomisiert, um Effekte einer inhomogenen Kortikalisdicke zwischen den einzelnen Tieren, aber auch zwischen Humerus und Femur zu minimieren.

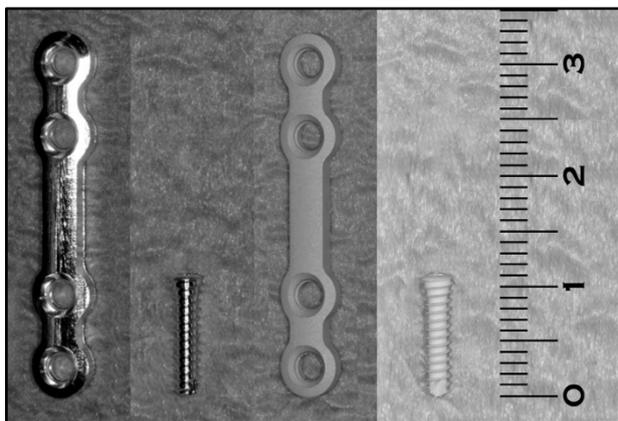


Abb. 4.1

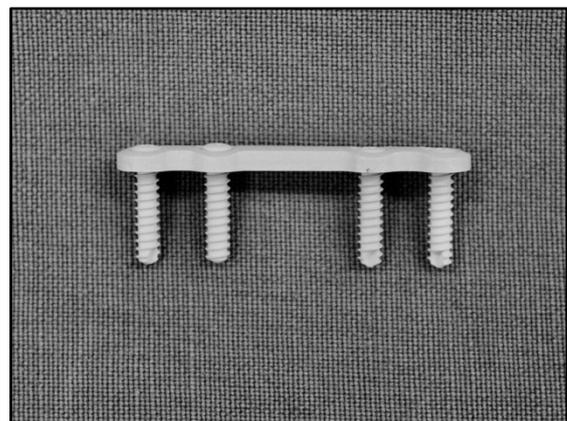


Abb. 4.2

Implantate in unbeschichteter (links) und beschichteter Ausführung (rechts). Schrauben: 2,3x11 mm, Platte: 33 mm x 2 mm, locking (Abb. 4.1). Platte und Schrauben in angewendeter Kombination (Abb. 4.2).

Die Herstellung der Implantate erfolgte durch Karl Leibinger Medizintechnik GmbH und Co. KG (Tuttlingen, Deutschland) in Kooperation mit Meotec GmbH (Aachen, Deutschland).

4.2 Versuchstiere

4.2.1 Herkunft der Tiere

Mit Genehmigung des Tierversuchsvorhabens durch die Behörde für Gesundheit und

Verbraucherschutz Hamburg (Tierversuchsantrag Nr. 49/16) wurden je 4 ausgewachsene Göttinger Minipigs pro Gruppe (2 Gruppen) für die Versuche verwendet (siehe Tab. 4.1).

Die Gesundheit der Tiere bei Versuchseintritt hat eine tierärztliche Eingangsuntersuchung sichergestellt.

Herkunft der Tiere:

C. Schlesinger	oder/ und	Gerd Heinrichs
Dorfstraße 17		Tichelkamp 14
Klein Erkmannsdorf		
01454 Radeberg		52525 Heinsberg

Tier	Ohrmarke/Kennzeichnung	Gewicht	Geschlecht
1.3	keine Ohrmarke, Kennzeichnung hinten blau	53,5 Kg	m/kastriert
1.4	keine Ohrmarke, Kennzeichnung hinten grün	51,0 Kg	m/kastriert
1.5	keine Ohrmarke, keine Kennzeichnung	58,5 Kg	m/kastriert
3.1	Ohrmarke 612	45,5 Kg	w
2.1	keine Ohrmarke, Kennzeichnung vorne rot	74,0 Kg	m/kastriert
2.3	keine Ohrmarke, Kennzeichnung hinten rot	63,5 Kg	m/kastriert
2.5	keine Ohrmarke, Kennzeichnung schwarz gefleckt	51,5 Kg	m/kastriert
3.4	Ohrmarke 577	30,0 Kg	w

Tab. 4.1: Gewicht und Geschlecht der Versuchstiere.

4.2.2 Haltung und Fütterung

Nach der Anlieferung hatten die Minipigs eine Eingewöhnungsphase von vier Wochen. Sowohl Wasser als auch Futter standen im gesamten Versuchszeitraum ad libitum zur Verfügung. Die Tiere erhielten Ssniff Minipig Haltungsfutter (Ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland) und wurden jeweils mindestens zu zweit in Standardboxen auf Stroh gehalten. Tierhaltung und Versuchsdurchführung sowie die Euthanasie und Entnahme fanden in der zentralen Tierhaltung am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf (Forschungstierhaltung, Gebäude N67, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, Martinistraße 52, 20246 Hamburg) statt. Gemäß den

Empfehlungen der FELASA wurde in der Versuchstierhaltung quartalsweise ein Hygienemonitoring mit Untersuchung auf Endo- und Ektoparasiten und serologischen Untersuchungen durchgeführt.

4.3 Operation und Probengewinnung

4.3.1 Operation

Zunächst erfolgte die Sedierung der Tiere mittels 4 mg/kg Körpergewicht (KGW) Azaperon (Stresnil, Elanco, Bad Homburg, Deutschland). Die Anästhesie der Tiere wurde mittels 2 mg/kg KGW Xylazin (Xylapan, Vetoquinol, Ismaning, Deutschland) und 20 mg/kg KGW Ketamin (Ketasin, Virbac, Glattbrugg, Schweiz) i.m. eingeleitet. Nachdem sich die Tiere hingelegt hatten, konnte eine Venenverweilkanüle in die Ohrvene gelegt werden, die für die weitere Gabe von intravenösen Medikamenten genutzt wurde.

Die endotracheale Intubation wurde mit einem Miller Gr. 4 Laryngoskop und Standard Tubus 6-7 mm (Portex, Smiths Medical, Kent, England) durchgeführt. Durch ein automatisches Narkosegerät (Dräger, Lübeck, Deutschland) wurde mit 40 % O₂ und 1,6-2 % Sevofluran die Narkose aufrechterhalten. Als Richtwert für das Atemvolumen diente 400 ml, die Atemfrequenz lag bei ca. 20 Atemzügen pro Minute. Diese Parameter wurden individuell entsprechend des Körpergewichts der Tiere angepasst. Zur Überwachung der Vitalfunktion erfolgte während der gesamten Operation neben der klinischen Beobachtung die Messung der Sauerstoffsättigung, eine nichtinvasive Blutdruckmessung, die Erfassung der Herzfrequenz mittels EKG und die kontinuierliche Messung der Körpertemperatur. Als perioperative antibiotische Therapie erhielten die Tiere eine i.m. Single-shotantibiose mit Amoxicillin/Clavulansäure (Synulox, Zoetis, Berlin, Deutschland) in einer Dosierung von 8,75 mg/kg KGW. Für die Dauer der OP erhielten die Tiere über einen Perfusor Fentanyl mit einer Rate von 10 µg/kg/h. Um das Austrocknen der Bindehäute und der Cornea zu verhindern, wurde den Tieren nach Einleitung der Narkose Bepanthenalbe in die Augen appliziert (Bepanthen, Bayer, Leverkusen, Deutschland). Nach Desinfektion des Operationsfeldes mit Povidon-Iod (Betaisodona, Braun, Melsungen, Deutschland) erfolgte die Fixierung der Tiere in Bauchlage durch vorgefertigte Schaumstoffkissen. Das Operationsgebiet wurde mit einem Schlitztuch abgedeckt.

Im Bereich eines Oberarms (Humerus) und eines Oberschenkels (Femur) erfolgte eine ca. 5 cm lange Längsinzision und die scharfe Durchtrennung von Unterhautfettgewebe und Faszie. Unter schonender, stumpfer Präparation und Beiseitehalten der Muskelschichten erfolgte die Freilegung des Knochens. Das Periost wurde inzidiert und mobilisiert. Im Diaphysenbereich des Knochens wurde nach Vorbohrung die Vierlochplatte mit jeweils vier monokortikalen Schrauben fixiert (siehe Abb. 4.3 und 4.4). Nach Insertion der Schrauben wurde das Periost und die Faszie mit einer resorbierbaren Naht verschlossen (Vicryl, Ethicon, Norderstedt, Deutschland), das Subkutangewebe adaptiert (Vicryl, Ethicon) und die Haut mit einem nicht resorbierbaren Faden in Einzelknopfnähten verschlossen (Prolene, Ethicon). Direkt postoperativ erhielten die Tiere zur Dämpfung des postoperativen Schmerzes 0,1 mg/kg KGW Buprenorphin (Buproenovet, Bayer) i.m.. Die gesamte Operation wurde unter aseptischen Bedingungen durchgeführt und dauerte pro Tier ca. 60 Minuten.

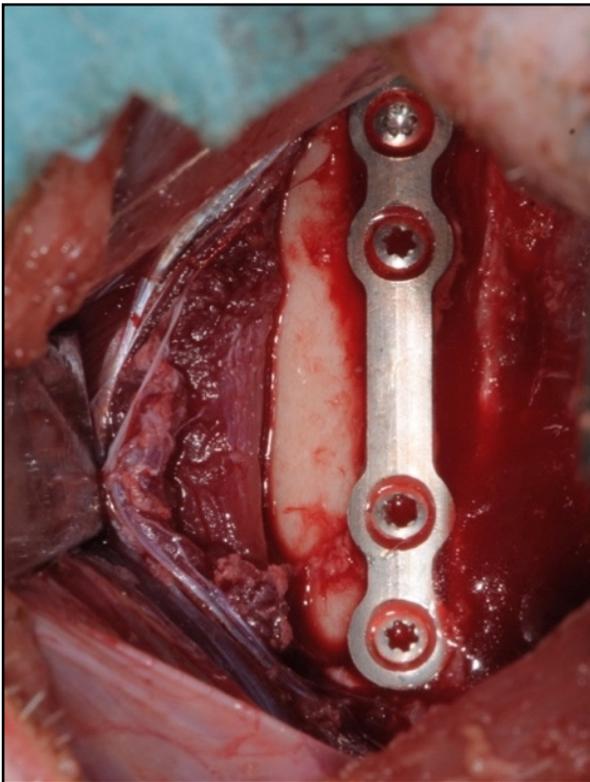


Abb. 4.3

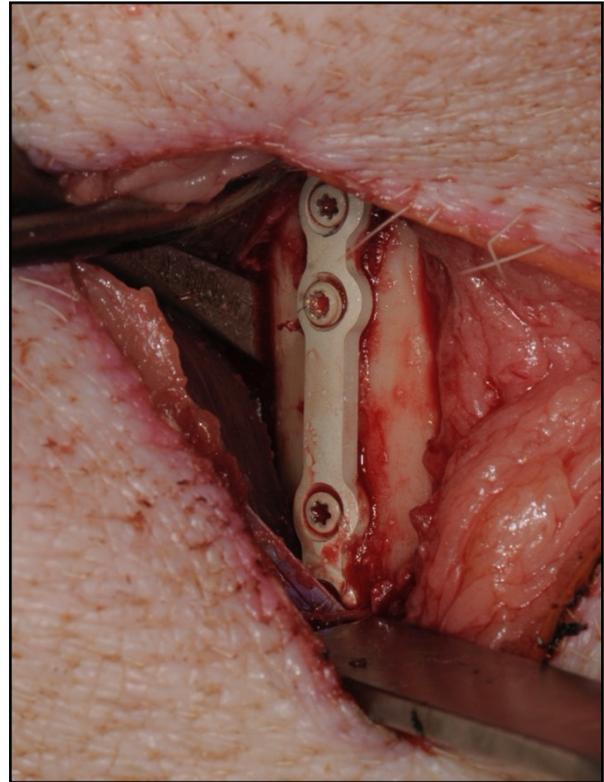


Abb. 4.4

Unbeschichtetes Implantat in situ (Abb. 4.3) und beschichtetes Implantat in situ (Abb. 4.4).

4.3.2 Operations- und Euthanasiezeitpunkte

Standzeit	Tier	OP	Euthanasie	Implantate
6 Monate	1.3	15.11.2016	16.05.2017	U, B
6 Monate	1.4	15.11.2016	16.05.2017	B
6 Monate	1.5	17.11.2016	16.05.2017	U, B
6 Monate	3.1	22.03.2017	26.09.2017	U
12 Monate	2.1	21.11.2016	30.11.2017	U
12 Monate	2.3	22.11.2016	30.11.2017	U, B
12 Monate	2.5	28.11.2016	30.11.2017	U, B
12 Monate	3.4	22.03.2017	26.03.2018	B

Tab. 4.2: Zeitpunkte der Operation und Euthanasie sowie die jeweiligen Implantate. B=beschichtet, U=unbeschichtet.

4.3.3 Postoperatives Regime

Die operierten Tiere wurden bis zum Zug der Fäden nach 10 Tagen separat gehalten. Für die ersten sechs postoperativen Tage erhielten die Tiere eine orale Antibiose mit Amoxicillin/Clavulansäure 10 mg/kg KGW alle 12 Stunden (Synulox, Pfizer, Berlin, Deutschland). Zur Schmerzlinderung bekamen die Tiere postoperativ für 7 Tage 4 mg/kg KGW Carprofen (Rimadyl, Pfizer) in Form von Kautabletten verabreicht.

Über den gesamten Studienzeitraum fand durch erfahrene Tierpfleger eine tägliche Begutachtung mit Kontrolle der Wundheilung, Beurteilung von Lahmheit und des klinischen Gesamtzustands statt.

4.3.4 Intra- und postoperative Komplikationen

Beschreibung der intra- und postoperativen Komplikationen der einzelnen Tiere sowie detaillierte Auflistung der verwendeten Medikamente, wenn Abweichungen vom in 4.3.1 und 4.3.3 beschriebenen Vorgehen vorlagen.

- Tier 1.3:** Narkoseeinleitung mit Ketamin (Ketasin, Virbac), Midazolam (Midazolam, Hexal, Holzkirchen), Azaperon (Stresnil, Elanco), Hypotonie in Narkose, Gabe von Norepinephrin (Arterenol, Sanofi, Berlin) als Dauertropfinfusion mit 0,5 µg/kg pro min., Gabe von Metamizol (Vetalgin, MSD, Haar) als einmaliger Bolus von 30 mg/kg KGW. Aufrechterhaltung der Narkose wie in 4.3.1 beschrieben, postoperatives Vorgehen wie in 4.3.3 beschrieben.
- Tier 1.4:** Narkoseeinleitung mit Ketamin (Ketasin, Virbac), Midazolam (Midazolam, Hexal, Holzkirchen), Azaperon (Stresnil, Elanco), Hypotonie in Narkose, Gabe von Norepinephrin (Arterenol, Sanofi, Berlin) als Dauertropfinfusion mit 0,5 µg/kg pro min., Gabe von Metamizol (Vetalgin, MSD, Haar) als einmaliger Bolus von 30 mg/kg KGW. Aufrechterhaltung der Narkose wie in 4.3.1 beschrieben, postoperatives Vorgehen wie in 4.3.3 beschrieben. Am 7. Tag postoperativ leichte Lahmheit, gutes Ansprechen auf Schmerzmittel 4 mg/kg KGW Carprofen (Rimadyl, Pfizer) und daraufhin rasche Besserung der Beschwerden.
- Tier 1.5:** Narkoseeinleitung mit 20 mg/kg Ketamin (Ketasin, Virbac) und 2 mg/kg Xylazin (Xylapan, Vetoquinol) weiteres Vorgehen wie in 4.3.1 beschrieben, tachykard in Narkose, mit einmaliger Bolusgabe von 2 mg/kg Lidocain (Lidocain, Streuli, Uznach), und Amiodaron (Cordarex, Sanofi) 1 mg/kg/h therapiert; Aufrechterhaltung der Narkose wie in 4.3.1 beschrieben postoperativ wie in 4.3.3 beschrieben. Verlängerte Aufwachphase.
- Tier 2.1:** Narkoseeinleitung mit 30 mg Midazolam (Midazolam, Hexal, Holzkirchen), 4 mg/kg Azaperon (Stresnil, Elanco) und 20 mg/kg Ketamin (Ketasin, Virbac), weiteres Vorgehen wie in 4.3.1 beschrieben, postoperatives Vorgehen wie in 4.3.3 beschrieben. Wundheilungsstörungen an Hinterbein, Behandlung topisch mit Acridinlösung und systemisch mit 10 mg/kg KGW Amoxicillin/Clavulansäure (Synulox, Zoetis) über 1 Woche, daraufhin komplikationslose Wundheilung.

- Tier 2.3:** Narkoseeinleitung mit 240 mg Azaperon (Stresnil, Elanco), 600 mg Ketamin (Ketasin, Virbac) und 30 mg Midazolam (Midazolam, Hexal, Holzkirchen), intra- und postoperativ wie in 4.3.1 und 4.3.3 beschrieben. Wundheilungsstörungen, über 14 Tage mit systemischer Antibiose 10 mg/kg KGW Amoxicillin/Clavulansäure (Synulox, Zoetis) und topisch mit Acridinlösung behandelt, danach komplikationsloser Verlauf.
- Tier 2.5:** Narkoseeinleitung mit 30 mg Midazolam (Midazolam, Hexal, Holzkirchen) und Azaperon (Stresnil, Elanco) und 20 mg/kg Ketamin (Ketasin, Virbac)
Intra- und postoperativ wie in 4.3.1 und 4.3.3 beschrieben. Wundheilungsstörungen, Behandlung topisch mit Acridinlösung und systemisch mit 10 mg/kg KGW Amoxicillin/Clavulansäure (Synulox, Zoetis) über 1 Woche, danach komplikationsloser Verlauf.
- Tier 3.1:** Narkoseeinleitung mit 20 mg/kg Ketamin (Ketasin, Virbac), und 2 mg/kg Xylazin (Xylapan, Vetoquinol), weiteres Vorgehen wie in 4.3.1 beschrieben. Postoperativ: Antibiose mit Cefuroxim 4mg/kg (Cefuroxim, AbZ Pharma, Ulm), Schmerzlinderung abweichend vom in 4.3.1 und 4.3.3. beschriebenen Vorgehen mit Meloxicam 0,2mg/kg (Meloxicam, Hexal, Holzkirchen).
- Tier 3.4:** Narkoseeinleitung mit 20 mg/kg Ketamin (Ketasin, Virbac) und 2 mg/kg Xylazin (Xylapan, Vetoquinol), intraoperativ wie in 4.3.1 beschrieben.
Verlängerte Aufwachphase.
Postoperativ: Antibiotische Therapie mit Cefuroxim 4 mg/kg (Cefuroxim, AbZ Pharma, Ulm), Schmerzlinderung mit Meloxicam 0,2 mg/kg (Meloxicam, Hexal, Holzkirchen).
Gute Erholung nach der OP, Behandlung der Wundnähte mit Acridinlösung am 04.04.2017 und bis zum 12.04.2017 weitergeführt. Am 04.10.2017 trat vorne rechts Lahmheit auf, Therapie mit 4 mg/kg KGW Carprofen (Rimadyl, Pfizer) bis zum 08.10.2017.

4.3.5 Euthanasie

Nach einer Einheilzeit von 6 bzw. 12 Monaten erfolgte die Euthanasie der Tiere. Zuerst erhielten die Tiere 2 mg/kg KGW Xylazin i.m. (Xylapan, Vetoquinol) und 20 mg/kg KGW Ketamin (Ketasin, Virbac). Dann wurde, nach dem Einschlafen des Tieres, ein Zugang in die Ohrvene gelegt, über den 10 mg/kg KGW Propofol (Rapinovet, Bayer) zur Narkosevertiefung und dann über den selben Zugang 10 ml T61 (T61, Intervet, Haar, Deutschland) oder 60 mg/kg KGW Pentobarbital (Release, Wirtschaftsgenossenschaft deutscher Tierärzte, Garbsen, Deutschland) zur Tötung gegeben.

4.3.6 Entnahme der Knochenproben

Zur Entnahme von Humerus und Femur wurde der Operationszugang erneut eröffnet und nach Bedarf erweitert. Unter Beiseiteschieben und, wenn nötig, Durchtrennen von Muskeln und Sehnen erfolgte die Entnahme der Knochen (siehe Abb. 4.5, 4.6 und 4.7). Beide Epiphysen wurden abgetrennt, um die Knochen für die Infiltration zu eröffnen. Dabei wurde auf einen Mindestabstand von 1 cm zur Platte geachtet. Die Knochenstücke kamen direkt im Anschluss in beschriftete und mit 10 %-iger Formaldehydlösung (Merck, Darmstadt, Deutschland) gefüllte Probengläser.

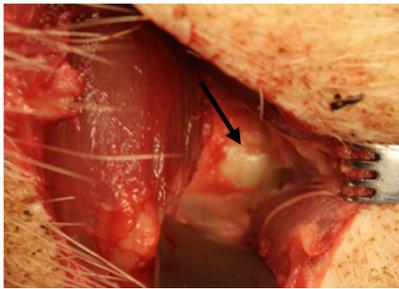


Abb. 4.5

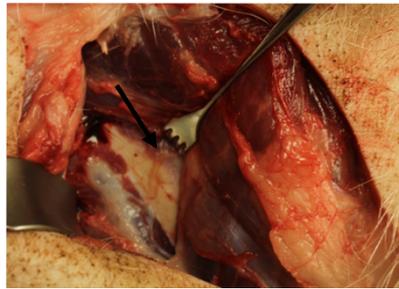


Abb. 4.6

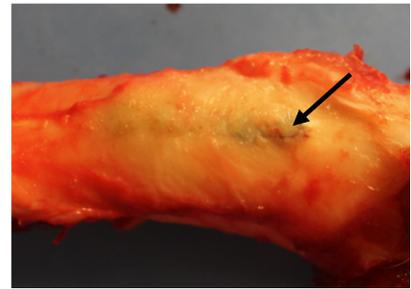


Abb. 4.7

Entnahme des Humerus (Abb. 4.5) und Femur (Abb. 4.6). Entnommenes Femur mit einer beschichteten Platte (Abb. 4.7). Durch die ausgeprägte Überwachsung der Platte durch Knochen ist die Platte erst nach der Entfernung der Muskelschicht sichtbar. Der schwarze Pfeil markiert die Lage der Platte.

4.4 Radiologische Auswertung

4.4.1 Erstellen der Mikro-CTs

Das Erstellen der Mikro-CTs erfolgte während des Entwässerns der Proben in der aufsteigenden Alkoholreihe (siehe 4.5.2). Um die Proben vor dem Austrocknen zu schützen, wurden die Knochenstücke mit in Alkohol getränkten Kompressen umwickelt und in Frischhaltefolie luft- und wasserdicht verpackt. Im Mikro-CT wurden die Proben in einer Tube fixiert, um Bewegungsartefakte zu vermeiden. Nach der Festlegung des zu scannenden Bereichs wurden die Scans mit folgenden Parametern durchgeführt: Voxelgröße von 19µm, 70kVp, 114A (VivaCT40, Scanco Medical AG, Brüttisellen, Schweiz).

4.4.2 Analyse der Mikro-CTs

Die radiologische Analyse der Schrauben und des umliegenden Knochens erfolgte mit Fiji mit der ImageJ Version 1.52f. Zuerst wurden die Mikro-CTs als DICOM konvertiert und nicht benötigte Bereiche abgeschnitten. Die so erstellte Datei konnte dann in Fiji importiert und für die Berechnung nach mgHA/ccm (Milligramm Hydroxylapatit pro Kubikzentimeter) kalibriert werden (genutztes Makro: μ CT Calibration). Um die Größe der Volumes-of-Interest (VOIs) bestimmen zu können, wurde die Dicke der Transkortikalis als Referenz gemessen. Dazu war es notwendig, die Platten in eine horizontale Ausrichtung zu drehen, um dann bei einem mittigen Anschnitt der Platten eine standardisierte Messung durchführen zu können (benutztes Plugin: Interactive Stack Rotation). Direkt gegenüber von der Platte konnten dann drei Messkreise gelegt werden, um die durchschnittliche Kortikalisdicke zu ermitteln.

Bei jeder Platte wurden dafür die Kreise jeweils gleich platziert, einmal proximal und distal zwischen den Schrauben sowie einmal transkortikal der Plattenmitte (siehe Abb. 4.8) Durch die in Fiji integrierte Messfunktion (Analyse > Measure) wurden die Durchmesser der Messkreise in Millimetern erfasst und anschließend der Durchschnitt aller gemessenen Werte gebildet.

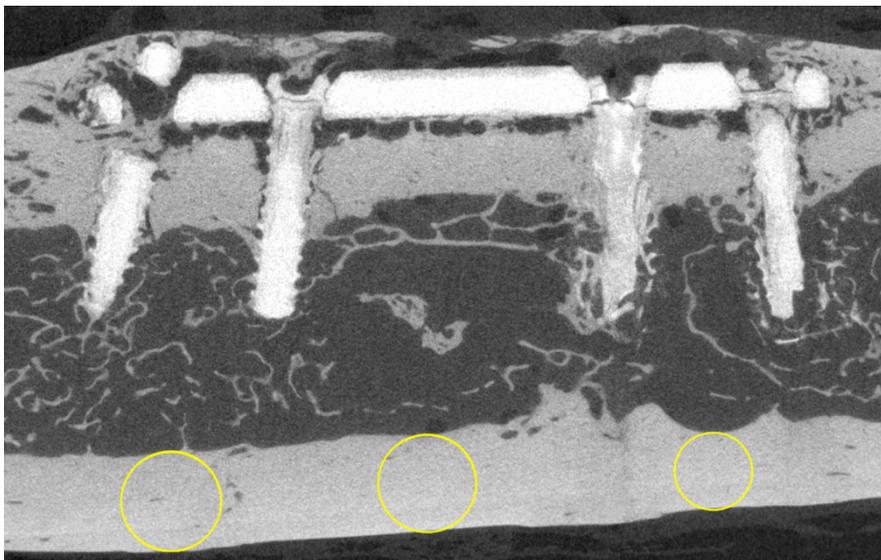


Abb. 4.8: Messung der Dicke der Transkortikalis. Jeder Messkreis (gelb) ermittelt einen Wert und aus diesen drei Werten wird im Anschluss ein Mittelwert für die entsprechende Probe gebildet. Im Bild zeigen die Messkreise die Werte 1-3 vlnr.
Probe: 12M-2.3-PLU-Fe

Probe	Messung der Gegenkortikalis [mm]			Bestimmung der Thresholds	
	Wert 1	Wert 2	Wert 3	Thr 1	Thr 2
6M-1.3-PLU-Fe	beschädigt			1261	507
6M-1.3-PLB-Hu	2,9144	2,7991	2,8762	1300	535
6M-1.4-PLB-Hu	beschädigt			1306	563
6M-1.5-PLB-Fe	beschädigt			1300	627
6M-1.5-PLU-Hu	2,5139	2,6099	2,8941	1350	509
6M-3.1-PLU-Fe	3,579	3,1993	3,6736	1324	515
12M-2.1-PLU-Fe	4,9268	4,9081	4,1485	1298	461
12M-2.3-PLU-Fe	4,3381	4,2433	3,4277	1297	492
12M-2.3-PLB-Hu	3,8635	3,2567	2,3604	1290	461
12M-2.5-PLU-Hu	3,0267	2,8368	3,579	1311	418
12M-2.5-PLB-Fe	2,7246	3,3887	3,579	1320	510
12M-3.4-PLB-Hu	2,5717	1,7742	1,4304	1192	558
Mittelwert (Werte 1-3)	3,24			1296	513

Tab. 4.3: Gemessene Dicke der Gegenkortikalis in mm, Mittelwert auf zwei Nachkommastellen gerundet. Ermittelte Thresholdwerte (Thr). Thr. 1 ist auf eine ganze Zahl gerundet.

Aus den in Tab. 4.4 zu sehenden Werten wurde eine durchschnittliche Kortikalisdicke von 3,24 mm ermittelt. Bei drei Proben wurde die Gegenkortikalis im Rahmen des Entnahme- oder Einbettungsprozesses beschädigt und konnte nicht für Messungen verwendet werden.

Anhand eines Schnittbilds konnten mit Hilfe der Histogrammfunktion von Fiji die Thresholds für die Separation zwischen Knochen und Schraube (Thr 1) sowie Knochen und Luft (Thr 2) bestimmt werden (siehe Abb. 4.9 und 4.10). Dabei wird es durch die Quantifizierung der Grauwerte des μ CTs möglich, abzulesen, wo sich die verschiedenen Strukturen gegeneinander abgrenzen. Auch diese Werte wurden gemittelt und somit standardisiert.

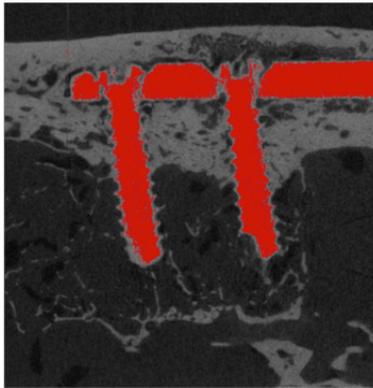


Abb. 4.9

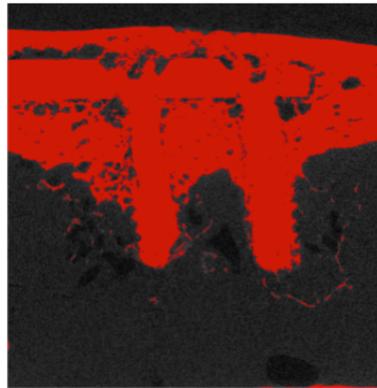


Abb. 4.10

Abb. 4.9 und 4.10: Kontrolle der ermittelten Thresholdwerte.

Abb. 4.9: Thr 1, Abb. 4.10: Thr 2. Alle vom Threshold erfassten, und somit für die Quantifizierung herangezogenen, Grauwerte sind in Rot dargestellt. Bei der alleinigen Nutzung von Thr 1 als unteren Grenzwert ohne einen oberen Grenzwert wird somit nur Magnesium quantifiziert, durch Thr 2 Magnesium und Knochen.
Probe: 6M-1.3-PLB-Hu

Die Berechnungen erfolgten anschließend in verschiedenen Volumes-of-Interest (VOIs). Dabei (siehe Abb. 4.11 und 4.12) bezeichnet SC den bei Implantation in die Kortikalis eingebrachten Teil der Schraube und SM den bei Implantation in den Markraum ragenden Teil. Für die Quantifizierung des Magnesiums innerhalb der SC- und SM-VOI wurde der Thr 1 genutzt, um weder in der VOI befindlichen Knochen noch Luft zu erfassen. Die G-VOI stellt den direkten Grenzbereich zwischen Implantat und Knochen, die U-VOI den in der Umgebung befindlichen Knochen dar. Die Quantifizierung des umliegenden Knochens spiegelt sich in der G- und U-VOI wider, auch hier wird zwischen dem Kortikalen- (C) und Markraumanteil (M) unterschieden. Bei G- und U-VOI wird der Bereich zwischen Thr 1 und Thr 2 genutzt, um Knochen, nicht aber versprengtes Implantatmaterial oder Luft zu erfassen.

Die Länge der C- und M-VOIs wurde anhand der errechneten durchschnittlichen Kortikalisdicke ermittelt:

$$\frac{1000 \mu\text{m}}{19 \mu\text{m}/\text{Slice}} = 52,63 \text{ Slices/mm}$$

$$19 \mu\text{m}/\text{Slice}^*$$

Ermittelte durchschnittliche Kortikalisdicke von 3,24 mm

$$3,24 \text{ mm} \times 52,63 \text{ Slices/mm} = \sim 171 \text{ Slices pro Kortikalis}$$

*Der Abstand zwischen den Slices ergibt sich aus der Voxelgröße von 19 μm .

Um eine Standard-VOI für die Schrauben zu erstellen, wurde ein Nativscan des Implantats als Basis für einen Schraubenumriss genutzt. Das Zip-File mit der Standard-VOI besitzt die definierte Ausrichtung parallel zur Z-Achse mit an der Schraubenspitze befindlicher Kerbe rechtsseitig oben. In diese Ausrichtung mussten also auch alle Schrauben gebracht werden.

Da die Schrauben nicht im exakt gleichen Winkel zur Platte stehen, war es notwendig, die einzelnen Schrauben zu separieren und jeweils getrennt auszuwerten. Nach der Ausrichtung der Schrauben parallel zur Z-Achse des Scans (genutztes Plugin: Interactive Stack Rotation), die Schraubenköpfe wurden dabei immer in Richtung Nullpunkt ausgerichtet, erfolgte die Freistellung der einzelnen Schrauben und das Speichern der Dateien im Tiff-Format. Jede, nun einzelne, Schraube benötigte daraufhin eine erneute Korrektur ihrer Ausrichtung in allen drei Achsen, dabei diente die am Ende der Schraube befindliche Kerbe als Orientierung. Nun konnte die Standard-VOI importiert und als individualisiertes VOI-Set abgespeichert werden. Für jeden Scan folgten im Anschluss folgende Arbeitsschritte: Der erste Slice unter der Platte wurde ermittelt und die darüber befindliche VOI abgeschnitten. So konnte der, aufgrund seiner Morphologie nur schwer von der VOI zu erfassende Schraubenkopf, von der SC-VOI ausgeschlossen und die Platte aus der GC- und UC-VOI entfernt werden. Daraufhin wurden die ermittelten 171 Slices für die Kortikalis addiert und die darunter befindlichen Slices ebenfalls abgeschnitten. Der so entstandene Abschnitt entspricht der SC-VOI und wurde neu abgespeichert. Um die direkte Kontaktfläche zwischen Knochen und Schraube abzubilden, wurde die SC-VOI um 0,5 mm vergrößert und als GC-VOI benannt. Die um 2 mm vergrößerte SC-VOI definiert die UC-VOI, welche als Basis für die Quantifizierung des, die Schraube intrakortikal umgebenden, Knochens dient. Analog dazu erfolgte die Erstellung der M-VOIs: Zuerst wurde der Schraubenkopf und der Kortikalisteil der Standard-VOI abgeschnitten, anschließend eine neue VOI als SM-VOI erstellt und daraufhin für GM- und UM-VOI in gleichen Werten wie die kortikalen VOIs vergrößert.

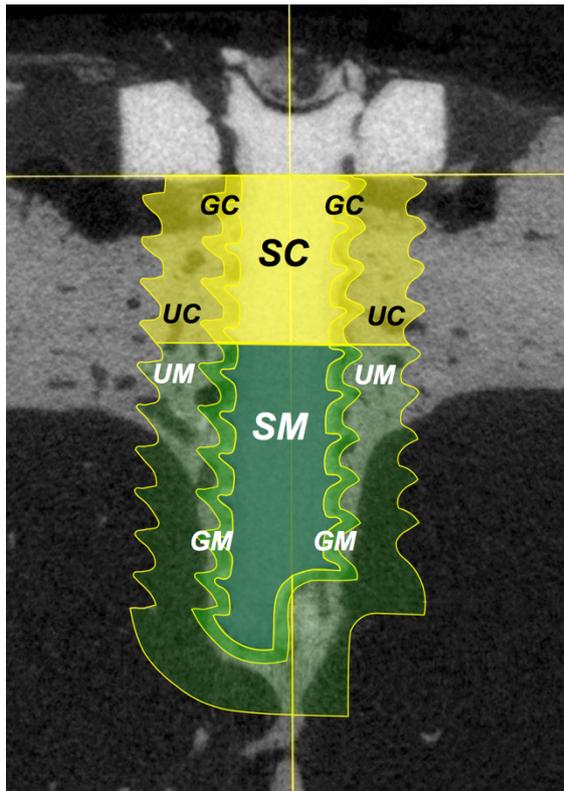


Abb. 4.11: Darstellung der VOIs im Mikro-CT.

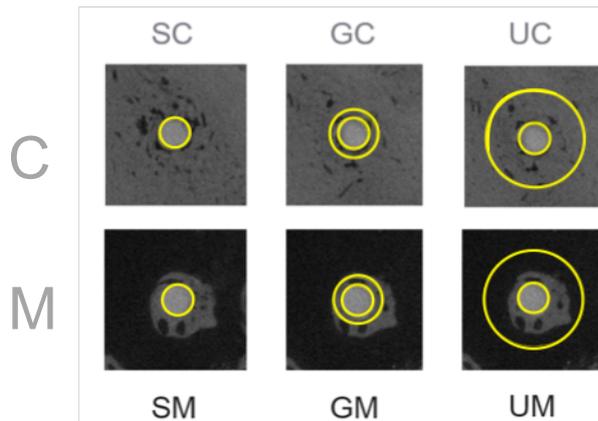


Abb. 4.12: Darstellungen des Schraubenquerschnitts als Screenshots aus dem CT-AnalyseMakro von Image J. Die gelbe Linie markiert die Grenze der gelegten VOI, im Zentrum des Bildes, etwas heller als der Knochen, ist die Schraube als Querschnitt zu sehen. Der mit „C“ bezeichnete Bereich befindet sich im kortikalen Knochen, der darunterliegende Teil ist mit „M“ (Markraum) benannt. Die weitere Benennung der VOIs ergibt sich aus der Kombination von C und M mit S=Schraube, G=Grenzgebiet oder U=Umgebung für die Ausdehnung des entsprechenden Messbereichs.

Die Quantifizierung erfolgte mit einem selbstprogrammierten ImageJ Makro. Für SC- und SM-VOIs mit der Einstellung „lower Thr 1296 mgHA/ccm“, für die Analyse der GC-/GM- und UC-/UM-VOIs mit dem festgelegten unteren Threshold von 513 mgHA/ccm und einem oberen Threshold von 1296 mgHA/ccm. Für eine einheitliche Abbildung der Farben wurde die Darstellung der 3D-Rekonstruktionen auf ein Minimum von -200 und ein Maximum von 1800 kalibriert.

4.4.3 Radiologische Referenzmessungen

Analog zu den radiologischen Messungen der Schrauben post implantationem erfolgte die Referenzmessung einer Schraube im unkorrodierten Zustand (siehe Tab. 4.4). Dazu wurde ein originalverpacktes Implantat mit oben beschriebenen Einstellungen gescannt, der Scan nach geschildertem Procedere gedreht, kalibriert, geschnitten und die schraubenförmige VOI eingelegt. Der Schraubenkopf wurde abgetrennt und der auf den Kopf folgende Teil auf 171 Slices geschnitten. Das so entstandene Stück wird als kortikaler Teil der Originalschraube (SCOri) bezeichnet. Entsprechend des

Vorgehens bei der Messung der Schrauben post implantationem ist der verbleibende Teil der Schraube SMOri.

Referenzmessungen Mikro-CT						
VOI	SC	SM	GC	GM	UC	UM
SV/TV [%]	88,56 %	89,00 %				
BV/TV [%]			89,09 %	5,69 %	89,47 %	7,69 %

Tab. 4.4: Referenzmessungen für die VOIs aus Kortikalis und Markraum.

Die Berechnung mit dem AnalyseMakro in Fiji in exakt dem gleichen Vorgehen wie bei allen gemessenen Proben ergab ein BV/TV (BV=Bone Volume, TV=Total Volume) von 87,7 % für das gesamte Implantat im unkorrodierten Zustand.

Die Differenz dieses Werts zu 100 Volumenprozent erklärt sich vor allem durch den gelegten Threshold. Der, durch Mitteln der an den Histogrammen abgelesenen Werte, standardisierte Wert, stellt einen Kompromiss dar und kann die Wirklichkeit nur eingeschränkt abbilden. Zusätzliche Einflussfaktoren auf den Ausgangswert der Schraube können Scanartefakte und Ungenauigkeiten im Randbereich der Schraube durch Rauigkeit des Materials sein (siehe Abb. 4.13). Auch die Richtung der auftreffenden Strahlen im μ CT könnte die Scanqualität beeinflussen.

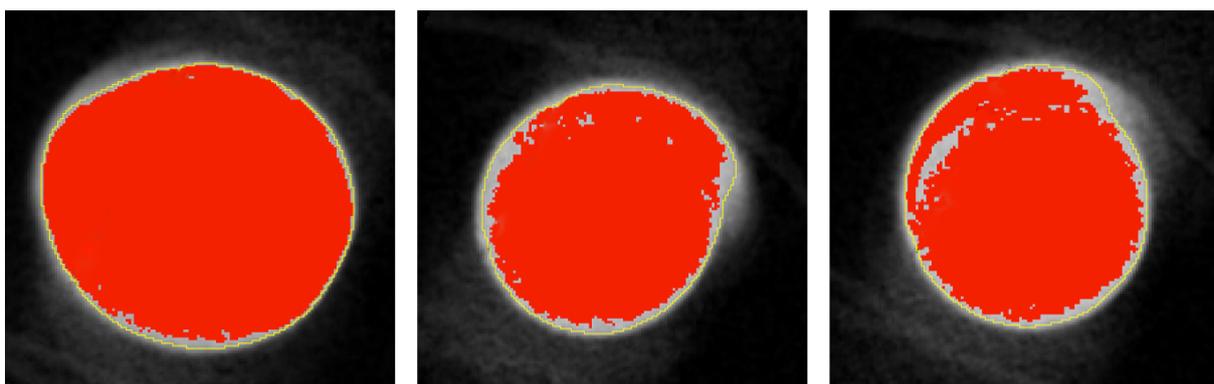


Abb. 4.13: Darstellung der Originalschraube im unkorrodierten Zustand in Mikro-CT. Der rot markierte Bereich zeigt die vom Threshold und somit von der Quantifizierung erfassten Voxel. In unterschiedlichen Bereichen wird auch die originale Schraube zu verschiedenen Anteilen vom Threshold erfasst. Im kopfnahen Teil zu 93,3 % (linkes Bild), im mittleren Bereich zu 85,7 % (Mitte) und nur zu 84,6 % (rechtes Bild) in kopffernen Bereichen. Dadurch kommt im Mittel ein Wert von 87,7 % zustande.

Korrespondierende Referenzmessungen für G- und U-VOIs bilden die erfassten Volumenprozent im Referenzknochen ab, um nativen Knochen in Relation zu den implantatnahen Messungen setzen zu können (siehe Abb. 4.14).

Darstellung der VOIs im Vergleich zur Referenzmessung

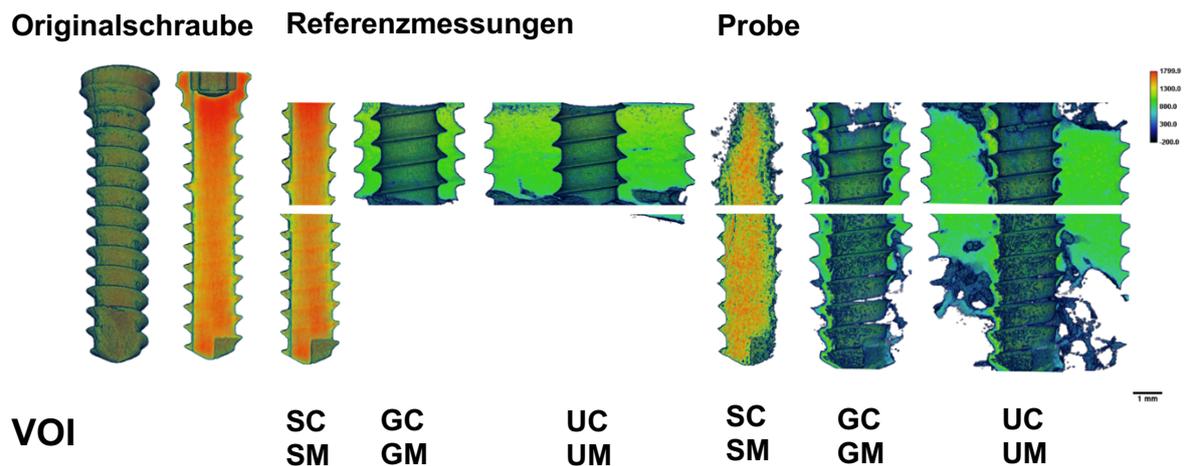


Abb. 4.14: 3D-Rekonstruktionen der gemessenen Volumenprozent für die Referenzmessungen. Im Vergleich dazu der durch das Implantat veränderte Knochen und das in der Resorption befindliche Implantat. Die Grauwerte des Mikro-CTs wurden für diese Darstellung in ein Farbschema übersetzt. So kommt, bedingt durch die unterschiedlichen Grauwerte von Magnesium und Knochen, Magnesium in Rot, Orange und Gelb und Knochen in Grün- und Blautönen zur Darstellung. Im Vergleich zwischen der Originalschraube und dem Implantat nach 12 Monaten („Probe“ im Bereich SC und SM) zeigt sich deutlich der Substanzverlust durch die Abnahme der Gewindehöhe und die Verschmälerung der Schraube. Außerdem zeigt sich die Korrosion des Magnesiums in der Veränderung der Grauwerte und somit der farblich zur Darstellung kommenden Voxel. Im knöchernen Bereich ist besonders die Anlagerung des Knochens an die Schraube im Markraum eindrucksvoll zu sehen. Während sich bei den Referenzmessungen im Bereich „GM“ und „UM“ kein Knochen zeigt, ist bei der hier gemessenen Probe in die GM- und UM-VOI Knochen im Markraum zu sehen. Probe: 2.3-PLU-S2

Die technische Umsetzung der Programmerweiterungen (Makros) erfolgte durch Mario Thiele.

4.5 Histologische Auswertung

4.5.1 Vorbereitung der Proben

Nach dem Erstellen der Mikro-CTs (siehe 4.4.1) wurde mit Hilfe einer Schleifmaschine (MetaServ™ 250, Buehler, Lake Bluff) an alle Proben unter Wasserkühlung eine plane Kante geschliffen, um eine Auflagefläche für die Einbettung zu erhalten und durch die Eröffnung des Markraums die Infiltration weiter zu verbessern.

4.5.2 Fixierung, Entwässerung und Entfettung

Um eine zuverlässige Infiltration der Proben mit den entsprechenden Medien zu gewährleisten erfolgte die Lagerung der Proben während der Fixierung, Entwässerung und Entfettung auf einem Schüttler (Laboshake, C. Gerhardt, Königswinter, Deutschland).

Zur Fixierung des Gewebes lagerten die Proben nach der Entnahme mindestens sieben Tage in 10 %-iger Formaldehydlösung.

Auf die Formalinfixierung folgte die Wässerung unter fließendem Leitungswasser für mindestens eine Stunde und dann die manuelle Entwässerung mit aufsteigender Alkoholreihe nach dem etablierten Schema:

Entwässerungsschema	
70 % Ethanol	7 Tage
80 % Ethanol	7 Tage
96 % Ethanol	2 x 7 Tage
100 % Ethanol	3 x 7 Tage

Tab. 4.5: Entwässerungsschema der Knochenproben. Die Verdünnung des Ethanols in die verschiedenen Konzentrationen erfolgte händisch, ausgehend von 100 %-igem Ethanol. (Ethanol absolut vergällt, Herbeta Arzneimittel, Berlin, Deutschland).

Bei jedem Alkoholwechsel wurde mit Hilfe eines Exsikkators (Exakt, Norderstedt, Deutschland) für 10 min. bei 400 mBar Vakuum gezogen, um Luftblasen aus der Lösung zu entfernen.

Zur Entfettung lagerten die Proben für 24 Stunden in Xylol (Xylene, J.T. Baker, Deventer, Niederlande), dabei verdrängt Xylol den Alkohol und mischt sich dann in den folgenden Schritten mit dem Einbettungsmedium.

4.5.3 Präinfiltration, Infiltration und Einbettung

Zum Entstabilisieren der Basislösung lief die Technovit Basislösung (Technovit 9100 Neu Basislösung I, Kulzer, Hanau, Deutschland) durch eine mit Baumwollwatte gestopften und mit 50 g Aluminiumoxid (Meck, Darmstadt) gefüllten

Chromatographiesäule. Alle folgenden Lösungen wurden aus der so entstabilisierten Basislösung hergestellt.

Für die Herstellung der Präinfiltrationslösung wurde die Basislösung im Erlenmeyerkolben auf dem Magnetrührer mit Hilfe eines Rührfisches gerührt und pro 200 ml Basislösung 1 g Härter 1 (Technovit 9100 Härter 1, Kulzer) hinzugegeben und dann weitere 30 min. gerührt. Das Gewebe wurde mit Präinfiltrationslösung übergossen und anschließend für 10 min. bei 400 mbar im Exsikkator evakuiert. Die Inkubationszeit der Präinfiltration betrug 5 Tage bei 4°C.

Unter Rühren auf dem Magnetrührer wurde für die Infiltrationslösung pro 200 ml Basislösung 20 g PMMA Pulver (Technovit 9100 Neu Pulver, Kulzer) in den Erlenmeyerkolben mit der Basislösung gegeben und danach auf 250 ml mit Basislösung aufgefüllt. Das Infiltrationsgemisch rührte daraufhin weitere 2 Stunden auf dem Magnetrührer, bis das PMMA Pulver vollständig aufgelöst war und die Lösung klar wurde. Anschließend wurde 1 g Härter 1 hinzugegeben und das Infiltrationsgemisch erneut auf dem Magnetrührer 20 min. gerührt.

Das Gewebe wurde mit Infiltrationslösung übergossen und im Anschluss 10 min. bei 400 mbar im Exsikkator evakuiert. Die Inkubationszeit für die 1. Infiltration betrug 7 Tage bei 4°C. Die Infiltration wurde in allen Schritten wiederholt und die Proben ein zweites Mal 7 Tage bei 4°C inkubiert.

Für die Stammlösung A wurde pro 350 ml Basislösung unter Rühren auf dem Magnetrührer in einem Erlenmeyerkolben 80 g PMMA Pulver hinzugegeben und auf 500 ml mit Basislösung aufgefüllt. Die Stammlösung A rührte ca. 2 Stunden, bis das PMMA Pulver vollständig aufgelöst war und die Lösung klar wurde. Anschließend wurden 3 g Härter 1 hinzugegeben und die Stammlösung A erneut auf dem Magnetrührer 20 min. gerührt. Zur Herstellung der Stammlösung B wurden pro 44 ml Basislösung in einem Erlenmeyerkolben unter Rühren auf dem Magnetrührer 4 ml Härter 2 (Technovit 9100 Härter 2, Kulzer) und 2 ml Regler (Technovit 9100 Regler, Kulzer) in die Basislösung gegeben und 2 min. gerührt. Das Polymerisationsgemisch wurde aus den Stammlösungen A und B im Verhältnis 9 Teile der Lösung A und 1 Teil der Lösung B in einem Messzylinder vorsichtig gemischt.



Abb. 4.15



Abb. 4.16



Abb. 4.17

Herstellung der Infiltrationslösung (Abb. 4.15), Vorbereitung der Einbettung (Abb. 4.16) und fertig eingebettete Probe (Abb. 4.17).

Die Proben wurden in die Einbettformen gegeben, ausgerichtet und vollständig mit dem Polymerisationsgemisch aufgefüllt. Anschließend wurden die aufgefüllten Einbettformen für 10 min. bei 400 mbar in einem Exsikkator evakuiert. Die aufsteigenden Luftblasen wurden vorsichtig mit einer Pipette entfernt und die Formen verschlossen. Zur Probenidentifikation wurden Zettel mit den Probennummern mit in die Blöcke eingebettet. Die Einbettformen kamen erneut in den Kühlschrank, um dort bei einer Temperatur von -4°C für 48 Stunden auszuhärten. Anschließend konnten die fertigen Blöcke aus den Einbettformen herausgelöst werden (siehe Abb. 4.18).

Da die Schrauben in unterschiedlichem Winkel zur Platte eingebracht waren, wurden die Schrauben zu separiert, um für jede Schraube eine möglichst optimale Schliffebene einstellen zu können. Deshalb wurden die Blöcke in vier Stücke gesägt (siehe Abb. 4.19), an ihrer Rückseite mit Hilfe einer Präzisionsschleifmaschine (Präzisions-Mikro-Schleifsystem Exakt 400 CS, Exakt) parallel zur Ebene des Implantates geschliffen und nach oben genanntem Procedere erneut eingebettet. Nach Einbettung und Aushärtung wurden die Blöcke auf der Schleifmaschine viereckig geschliffen und der über dem Implantat befindliche Kunststoff auf der Präzisionsschleifmaschine entfernt (siehe Abb. 4.20 ff.). Da die Präparate daraufhin eine zu geringe Höhe für die Einspannvorrichtung des Mikrotoms (Leica RM 2255, Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland) besaßen, erfolgte ein Aufblocken und bei Bedarf anschließend eine Korrektur der Aufblockmasse (Technovit 3040, Kulzer) auf der Schleifmaschine.

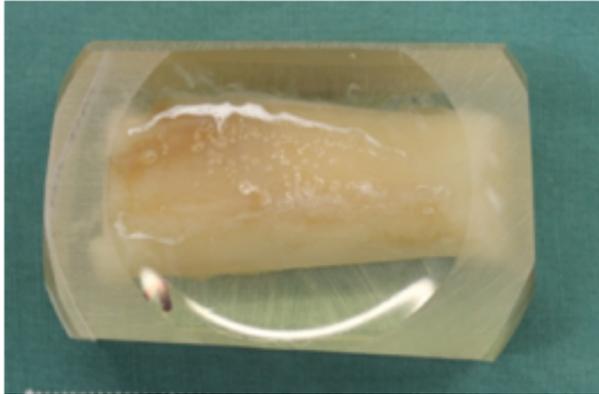


Abb. 4.18

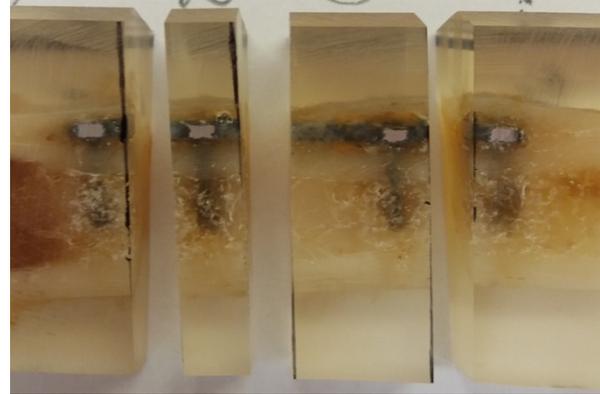


Abb. 4.19

Eingeblocktes Knochenstück (Abb. 4.18) und Zustand nach dem Herunterschleifen und Sägen (Abb. 4.19). Nachdem die Knochen als ganzes Stück eingebettet wurden, erfolgte ein vorsichtiges Herunterschleifen auf die Ebene der Platte, so dass die Sägeschnitte genau zwischen den Schrauben geplant werden konnten. An einer Bandsäge wurde anschließend der Block gesägt und die in Abb. 4.19 zu sehenden Stücke konnten dann durch erneutes Herunterschleifen des überstehenden Plastiks für die zweite Einbettung vorbereitet werden.

Nach dem vorsichtigen Anschneiden und, wenn nötig, Korrekturen der Schnittebene wurden unter Befeuchtung mit 30%-igem Alkohol am Hartschnittmikrotom (Leica RM 2255, Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland) 5µm dicke Serienschnitte erstellt. Die so entstandene Ebene konnte für die Erstellung der Schliffe genutzt werden.

4.5.4 Herstellung der Schliffe

Aus dem verbleibenden Block wurden ca. 100 µm dicke Schliffe in Trenn-Dünnschliff-Technik hergestellt. Damit die Blöcke auf die Objektträger aufgeklebt werden konnten, musste zuerst die Rückseite der Blöcke mit Hilfe der Präzisionsschleifmaschine (Präzisions-Mikro-Schleifsystem, Exakt) parallel zur Schnittfläche angeschliffen werden (220-er Körnung, Schleifdauer nach Bedarf 2-3 Minuten). Im Anschluss wurde die Rückseite des Blockes mit doppelseitigem Klebeband auf einen Plexiglasobjektträger geklebt. Die Dicke von Block und Objektträger wurde mit Hilfe einer Mikrometerschraube gemessen, ebenso die Dicke eines weiteren Objektträgers für die Herstellung des Sandwiches. Die Schnittfläche des Blockes und der zweite Objektträger wurden mit Petroleumbenzin (Suprasolv, Merck) gereinigt und luftgetrocknet. Dann erfolgte das Aufkleben der Schnittfläche mit Präzisionskleber (Präzisionskleber, Kulzer) auf den zweiten Objektträger und die Aushärtung in der Präzisionsklebepresse (Präzisionsklebepresse Exakt 402, Exakt) unter UV-Licht für 8 Minuten. Mit der Bandsäge (Diamant Bandsäge, Exakt 310 CP, Exakt) wurde eine

Präparatscheibe mit einer Dicke von 300 µm abgesägt. Es folgte ein erneutes Herunterschleifen mit der Präzisionsschleifmaschine auf eine Schliffdicke von ca. 100 µm unter Miteinbeziehung der Dicke der Klebeschicht und mit Hilfe von regelmäßigen Messkontrollen. Danach wurde der Schliff abschließend poliert (2500-er und 4000-er Körnung, jeweils 5 Minuten) und manuell nach Giemsa gefärbt (siehe Tab. 4.6).

Nach Abschluss der Färbung wurden die Proben mit Vitroclud (Firma Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland) eingestrichen und mit einem Deckglas versehen. Um die Färbung vor dem Ausbleichen zu schützen, wurden die gefärbten Schliffe lichtgeschützt gelagert.

Färbeschema der Schliffe	
Anätzen der Schliffe mit 1 % Ameisensäure (Suprapur, Merck)	1 min.
Wässern unter fließendem Leitungswasser	5 min.
Spülen mit destilliertem Wasser	2 min.
Färben in 3 %-iger Giemsalösung (Giemsas Azur-Eosin-Methylenblaulösung, Merck, händisch auf 3 %-ige Konzentration herunterverdünnt)	15 min.
Spülen mit 100 % Ethanol	1 min.
Färben in 3 %-iger Giemsalösung	20 min.
Spülen mit 100 % Ethanol	2 x 1 min.
Waschen in Xylol	2 x 1 min.

Tab. 4.6: Färbeschema der Schliffe.

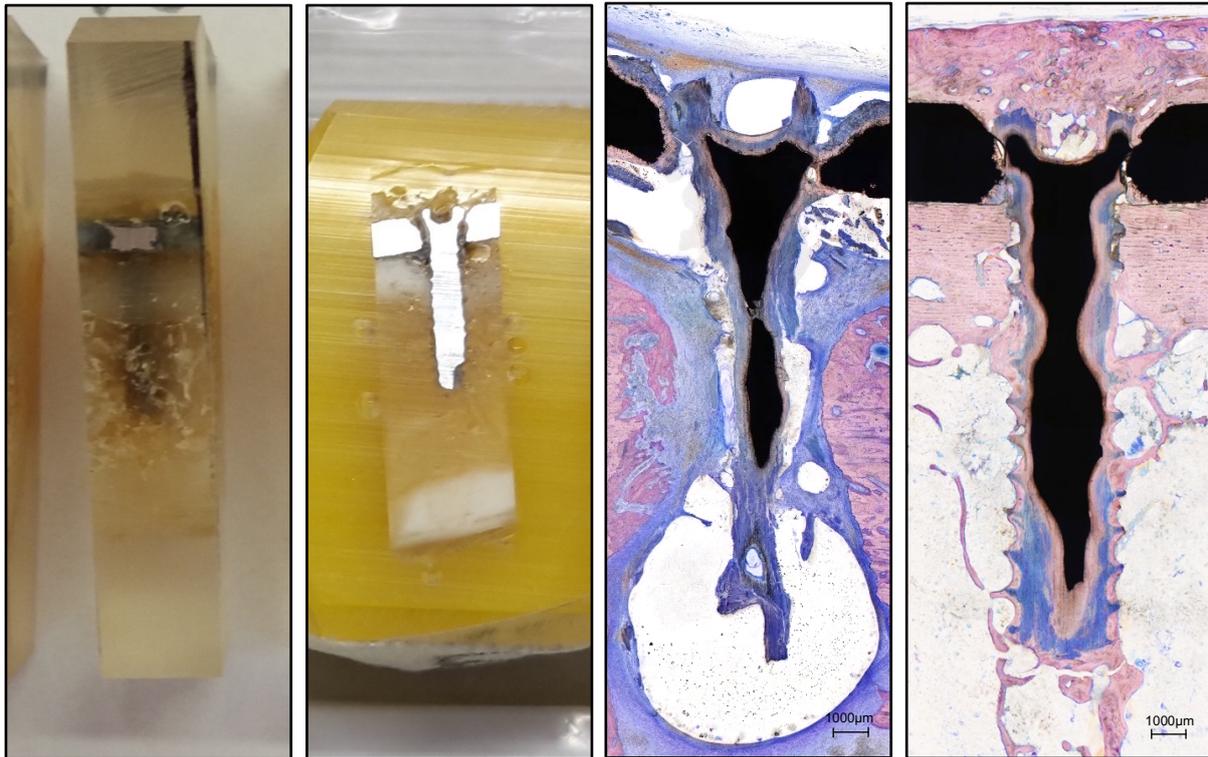


Abb. 4.20

Abb. 4.21

Abb. 4.22

Abb. 4.23

Gesägtes Plattenstück (Abb. 4.20), zum Schneiden vorbereiteter Block (Abb. 4.21) und gefärbte Schliffe, unbeschichtete Schraube (Abb. 4.22) und beschichtete Schraube (Abb. 4.23) nach 6 Monaten im Vergleich. Die Färbung erfolgte nach Giemsa. Mineralisierter Knochen und ein Teil des Korrosionsmaterials färbt sich zartrosa an, lichtdichtes Magnesium schwarz und der größte Teil des Korrosionsmaterials sowie Bindegewebe ist Blau angefärbt.

4.5.5 Histomorphometrische Analyse

Zur histomorphometrischen Auswertung erfolgte zuerst die Digitalisierung der Schliffe mit der Software AxioVision (5er-Okular, mit Kondensator, AxioCam MRc5, AxioVision 4.9.1, Carl Zeiss, Jena, Deutschland) als Mosaikbild. Das so erstellte Bild wurde sorgfältig überprüft und anschließend das Bild gestitcht. Die Korrektur der Ausrichtung jeder einzelnen Schraube wurde mit Adobe Photoshop vorgenommen (CC2018, Adobe Systems, San José, Vereinigte Staaten) und das darauffolgende Abspeichern der Bilder erfolgte im JPG-Format. Danach konnte mit der eigentlichen Analyse in Fiji begonnen werden.

Über ein personalisiertes Makro zur histologischen Auswertung erfolgte der Import der Bilder und das automatische Einlegen der schraubenförmigen Ausgangs-ROI. Die schraubenförmige Ausgangs-ROI wurde anhand des Schliffs einer originalen Schraube erstellt (siehe Abb. 4.24.1). Abhängig von der Schnittebene der Schraube

wurden die ROI bei Bedarf im Bereich der Schraubenspitze individualisiert. Die Markierung des kortikalen Bereichs bestimmte eine rechteckige Hilfs-ROI mit einer festgelegten Höhe von 3,24 mm. Sie wurde in ihrer Rotation an die Unterseite der Platte angepasst und bildete so die Basis für die Ausrichtung der weiteren ROIs. Im Anschluss wurde, analog zur radiologischen Auswertung, der Schraubenkopf abgeschnitten und die ROI an der dem Schnitt entsprechenden Stelle im Bild platziert (siehe Abb. 4.24.2).

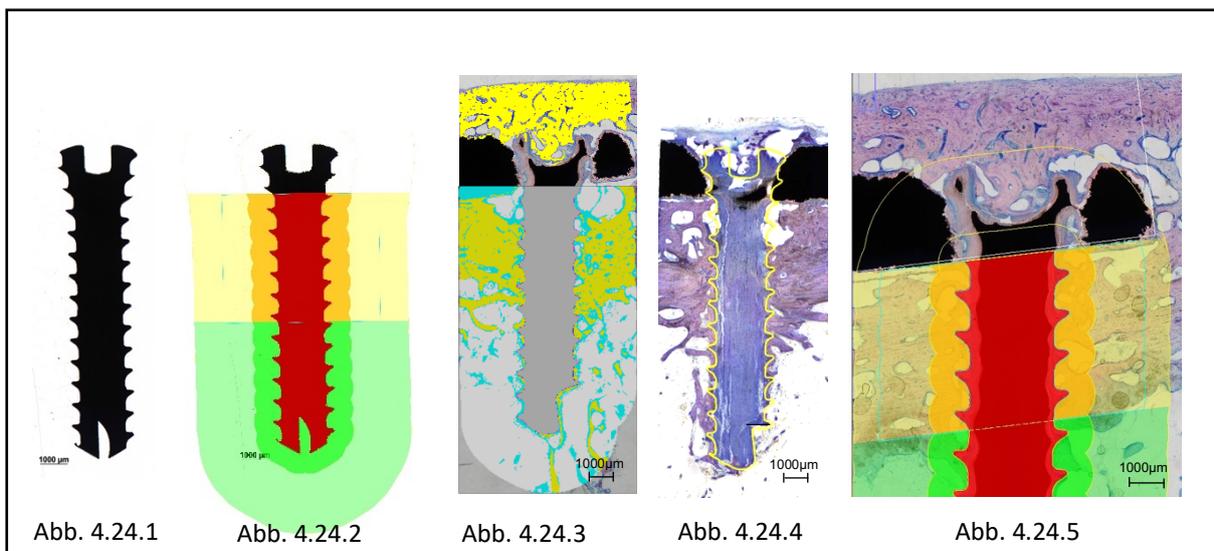


Abb. 4.24.1: Schliff einer Originalschraube als Basis für die Erstellung der Standard-ROI. Abb. 4.24.2: Platzierung der ROIs anhand der Originalschraube. Abb. 4.24.3: Farblich markierte Masken zum Erfassen der einzelnen Gewebe. Gelb=mineralisierter Knochen, Grau=Magnesium inkl. Korrosionsmaterial und Türkis=Bindegewebe. Abb. 4.24.4: Vergleich zwischen der S-ROI (gelbe Linie) und der Schraube im Resorptionsprozess nach 12 Monaten (Probe: 6M-1.5-PLU-Hu2). Abb. 4.24.5: Darstellung der eingelegten ROIs für die histomorphometrische Analyse (Probe: 6M-1.3-PLB-Hu1).

Es folgte die automatische Vergrößerung der ROI für G- und U-ROI durch das Makro und eine farbliche Markierung der auszuwertenden Bereiche. Für die G-ROI wurde die S-ROI um 0,5 mm und für die U-ROI um 2,0 mm vergrößert, sowohl in histologischer als auch in radiologischer Auswertung. Wenn die Schnittgröße kleiner als die U-ROI war, wurde die ROI um die über den Schnitt herausragenden Bereiche verkleinert. Alle ROIs wurden als separate Datei gespeichert. Nun konnten die Bilder mit einem selbstgeschriebenen Makro zur histomorphometrischen Auswertung geöffnet und die zu messenden ROIs angewählt werden. Für jedes zu bestimmende Gewebe erfolgte das Legen einer individuellen Maske durch Einstellung der Farbe, Sättigung und Helligkeit, entsprechend der Färbung des jeweiligen Schnittes (siehe Abb. 4.24.3 ff.). In absteigender Priorisierung wurden Leerfläche (Void-Area), mineralisierter Knochen

(mdB), Schraube (Sc) und Bindegewebe (CoT) erfasst. Jede Maske durchlief im Anschluss eine manuelle Nachkorrektur, um eventuell falsch erfasste Bereiche wieder auszuschließen. Das Makro arbeitet zusätzlich mit einer Denoiserfunktion, die für die Messung auf 5 gestellt wurde. Durch die Denoiserfunktion wurden einzelstehende Pixel ausgeschlossen, woraus eine Reduktion der Artefakte resultierte. Nach Erstellung aller Masken konnte die Quantifizierung der Gewebsanteile und die Berechnung der ROI-Größen durch das Makro gestartet werden. Die Ausgabe der Flächen erfolgte in mm² und die automatische Umrechnung durch das Makro für die jeweiligen ROIs in Prozent.

4.5.6 Bone-Implant-Contact

Der Knochen-Implantat-Kontakt (BIC) wurde mit Hilfe der bereits gelegten Gewebemasken als Prozentwert gemessen. Dabei erfolgte eine Unterscheidung in den direkten Kontakt zwischen mineralisiertem Knochen und Implantat (BICmdB), den Bereichen mit dem Implantat anliegender Leerfläche bzw. Fettmark dh. VOID-Area (BICVoid) und dem Implantat anliegendem Bindegewebe (BICCoT). Die Kontaktflächenbreite betrug 3 Pixel und es fand ein automatisches Denoise mit einem Wert von 5 statt (siehe Abb. 4.25).

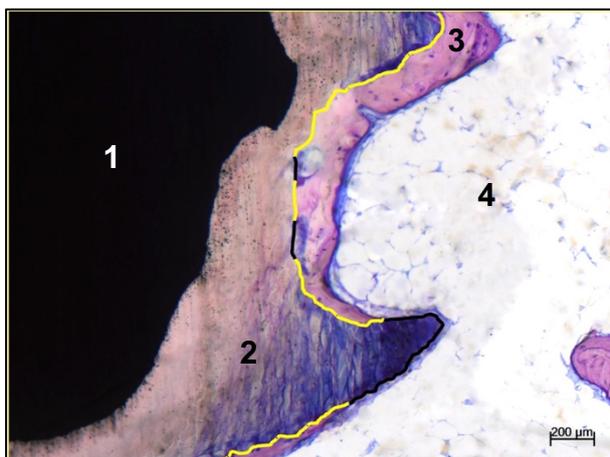


Abb. 4.25: Analyse der Kontaktfläche. Dargestellt ist ein Teil der Schraubenspitze mit Unterscheidung zwischen Knochen-Implantat-Kontakt (gelbe Linie) und Kontaktbereichen zu Bindegewebe oder Luft (schwarze Linie). Für die Bestimmung der Gewebe wurden die in den vorherigen Messungen gelegten Masken genutzt (siehe 4.5.6). Durch das Makro wurde so ermittelt, ob sich Knochen, Bindegewebe oder Luft im direkten Kontakt zu der Schraube befindet.

1: Magnesium, 2: Korrosionsmaterial,
3: Mineralisierte Knochenmatrix, 4: Fettmark

4.5.7 Quantifizierung des lamellären Knochens

Im kortikalen Bereich erfolgte die Quantifizierung des lamellären Knochens in einer zusätzlichen ROI („ROI 2“). Diese ROI erfasste einen 1,5 mm breiten Bereich zu

beiden Seiten der Schraube bei gleichzeitig festgelegter Höhe von 3,24 mm (siehe Abb. 4.26). Die Höhe von 3,24 mm ergibt sich aus der standardisierten Kortikalisdicke. Entsprechend der Ausrichtung der Platte im histologischen Bild wurde die ROI 2 gegebenenfalls in ihrer Rotation angepasst, sodass die Ausrichtung immer parallel zur Plattenunterseite gegeben war. Innerhalb der ROI erfolgte die händische Separation zwischen lamellärem und Geflechtknochen (siehe Abb. 4.27). Ähnlich des Vorgehens in der Histomorphometrie wurde anschließend noch einmal die gelegte Maske angezeigt und, wenn nötig, nachkorrigiert. Die Flächenquantifizierung und Umrechnung in Prozent erfolgte in Fiji.

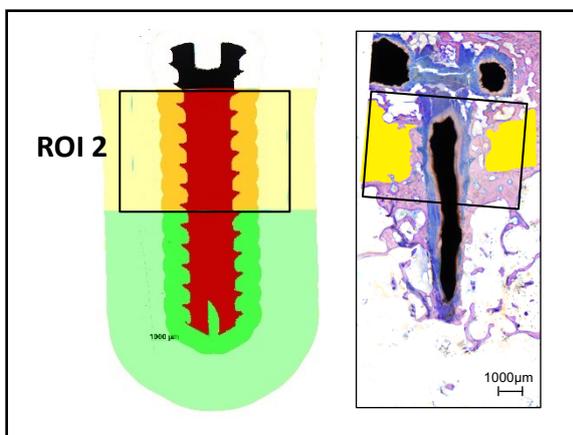


Abb. 4.26

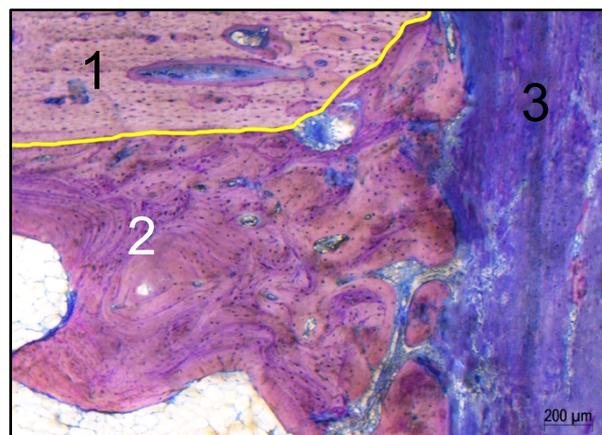


Abb. 4.27

Platzierung der ROIs anhand der Originalschraube (Abb. 4.26). Gelegte ROI 2 im histologischen Bild (gelber Kasten) mit Gewebemaske (gelbe Fläche) für den lamellären Knochen. Händische Differenzierung von lamellärem Knochen und Geflechtknochen (Abb. 4.27). 1: Lamellärer Knochen, 2: Geflechtknochen, 3: Korrosionsmaterial der Schraube.

4.5.8 Quantifizierung der Überwachung der Platte

Um die Menge an Knochen über der Platte zu messen, wurde eine weitere ROI („ROI 1“) erstellt und oberhalb der Kortikalis platziert (siehe Abb. 4.28 und 4.29). Diese rechteckigen ROI konnten in ihrer Größe und ihrem Winkel so angepasst werden, dass aller Knochen über der Platte enthalten war. Für die Flächenquantifizierung wurde die bereits für jedes Bild individuell definierte Maske für mineralisierten Knochen genutzt.

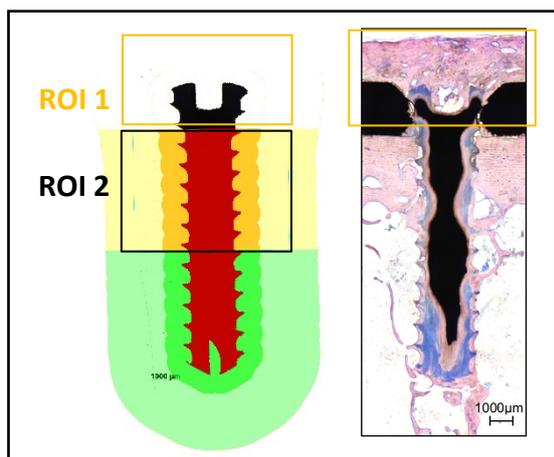


Abb. 4.28

Darstellung der Anordnung aller ROIs (Abb. 4.28). Histologisches Bild mit festgelegter ROI 1 für die Quantifizierung des Knochens über der Platte. Abb. 4.29: Detailaufnahme aus ROI 2. Die Platte stellt sich schwarz dar, das schwarze Sternchen markiert den über der Platte befindlichen Knochen, das weiße Sternchen die Platte.

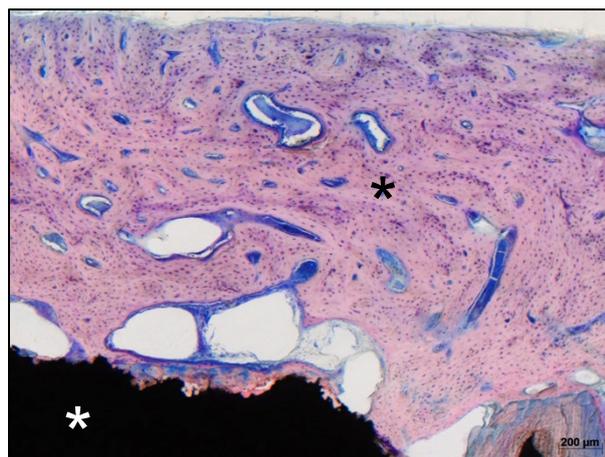


Abb. 4.29

Die technische Umsetzung der Programmerweiterungen (Makros) erfolgte durch Mario Thiele.

4.5.9 Histologische Referenzmessungen

Um einen Vergleichswert für die histologischen Daten zu erhalten, wurden Referenzwerte anhand der Originalschraube und der Transkortikalis gemessen (siehe Tab. 4.7). Analog zu dem Vorgehen bei der histomorphometrischen Analyse erfolgte das Einlegen und Vergrößern der ROIs, sowie das Einstellen der Masken für VOID, Bindegewebe und mineralisiertem Knochen.

Referenzmessungen Histomorphometrie

ROI	SC	SM	GC	GM	UC	UM
Sc/ROI.Ar [%]	99,93%	99,86%				
MdB/Tt.Ar [%]			97,37%	5,04%	97,13%	4,04%

Tab. 4.7: Histomorphometrische Referenzmessungen. ROI=Region of Interest, Sc=Schraube, MdB=mineralisierter Knochen, Tt=Total, Ar=Area, SC=Schraube kortikal, SM=Schraube Markraum, GC=Grenzbereich kortikal, GM=Grenzbereich im Markraum, UC=Umgebung kortikal und UM=Umgebung im Markraum.

4.6 Statistische Auswertung

Die Daten wurden als Textdateien akquiriert, anschließend in Microsoft Excel (Version 16.21, Microsoft Corporation, Redmond) importiert und unter Verwendung von Prism 8.1.1 (GraphPad Software, San Diego) ausgewertet. In der Testung auf Normalverteilung zeigten sich nicht annähernd normalverteilte Werte. Aus diesem Grund erfolgte der Vergleich von Mittelwerten zweier Gruppen anhand des Mann-Whitney-U-Tests für nicht annähernd normalverteilte Variablen sowie anhand des Kruskal-Wallis-Tests für mehr als zwei Vergleichsgruppen. Ein p-Wert von $<0,05$ wurde als statistisch signifikant betrachtet.

Die Darstellung der Graphen erfolgte als Mean mit 95 % Konfidenzintervall.

5. Ergebnisse

5.1 Implantatdegradation

5.1.1 Radiologische Bestimmung der Implantatdegradation

Für die Quantifizierung des Schraubenvolumens wurde die Schraube in einen kortikalen Teil (SC) und einen in den Markraum ragenden Teil (SM) unterteilt, um die unterschiedlichen Einflüsse von Knochen und Knochenmark auf die Korrosionsgeschwindigkeit zu differenzieren.

Nach 6 Monaten haben die unbeschichteten Implantate im kortikalen Teil SC durchschnittlich ein Volumen von 28,89 % und die beschichteten Implantate ein Volumen von 62,95 % (Mann-Whitney-U-Test, $p=0,0273$). Nach 12 Monaten zeigen die unbeschichteten Implantate ein Volumen von 17,47 % und die beschichteten Implantate ein Volumen von 26,90 % (Mann-Whitney-U-Test, $p=0,2657$). Das Volumen der unbeschichteten Implantate nimmt im Vergleich zwischen der Entnahme nach 6 Monaten und der Entnahme nach 12 Monaten um 11,42 Prozentpunkte ab von 28,89 % auf 17,47 % (Kruskal-Wallis-Test, $p=0,9143$), das der beschichteten Implantate nimmt um 36,05 Prozentpunkte ab von 62,95 % auf 26,90 % (Kruskal-Wallis-Test, $p=0,1400$). Der in den ersten 6 Monaten festgestellte Unterschied in der Resorptionsgeschwindigkeit zwischen den unbeschichteten und den beschichteten

Implantaten verringert sich folglich nach einer Standzeit von 12 Monaten (siehe Abb. 5.1).

Im Vergleich zeigt sich nach 6 Monaten im kortikalen Bereich eine signifikant stärkere Resorption der unbeschichteten Implantate mit einem Unterschied von 34,06 Prozentpunkten zu den beschichteten Implantaten. Somit ist nach 6 Monaten eine signifikante Verzögerung der Korrosion durch die Verwendung der PEO-Oberflächenmodifikation festzustellen.

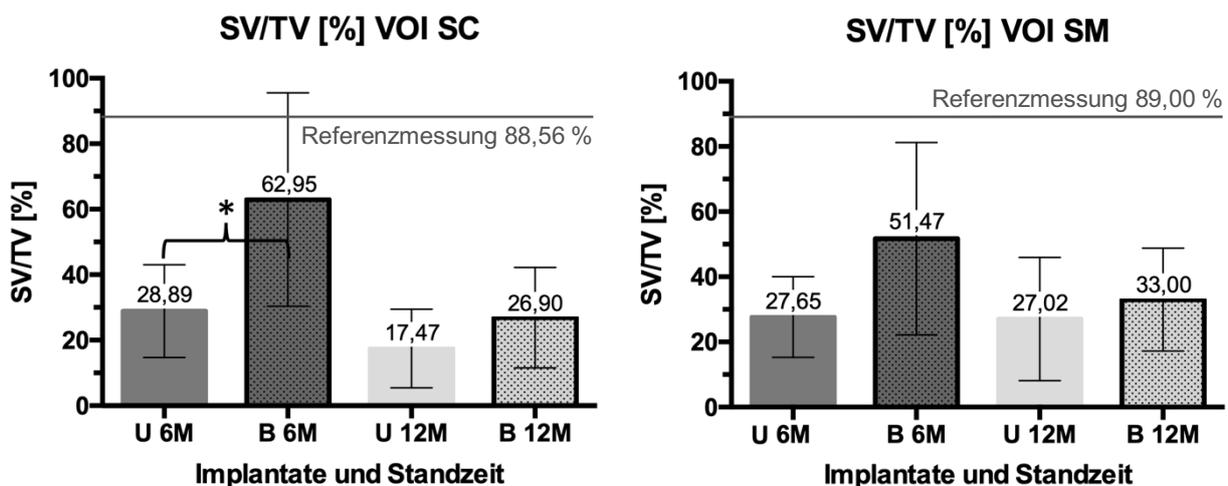


Abb. 5.1: SV/TV [%] VOI SC und SV/TV [%] VOI SM. Die Darstellung der beschichteten Implantate erfolgt mit gepunkteten Balken, die unbeschichteten Implantate sind ohne Muster dargestellt. Abkürzungen: SV=Screw Volume, TV=Total Volume, VOI=Volume Of Interest, SC=Schraube im kortikalen Bereich, SM=Schraube im Markraum, U=unbeschichtetes Implantat, B=beschichtetes Implantat.

Im Markraum zeigt sich nach 6 Monaten ein Volumen von 27,65 % bei den unbeschichteten Implantaten und von 51,47 % bei den beschichteten Implantaten (Mann-Whitney-U-Test, $p=0,0782$). Nach 12 Monaten beträgt das Volumen der unbeschichteten Implantate 27,02 % und das der beschichteten Implantate 33,00 % (Mann-Whitney-U-Test, $p=0,3777$). Im Vergleich zwischen den Entnahmezeitpunkten nach 6 und 12 Monaten zeigt sich ein Unterschied von 0,63 Prozentpunkten bei den unbeschichteten Implantaten mit einem Volumenverlust von 27,65 % auf 27,02 % (Kruskal-Wallis-Test, $p=0,9143$) und die beschichteten Implantate von 18,74 Prozentpunkten von 51,47 % auf 33,00 % (Kruskal-Wallis-Test, $p=0,1400$). Es zeigen sich gleiche Effekte wie im kortikalen Bereich der Schraube. Die beschichteten Implantate weisen zu allen Zeitpunkten ein höheres Volumen auf und die Reduktion

des Schraubenvolumens im Vergleich zur Referenzmessung ist nach 6 Monaten stärker als nach 12 Monaten.

5.1.2 Histologische Bestimmung der Implantatdegradation

Anders als die dreidimensionale Messung des Mikro-CTs erfolgt die histologische Quantifizierung nur anhand eines Schliffes, also zweidimensional. Für die histomorphometrische Messung der Schrauben wurde sowohl das Korrosionsmaterial als auch das Magnesium genutzt, im Gegensatz dazu wurde im Mikro-CT hauptsächlich Magnesium über den Threshold erfasst, da sich das Korrosionsmaterial teilweise in seiner Röntgendichte nicht vom Knochen unterscheidet.

Nach 6 Monaten zeigt sich bei den unbeschichteten Implantaten eine Residualfläche von 81,59 % und bei den beschichteten Implantaten eine Residualfläche von 88,01 % (Mann-Whitney-U-Test, $p=0,4180$). Nach 12 Monaten weisen die unbeschichteten Implantate eine Fläche von 43,26 % und die beschichteten Implantate von 72,25 % auf (Mann-Whitney-U-Test, $p=0,0378$). Die Fläche der unbeschichteten Implantate nimmt im Vergleich zwischen 6 und 12 Monaten von 81,59 % auf 43,26 % ab (Kruskal-Wallis-Test, $p=0,0193$), die Fläche der beschichteten Implantate nimmt von 88,01 % auf 72,25 % ab (Kruskal-Wallis-Test, $p=0,4633$).

Sowohl der Flächenunterschied der unbeschichteten Implantate zwischen dem 6- und dem 12- Monatszeitpunkt als auch der Unterschied zwischen den unbeschichteten und den beschichteten Implantaten nach 6 und 12 Monaten ist signifikant (siehe Abb. 5.2). Im Vergleich zur radiologischen Auswertung zeigen sich ähnliche Ergebnisse. Sowohl histologisch als auch radiologisch weisen die beschichteten Implantate im Vergleich zu den unbeschichteten Implantaten in allen Auswertungsbereichen ein höheres Volumen bzw. eine größere Fläche auf.

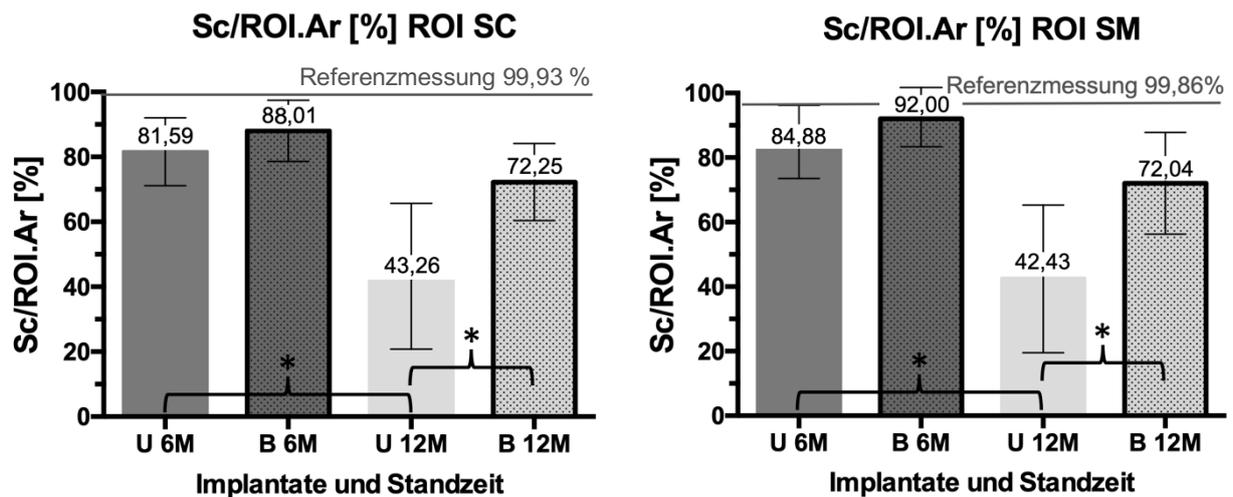


Abb. 5.2: SC/ROI.Ar [%] ROI SC und SC/ROI.Ar [%] ROI SM.

In der histomorphometrischen Auswertung des in den Markraum ragenden Teils der Schraube zeigen die unbeschichteten Implantate nach 6 Monaten eine Residualfläche von 84,88 % und die beschichteten Implantate von 92,00 % (Mann-Whitney-U-Test, $p=0,2897$). Nach 12 Monaten weisen die unbeschichteten Implantate eine Residualfläche von 42,43 % und die beschichteten Implantate eine Residualfläche von 72,04 % auf (Mann-Whitney-U-Test, $p=0,0332$). Im Vergleich zwischen 6 und 12 Monaten nimmt die Fläche bei den unbeschichteten Implantaten von 84,88 % auf 42,43 % ab (Kruskal-Wallis-Test, $p=0,0117$) und bei den beschichteten Implantaten findet sich eine Flächenabnahme von 92,00 % auf 72,04 % (Kruskal-Wallis-Test, $p=0,2290$).

Der Unterschied zwischen der Fläche an Implantatmaterial der unbeschichteten Implantate nach 6 und 12 Monaten und der Unterschied zwischen der verbliebenen Fläche an Implantatmaterial zwischen den unbeschichteten und den beschichteten Implantaten nach 6 und 12 Monaten im Markraum ist signifikant.

5.2 Quantifizierung des Knochens

5.2.1 Radiologische Quantifizierung des Knochens

Über die Vergrößerung der Schrauben-VOI wurde der Knochen um die Schraube quantifiziert, eingeteilt in einen kortikalen Bereich (C) und einen Bereich im Markraum (M).

Im kortikalen Bereich liegt der Anteil an Knochen in der UC-VOI zwischen 73,10 % und 76,72 %. Nach 6 Monaten beträgt das BV/TV 76,72 % bei den unbeschichteten Implantaten und 73,10 % bei den beschichteten Implantaten (Mann-Whitney-U-Test, $p=0,7325$). Nach 12 Monaten beträgt das BV/TV 76,68 % bei den unbeschichteten Implantaten und 75,67 % bei den beschichteten Implantaten (Mann-Whitney-U-Test, $p=0,6297$). Im Vergleich zwischen 6 und 12 Monaten zeigt sich eine geringe Volumenabnahme des Knochens von 76,72 % auf 76,68 % bei den unbeschichteten Implantaten (Kruskal-Wallis-Test, $p>0,9999$) und bei den beschichteten Implantaten eine geringe Volumenzunahme von 73,10 % auf 75,67 % (Kruskal-Wallis-Test, $p>0,9999$). Im Vergleich zur Referenzmessung zeigt sich ein Volumenverlust zwischen 12,75 % bei den unbeschichteten Implantaten nach 12 Monaten und 16,37 % bei den beschichteten Implantaten nach 6 Monaten (siehe Abb. 5.3).

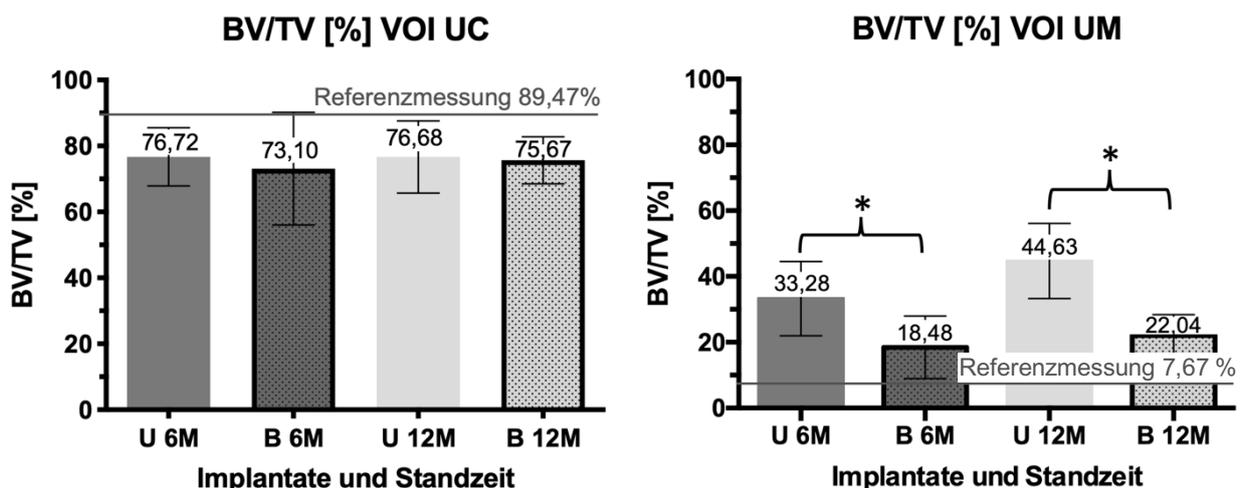


Abb. 5.3: BV/TV [%] VOI UC und BV/TV [%] VOI UM.

Im Markraum findet bei allen Schrauben eine Anlagerung von Knochen statt. Nach 6 Monaten mit einem Anteil von 33,28 % bei den unbeschichteten Schrauben und mit einem Anteil von 18,48 % bei den beschichteten Schrauben (Mann-Whitney-U-Test,

$p=0,0477$). Nach 12 Monaten steigt dieser Anteil auf 44,63 % bei den unbeschichteten Schrauben und auf 22,04 % bei den beschichteten Schrauben (Mann-Whitney-U-Test, $p=0,0007$). Während der Anteil an Knochen bei den unbeschichteten Implantaten von 33,28 % auf 44,63 % ansteigt (Kruskal-Wallis-Test, $p=0,7491$), steigt der Anteil an Knochen bei den beschichteten Implantaten nur von 18,48 % auf 22,04 % (Kruskal-Wallis-Test, $p>0,9999$). Der Referenzwert liegt bei 7,67 %.

Sowohl nach 6 Monaten als auch nach 12 Monaten kann signifikant mehr Knochen um die unbeschichteten Schrauben festgestellt werden.

Die GC-VOI beschreibt den direkten Grenzbereich zwischen Schraube und Knochen und ist ebenfalls in einen kortikalen Bereich (GC) und einen Bereich im Markraum (GM) unterteilt. Der Anteil an Knochen im Grenzbereich steigt über den Untersuchungsverlauf im kortikalen Bereich stetig an, sowohl nach 6 als auch nach 12 Monaten befindet sich mehr Knochen um die beschichteten Implantate. Nach 6 Monaten beträgt das Knochenvolumen 65,02 % bei den unbeschichteten Implantaten und 70,44 % bei den beschichteten Implantaten (Mann-Whitney-U-Test, $p=0,9612$). Nach 12 Monaten steigt der Anteil an Knochen auf 72,91 % bei den unbeschichteten und auf 75,60 % bei den beschichteten Implantaten (Mann-Whitney-U-Test, $p=0,8874$). Im Vergleich zwischen 6 und 12 Monaten steigt das Knochenvolumen bei den unbeschichteten Implantaten von 65,02 % auf 72,91 % (Kruskal-Wallis-Test, $p>0,9999$) und von 70,44 % auf 75,60 % bei den beschichteten Implantaten (Kruskal-Wallis-Test, $p>0,9999$).

Zu allen Untersuchungszeitpunkten liegt das Knochenvolumen um die Implantate unter dem Knochenvolumen von gesundem Knochen (siehe Abb. 5.4).

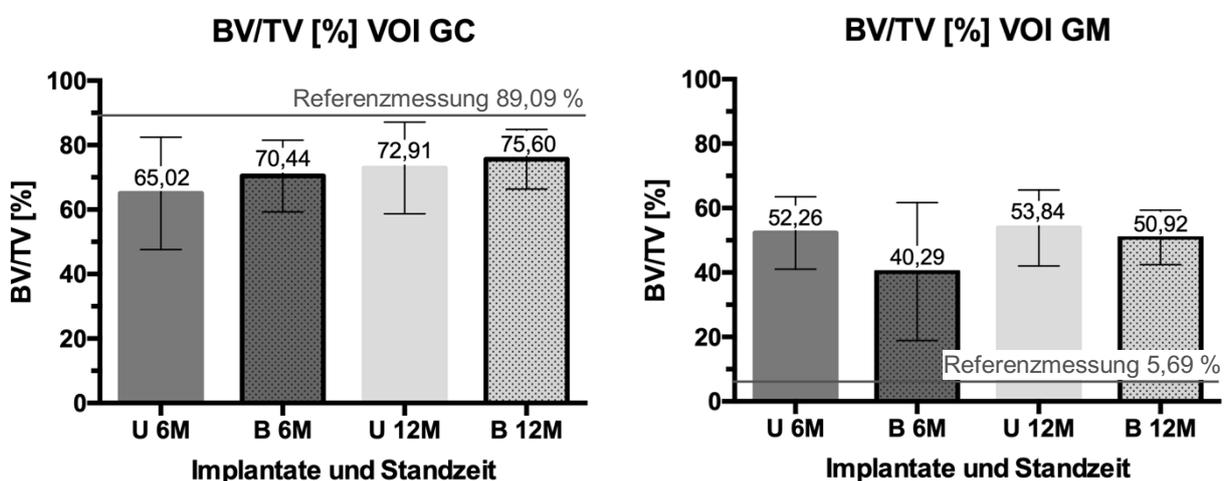


Abb. 5.4: BV/TV [%] VOI GC und BV/TV [%] VOI GM.
66

Die Auswertung der GM-VOI zeigt in allen Messungen eine Anlagerung von Knochen an dem in den Markraum ragenden Teil der Schraube. Sowohl nach 6 als auch nach 12 Monaten findet sich mehr Knochen im direkten Grenzbereich der unbeschichteten Implantate. Nach 6 Monaten befindet sich in der GM-VOI bei den unbeschichteten Implantaten ein Anteil von 52,26 % und bei den beschichteten Implantaten ein Anteil von 40,29 % Knochen (Mann-Whitney-U-Test, $p=0,3502$). Bei der Entnahme nach 12 Monaten steigt dieser Anteil in beiden Fällen an, auf 53,84 % bei den unbeschichteten Implantaten und auf 50,92 % bei den beschichteten Implantaten (Mann-Whitney-U-Test, $p=0,6297$). Im Vergleich zwischen 6 und 12 Monaten findet sich eine geringe Volumenzunahme bei den unbeschichteten Implantaten von 52,26 % auf 53,84 % (Kruskal-Wallis-Test, $p>0,9999$) und ebenfalls eine Volumenzunahme bei den beschichteten Implantaten von 40,29 % auf 50,92 % (Kruskal-Wallis-Test, $p>0,9999$). Der Referenzwert liegt bei 5,69 %.

5.2.2 Histologische Quantifizierung des Knochens

Histologisch erfolgt die Einteilung der ROIs analog zu den VOIs im Mikro-CT. Auch die histomorphometrische Auswertung zeigt einen höheren Anteil an Knochen um die beschichteten Implantate in der UC-ROI. Zum Entnahmezeitpunkt nach 6 Monaten betrug der Anteil an Knochen um die unbeschichteten Implantate 62,74 % und um die beschichteten Implantate 70,52 % (Mann-Whitney-U-Test, $p=0,5908$). Nach 12 Monaten steigt der Anteil an Knochen auf 64,96 % bei den unbeschichteten Implantaten und fällt ab auf 65,39 % bei den beschichteten Implantaten (Mann-Whitney-U-Test, $p=0,5618$). Im Vergleich zwischen 6 und 12 Monaten steigt der Knochenanteil bei den unbeschichteten Implantaten gering an von 62,74 % auf 64,96 % (Kruskal-Wallis-Test, $p>0,9999$) und fällt bei den beschichteten Implantaten von 70,52 % auf 65,39 % ab (Kruskal-Wallis-Test, $p>0,9999$). Der Referenzwert liegt bei 97,13 % (siehe Abb. 5.5).

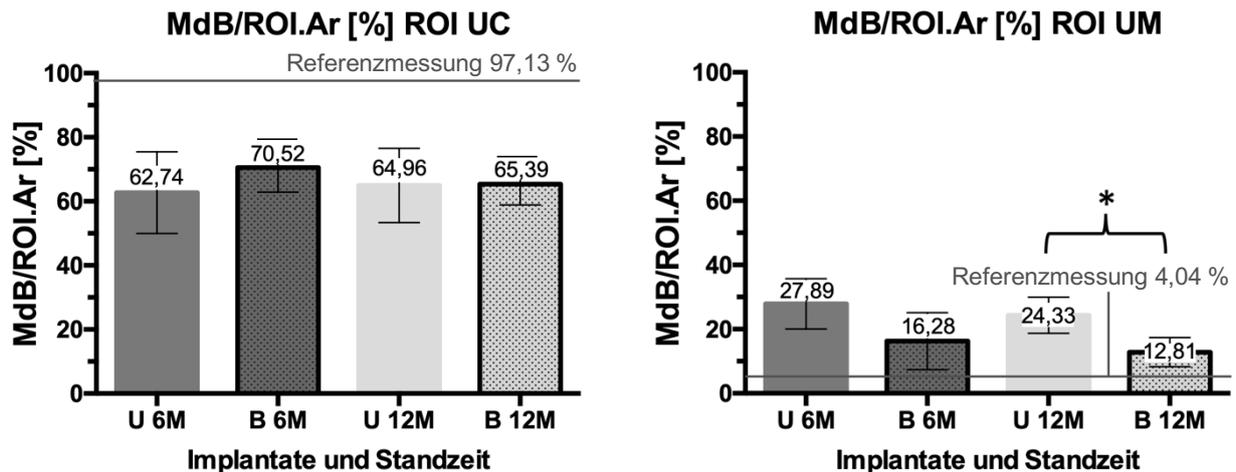


Abb. 5.5: MdB/ROI.Ar [%] ROI UC und MdB/ROI.Ar [%] ROI UM.

Analog zum Mikro-CT zeigt auch die histologische Auswertung eine stärker ausgeprägte Anlagerung von Knochen um die unbeschichteten Schrauben im Markraum. Nach 6 Monaten zeigt sich eine Anlagerung von 27,89 % Knochen in der UM-ROI bei den unbeschichteten Implantaten und von 16,28 % bei den beschichteten Implantaten (Mann-Whitney-U-Test, $p=0,0477$). Nach 12 Monaten nimmt dieser Anteil in beiden Gruppen ab auf 24,33 % bei den unbeschichteten Implantaten und auf 12,81 % bei den beschichteten Implantaten (Mann-Whitney-U-Test, $p=0,0005$). Im Vergleich zwischen 6 und 12 Monaten zeigt sich eine geringe Abnahme des Knochenanteils bei den unbeschichteten Implantaten von 27,89 % auf 24,33 % (Kruskal-Wallis-Test, $p>0,9999$) und bei den beschichteten Implantaten von 16,28 % auf 12,81 % (Kruskal-Wallis-Test, $p>0,9999$). Der Referenzwert liegt bei 4,04 %.

In der GC-ROI zeigt sich ein Anteil von 48,76 % Knochen bei den unbeschichteten Implantaten und von 59,14 % bei den beschichteten Implantaten nach 6 Monaten (Mann-Whitney-U-Test, $p=0,6605$). Nach 12 Monaten beträgt der Anteil an Knochen bei den unbeschichteten Implantaten 59,23 % und bei den beschichteten Implantaten 58,00 % (Mann-Whitney-U-Test, $p=0,5899$). Im Vergleich zwischen 6 und 12 Monaten steigt der Wert bei den unbeschichteten Implantaten von 48,76 % auf 59,14 % an (Kruskal-Wallis-Test, $p>0,9999$) und bei den beschichteten fällt der Wert leicht ab von 59,14 % auf 58,00 % (Kruskal-Wallis-Test, $p>0,9999$). Der Referenzwert liegt bei 97,37 % (siehe Abb. 5.6).

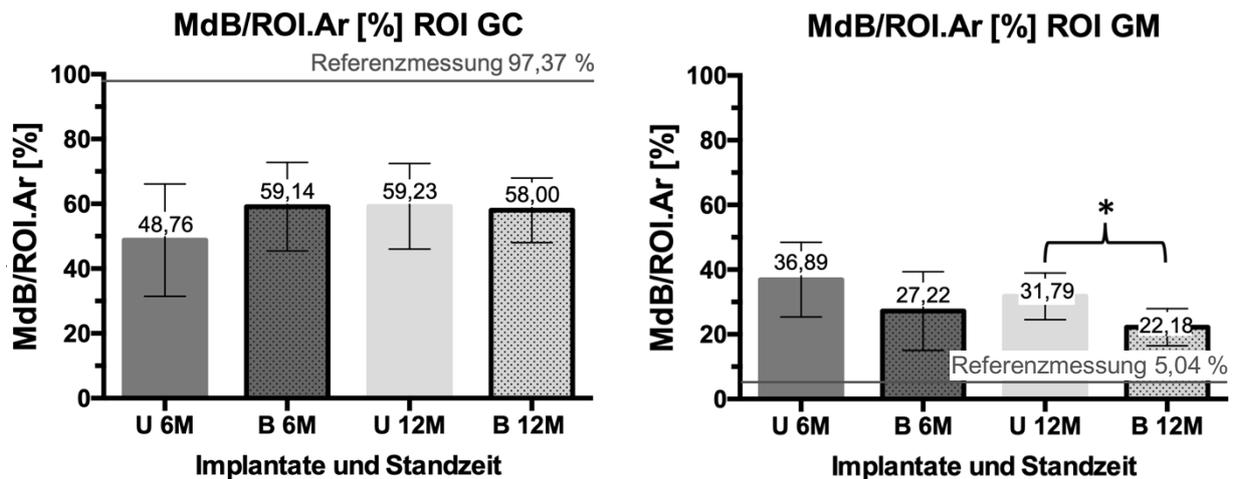


Abb. 5.6: MdB/ROI.Ar [%] ROI GC und MdB/ROI.Ar [%] ROI GM.

Im Grenzbereich zwischen der Schraube und dem Markraum (GM) befindet sich zu beiden Entnahmezeitpunkten mehr Knochen um die unbeschichteten Schrauben. Nach 6 Monaten befindet sich in der GC-ROI bei den unbeschichteten Schrauben ein Anteil von 36,89 % Knochen, bei den beschichteten Schrauben von 27,22 % (Mann-Whitney-U-Test, $p=0,2561$). Nach 12 Monaten beträgt der Anteil bei den unbeschichteten Implantaten 31,79 % und bei den beschichteten Implantaten 22,18 % (Mann-Whitney-U-Test, $p=0,0083$). Im Vergleich zwischen 6 und 12 Monaten fällt der Anteil an Knochen bei den unbeschichteten Implantaten von 36,89 % auf 31,79 % ab (Kruskal-Wallis-Test, $p>0,9999$) und bei den beschichteten Implantaten von 27,22 % auf 22,18 % (Kruskal-Wallis-Test, $p>0,9999$). Der Referenzwert liegt bei 5,04 %.

5.3 Osseointegration

5.3.1 Bestimmung des Bone-Implant-Contact

Für die Bestimmung des BIC wurde über die gelegten Gewebemasken der direkte Kontakt zwischen Implantat und mineralisiertem Knochen ermittelt.

Die unbeschichteten Implantate haben nach 6 Monaten im kortikalen Bereich zu 18,18 % direkten Kontakt mit mineralisiertem Knochen (siehe Abb. 5.7) und die beschichteten Implantate zu 51,65 % (Mann-Whitney-U-Test, $p=0,0156$). Nach 12 Monaten haben die unbeschichteten Implantate im kortikalen Bereich zu 24,77 % und die beschichteten Implantate zu 26,54 % (Mann-Whitney-U-Test, $p=0,6379$). Im

Vergleich zwischen 6 und 12 Monaten nimmt der BIC bei den unbeschichteten Implantaten von 18,18 % auf 24,77 % zu (Kruskal-Wallis-Test, $p > 0,9999$) und bei den beschichteten Implantaten von 51,65 % auf 26,54 % ab (Kruskal-Wallis-Test, $p = 0,5054$).

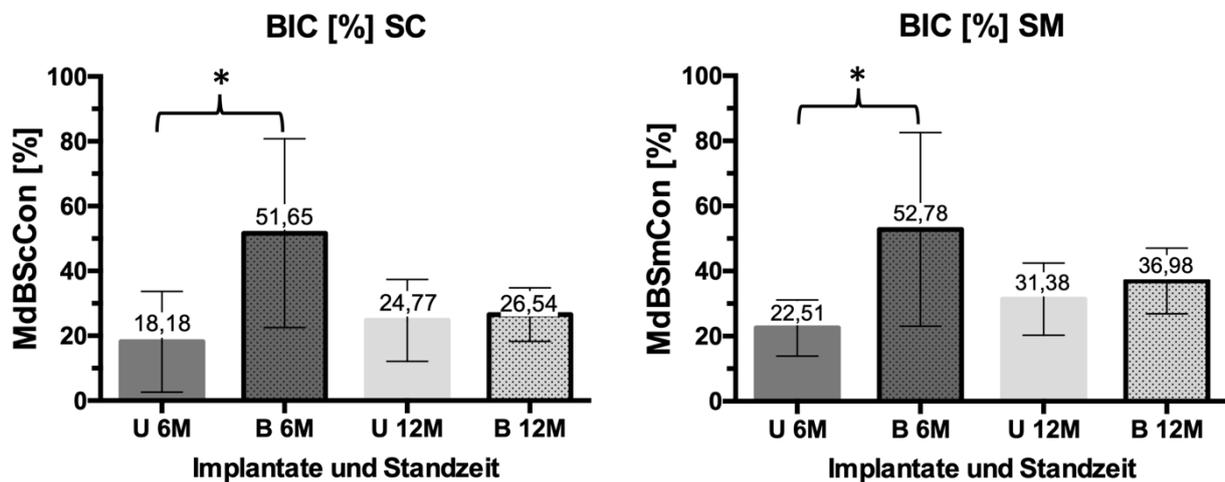


Abb. 5.7: BIC [%] SC und BIC [%] SM.

Im Markraum beträgt der BIC nach 6 Monaten 22,51 % für die unbeschichteten Implantate und 52,78 % für die beschichteten (Mann-Whitney-U-Test, $p = 0,0145$). Nach 12 Monaten beträgt der BIC bei den unbeschichteten Schrauben 31,38 % und bei den beschichteten Schrauben 36,98 % (Mann-Whitney-U-Test, $p = 0,6505$). Wie auch in der SC-ROI nimmt der BIC im kortikalen Teil der Schraube von 22,51 % auf 31,38 % zu (Kruskal-Wallis-Test, $p = 0,5188$) und bei den beschichteten Implantaten ab von 52,78 % auf 36,98 % (Kruskal-Wallis-Test, $p > 0,9999$).

Nach 6 Monaten findet sich ein signifikanter Unterschied zwischen den unbeschichteten und den beschichteten Implantaten in SC- und SM-ROI.

5.3.2 Quantifizierung des lamellären Knochens

Durch die Quantifizierung des lamellären Knochens ist es möglich, Rückschlüsse auf das Ausmaß der abgelaufenen Umbauprozesse zu ziehen, da sich im Verlauf der Knochenheilung zuerst Geflechtknochen bildet, der dann in einem anschließenden Remodelling wieder in Lamellenknochen umgewandelt wird.

Zu beiden Entnahmezeitpunkten befindet sich bei den beschichteten Implantaten ein größerer Anteil an lamellärem Knochen in ROI 2 (siehe Abb. 5.8). Nach 6 Monaten beträgt der Anteil an lamellärem Knochen für die unbeschichteten Implantate 30,01 % und für die beschichteten Implantate 42,27 % (Mann-Whitney-U-Test, $p=0,0983$). Nach 12 Monaten beträgt der Anteil an lamellärem Knochen in ROI 2 bei den unbeschichteten Implantaten 25,51 % und bei den beschichteten Implantaten 36,11 % (Mann-Whitney-U-Test, $p=0,2415$). In beiden Gruppen nimmt der Anteil an lamellärem Knochen über den Untersuchungszeitraum ab von 30,01 % auf 25,51 % bei den unbeschichteten Implantaten (Kruskal-Wallis-Test, $p>0,9999$) und von 42,27 % auf 36,11 % bei den beschichteten Implantaten (Kruskal-Wallis-Test, $p>0,9999$).

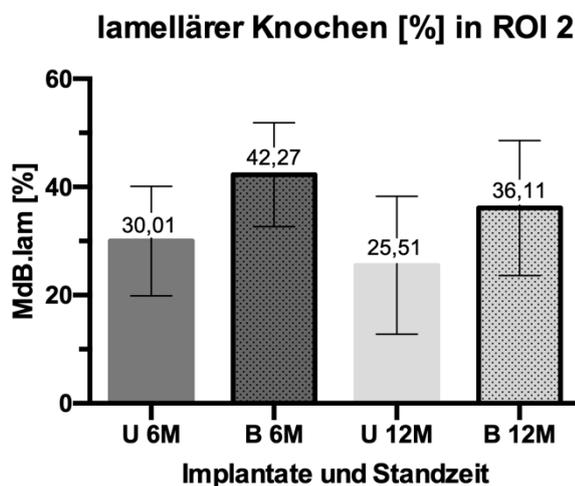


Abb. 5.8: Lamellärer Knochen [%] in ROI 2.

5.3.3 Quantifizierung der Überwachung der Platte

Mit Hilfe einer zusätzlichen ROI von individueller Größe fand die histologische Quantifizierung des über der Platte befindlichen Knochens in $[\text{mm}^2]$ statt.

Es zeigt sich zu beiden Entnahmezeitpunkten deutlich mehr Knochen über den beschichteten Platten (siehe Abb. 5.9). Nach 6 Monaten befinden sich über den unbeschichteten Platten durchschnittlich $2,61 \text{ mm}^2$ Knochen, über den beschichteten Platten $6,95 \text{ mm}^2$ (Mann-Whitney-U-Test, $p=0,0498$). Nach 12 Monaten befinden sich über den unbeschichteten Platten ab auf $1,30 \text{ mm}^2$ und bei den beschichteten Platten $4,25 \text{ mm}^2$ (Mann-Whitney-U-Test, $p=0,1397$). Die Menge an Knochen über der Platte nimmt bei allen Implantaten im Vergleich zwischen 6 und 12 Monaten ab von $2,61 \text{ mm}^2$

auf 1,30 mm² bei den unbeschichteten Implantaten (Kruskal-Wallis-Test, p>0,9999) und von 6,95 mm² auf 4,25 mm² bei den beschichteten Implantaten (Kruskal-Wallis-Test, p=0,9590).

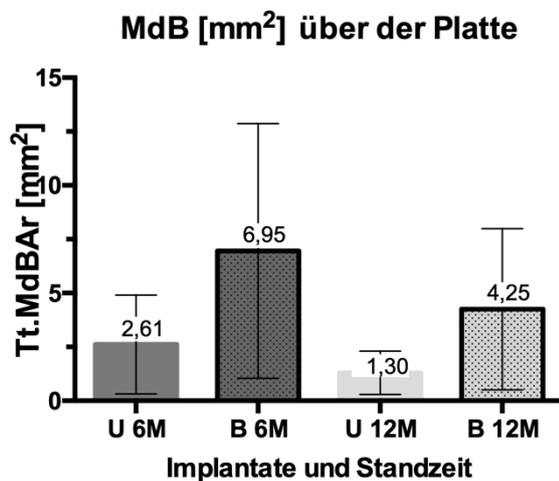


Abb. 5.9: MdB [mm²] über der Platte.

6. Diskussion

Ziel der Arbeit war die Untersuchung von WE43-basierten Magnesiumimplantaten mit und ohne PEO-Oberflächenmodifikation im Minipigmodell mit einer Standzeit von 6 und 12 Monaten um die Eignung der Implantate für einen Einsatz beim Menschen zu untersuchen. Mit Hilfe von Mikro-CT und histomorphometrischer Auswertung konnte ein Einblick in das Degradationsverhalten der Implantate, die Osseointegration und die Reaktion des umliegenden Knochens gewonnen werden. Durch diese Untersuchungen können wichtige Aussagen darüber getroffen werden, wie sich die Implantate im menschlichen Körper verhalten. Tierexperimentelle Tests wie diese Arbeit gewährleisten die Sicherheit der beim Menschen eingesetzten Implantate und tragen entscheidend dazu bei, Innovationen in der Medizin voranzutreiben. Die bisher noch nicht bei Magnesiumimplantaten im Menschen verwendete PEO-Oberflächenmodifikation wurde in dieser Arbeit erstmalig im Großtierversuch untersucht.

6.1 Implantatdegradation

Von großer Bedeutung bei der Verwendung von resorbierbaren Osteosynthesematerialien ist die richtige Geschwindigkeit der Implantatdegradation im Verhältnis zur Knochenheilung. Denn nur durch die suffiziente Stabilität der Osteosynthese während der Frakturheilung kann die Knochenheilung wie angestrebt per primam erfolgen. Und nur bei Resorption des Implantatmaterials in adäquater Geschwindigkeit kann der Knochen wieder in seine ursprüngliche Konfiguration zurückkehren. Einerseits kommt es bei beschleunigter Degradation des Implantatmaterials zur Ausbildung von Bindegewebe, andererseits kann aber auch eine verzögerte Resorption des Implantatmaterials das Remodelling des Knochens behindern.

Die Ausbildung eines bindegewebigen Interfaces konnte bei einigen unbeschichteten Implantaten (n=3) beobachtet werden. Damit verbunden war auch ein sehr niedriges BV/TV bzw. ein niedriger Anteil an mineralisiertem Knochen in der histologischen Auswertung in G- und U-ROI. Folglich lässt das Auftreten von Bindegewebe auf das Fehlen einer ossären Integration schließen, da die knöcherne Heilung ausbleibt und sich eine bindegewebige Narbe ausbildet. Bereits in anderen Studien zeigten Magnesiumimplantate zum Teil das gesteigerte Auftreten von an die Implantate grenzendem Bindegewebe als Anzeichen von unvollständiger Knochenheilung.^{110,115} Auch die, an die Implantate grenzenden Lakunen zeigten sich in der Studie von Schaller et al. 2018¹¹⁰ von fibrösem Bindegewebe umgeben. Diese Beobachtung ließ sich bei unserer Studie nur teilweise bestätigen. Zwar zeigten alle Implantate Lakunen, die über die Größe des Haverschen Systems hinaus reichten, doch diese waren nur teilweise mit Bindegewebe ausgekleidet und in vielen Fällen mit Fettgewebe gefüllt oder leer. Willbold et al. 2011¹¹⁵ berichtet sogar bei der Verwendung von Schrauben aus einer AZ31-Legierung ohne Oberflächenmodifikation über die Ausbildung einer Bindegewebskapsel, welche sich über die Standzeit verstärkt. Im Gegensatz dazu ist in den Studien von Schaller et al. 2016b⁴⁰ und 2017³⁹ unter Verwendung von WE43 mit und ohne Plasmaelektrolytbeschichtung keine bindegewebige Kapselbildung aufgetreten.

Da die Menge an freiwerdendem Wasserstoffgas in direktem Zusammenhang mit der Menge an korrodiertem Magnesium steht⁸⁸, führt folglich eine schnellere Degradation

zu einer Freisetzung einer größeren Gasmenge über einen kürzeren Zeitraum. Besonders für den Zeitraum der Knochenheilung ist dementsprechend eine langsamere Degradation von Vorteil, da sie weniger die Gefahr birgt, die Knochenheilung durch die Gasbildung zu beeinträchtigen. Abhängig vom lokalen Milieu wird das gebildete Gas abtransportiert oder es sammelt sich in der Implantatumgebung an.⁸¹ Es konnte zu beiden Entnahmezeitpunkten eine stärkere Resorption der unbeschichteten Implantate sowohl in Volumen- als auch Flächenquantifizierung gezeigt werden. Nach 6 Monaten ist das verbleibende Implantatvolumen der Schrauben im kortikalen Bereich im Mikro-CT bei den unbeschichteten Implantaten signifikant reduziert im Vergleich zu den PEO-oberflächenmodifizierten Implantaten. Histologisch zeigt sich eine signifikant stärkere Flächenreduktion der unbeschichteten Implantate nach 12 Monaten im kortikalen Bereich und im Markraum. Diese Beobachtungen stimmen mit anderen Studien überein, die bereits zeigen konnten, dass sich durch Beschichtung oder Oberflächenmodifikation die Degradationsgeschwindigkeit von Magnesium-implantaten verlangsamen lässt und sich so die Einheilung der Implantate verbessert und das BV/TV in den angrenzenden Knochenbereichen erhöht.^{38,39,85}

Ein weiterer Nebeneffekt von einer schnelleren Degradation, als die Kapazität des Gewebes zum Abtransport des Gases, sind subkutane Gasansammlungen. Imwinkelried et al. 2013⁸⁵ berichten bei der Verwendung von WE43-Implantaten mit und ohne Plasmaelektrolytbeschichtung bei den unbeschichteten Implantaten nach 7 Tagen bei fast allen Implantaten und bei ca. der Hälfte der beschichteten Implantate über nachweisbare subkutane Gasansammlungen. Auch Chaya et al. 2015⁸¹ und Schaller et al. 2016a³⁸ beschreiben das Auftreten von subkutanen Gasansammlungen. In der Studie von Schaller et al. 2016a³⁸ traten die subkutanen Gasansammlungen vermehrt direkt nach der Operation und vermehrt um die unbeschichteten Implantate herum auf. In dieser Studie konnten keine subkutanen Gasansammlungen beobachtet werden, jedoch fällt eine Feststellung von subkutanen Gasansammlungen bei der Implantation in Humerus und Femur bedingt durch einen dicken Weichteilmantel wesentlich schwerer.

Der Schwerpunkt wurde bei der Auswertung auf die Betrachtung des kortikalen Bereichs der Schrauben gelegt, da es sich bei dem im kortikalen Knochen verankerten

Teil der Schrauben um den für die Stabilität der Osteosynthese wichtigen Bereich handelt. Ebenso wird Degradation im Markraum betrachtet, jedoch ist sie von weniger großer Bedeutung, da dieser Schraubenteil bei einer monokortikalen Verankerung nicht zur Stabilität beiträgt. In vergleichbaren Studien wurde diese Unterscheidung nicht gemacht.

Die Platten weisen im Vergleich zu den Schrauben eine geringere Kontaktfläche zum Knochen auf, wodurch die Korrosion stärker vom umliegenden Gewebe beeinflusst wird.⁸¹ Zusätzlich kommt es, bedingt durch die größere Menge an Implantatmaterial im Vergleich zu den Schrauben eher zu einem Versagen der Schrauben als der Platten. Aus diesem Grund wurden die Platten von der Untersuchung ausgenommen. Ebenso wurde der Schraubenkopf von der Untersuchung ausgeschlossen, da es im Kopfbereich bedingt durch die Form des Schraubenkopfes zu großen Messungenauigkeiten kam und das Gewinde des Kopfes häufig ausgebrochen oder beschädigt war.

Es zeigt sich die stärkste Korrosionszone der Schrauben vermehrt direkt unter dem Schraubenkopf (siehe Abb. 4.8), wodurch diese Stelle für ein Materialversagen prädestiniert ist. In der Studie von Chaya et al. 2015⁸¹ wird eine stärkere Korrosion des Schraubenkopfes im Vergleich zum Schraubenschaft beschrieben,⁸¹ was unsere Beobachtungen bestätigt. Ein vergleichbarer Effekt wird in Willbold et al. 2011¹¹⁵ beschrieben. Hier kam es bei der Implantation von Magnesiumschrauben in den Hüftknochen von Schafen zu einer schnelleren Korrosion des von Muskeln bedeckten Schraubenkopfes im Vergleich zum im Knochen befindlichen Schraubenschaft. Zusätzlich ist durch die Form des Schraubenkopfes und seine geringere Materialmenge im Vergleich zu einem Abschnitt des Schraubenschaftes gleicher Länge eine schnellere Korrosion begünstigt.

Im Verlauf des Degradationsprozesses ändert sich das Magnesium in seiner Struktur und dementsprechend in seiner Lichtdurchlässigkeit und Radiogenität. Im Gegensatz zu der thresholdgestützten Volumenquantifizierung im Mikro-CT, die in der Radiogenität klar abgrenzbares Magnesium erfasste, wurde zu der Flächenquantifizierung in der Histologie auch Korrosionsmaterial herangezogen. Insgesamt ergibt sich demzufolge in der histologischen Messung ein höherer Wert. Durch die Zweidimensionalität ist die histologische Flächenbestimmung gleichzeitig

anfälliger für Fehler. Ebenfalls zu beachten ist der methodisch bedingte niedrigere radiologische Referenzwert 88,56 % SV/TV in der SC-VOI und von 89,00 % SV/TV in der SM-VOI im Vergleich zu den histologischen Referenzwerten von 99,93 % Sc.ROI/Ar in der SC-ROI und 99,86 % Sc.ROI/Ar in der SM-ROI.

Im Vergleich zwischen der SC- und SM-VOI zeigt sich radiologisch nach 6 Monaten bei den unbeschichteten Implantaten nur ein sehr geringer Unterschied (6M unbeschichtet 28,89 % SV/TV in der SC-VOI, 6M unbeschichtet 27,65 % SV/TV in der SM-VOI). Bei den beschichteten Implantaten findet ein stärkerer Volumenverlust im Markraum statt (6M beschichtet 62,95 % SV/TV in der SC-VOI, 6M beschichtet 51,47 % SV/TV in der SM-VOI).

Durch die Abhängigkeit der Korrosionsgeschwindigkeit von der Elektrolytzusammensetzung der umgebenden Flüssigkeit sowie der Durchblutung und vorhandener Proteine^{10,86,87} lässt sich vermutlich die unterschiedliche Korrosion im Verhältnis zwischen Markraum und Kortikalis erklären. Im Gegensatz zur Kortikalis entsteht im Markraum um die Schrauben nur eine dünne, die Schraubenschäfte bedeckende Knochenschicht, wodurch die Umgebung der Schrauben im Markraum größtenteils aus Fettmark besteht. Der nach 6 Monaten bei den beschichteten Implantaten sichtbare Effekt ist nach einer Standzeit von 12 Monaten nicht mehr anzutreffen. Nach 12 Monaten zeigen beide Implantatqualitäten ein höheres Volumen im Markraum (12M unbeschichtet 17,47 % SV/TV in der SC-VOI, 12M unbeschichtet 27,02 % SV/TV in der SM-VOI; 12M beschichtet 26,90 % SV/TV in der SC-VOI, 12M beschichtet 33,00 % BV/TV in der SM-VOI). Nach einer initialen Resorptionsphase scheint sich ein Schraubenanteil von ca. 30 % relativ lange im Markraum zu halten, ein größerer Anteil an Knochen um die Schrauben scheint für einen schnelleren Umbauprozess zu sorgen, als die Umgebung des Fettmarks.

Histologisch ist bei der Betrachtung von Korrosionsmaterial und Kernmaterial nach 6 Monaten nur ein geringer Unterschied zwischen Markraum und kortikalem Bereich zu sehen (6M unbeschichtet 81,59 % Sc/ROI.Ar in der SC-ROI, 6M unbeschichtet 84,88 % Sc/ROI.Ar in der SM-ROI und 6M beschichtet 88,01 % Sc/ROI.Ar in der SC-ROI, 6M beschichtet 92,00 % Sc/ROI.Ar in der SM-ROI). Während sich in der radiologischen Auswertung eine Abnahme des Kernmaterials zeigt, ist in der Histologie nach dieser langen Standzeit nur ein geringer Unterschied zu sehen, wenn man das

Korrosionsmaterial mit einbezieht. Die durch die Oberflächenmodifikation erzielte Verzögerung des Vordringens von Flüssigkeit in die Implantate liefert eine mögliche Erklärung für die gemessenen Werte. Im Vergleich dazu ist der Unterschied zwischen den unbeschichteten und den beschichteten Implantaten insgesamt geringer, wenn über einen langen Zeitraum Korrosionsmaterial und Kernmaterial gemeinsam betrachtet werden. Gleichzeitig zeigen sich Grenzen der radiologischen Auswertung bei Magnesiumimplantaten im fortgeschrittenen Korrosionsstadium, da die gemessene Menge an Schraubenmaterial unter der histologisch gemessenen Implantatmenge liegt. Zu den Limitationen der Messmethoden zählt dementsprechend die fehlende Differenzierung in den Messungen zwischen Kernmaterial und Korrosionsmaterial. Bedingt durch die Änderung der Radiogenität des Magnesiums während des Korrosionsprozesses, aber auch durch das Einwachsen des Knochens in das Korrosionsmaterial, war keine klare Trennung zwischen Kernmaterial und Korrosionsmaterial mehr möglich.

Bei der Volumenquantifizierung des Residualvolumens der Schrauben stellt der genutzte Threshold ein Modell dar, welches die Wirklichkeit nur eingeschränkt abbilden kann. Bedingt durch die Änderung der Radiogenität der Magnesiumschrauben während des Degradationsprozesses ist es nicht zu jedem Zeitpunkt möglich, Korrosionsmaterial über den Threshold klar vom umliegenden und einwachsenden Knochen zu trennen. Besonders in fortgeschrittenen Resorptionsstadien war es nicht immer möglich, Korrosionsmaterial radiologisch klar vom Knochen abzugrenzen. Die radiologische Analyse beschränkt sich aus diesen Gründen auf die Quantifizierung des als „bulk material“ bezeichneten Magnesiums von unveränderter und nur gering veränderter Radiogenität.

In einzelnen Fällen konnten Schrauben im fortgeschrittenen Korrosionsstadium nicht mehr exakt von der VOI erfasst werden. Abgebrochenes und über die VOI hinaus disloziertes Schraubenmaterial täuscht dementsprechend eine Resorption vor, obwohl Schraubenmaterial noch vorhanden ist. Eine unbeschichtete Platte nach 12 Monaten zeigte sich disloziert, eine Schraube war im mittleren Schaftbereich gebrochen.

Durch den eindringenden Knochen und die schollenartige Ablösung des Magnesiums konnte besonders im fortgeschrittenen Korrosionsstadium ein „Aufquellen“ der Schrauben beobachtet werden. Aufgrund der intraindividuell unterschiedlichen Knochendicke kam ein Teil der Schrauben im Markraum dichter an der seitlichen Kortikalis zu liegen oder sie wiesen nur einen geringen Abstand zur Transkortikalis

auf. Diese Tiere zeigten in der UM-ROI/VOI höhere Werte, als Tiere mit einem größeren Knochendurchmesser. Bedingt wurde das höhere BV/TV bzw. MdB.ROI/Ar durch das Einwachsen des Knochens (siehe Abb. 6.1 und 6.2), ausgehend von Transkortikalis oder seitlicher Kortikalis. Je größer der Abstand des Schraubenabschnitts im Markraum zum kortikalen Knochen war, umso schwächer viel der, durch das Magnesium ausgelöste Effekt der Knochenbildung aus.

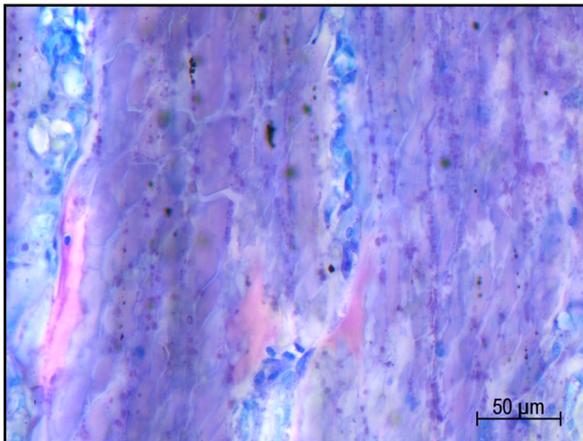


Abb. 6.1

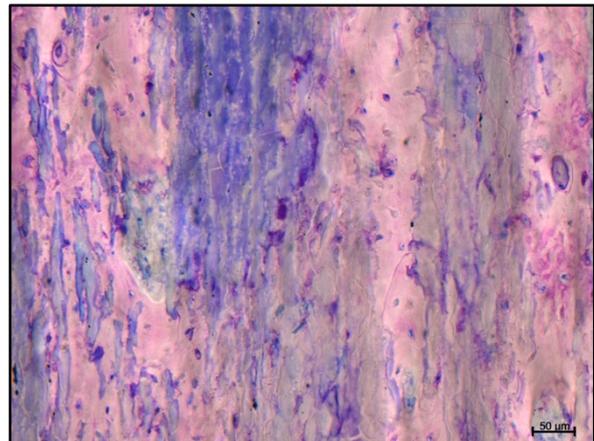


Abb. 6.2

Abb. 6.1: Beginn der Bildung von mineralisierter Knochenmatrix in einer unbeschichtete Schraube nach 6 Monaten. Abb. 6.2: Durchbauung der Schraube durch Knochen, unbeschichtete Schraube nach 12 Monaten.

Bei der Degradation von Magnesiumimplantaten mit PEO-Oberflächenmodifikation kommt es zu der Ausbildung von Rissen im Implantatmaterial, durch die Flüssigkeit ins Innere des Materials vordringen kann.⁸⁸ Diese Rissbildung sorgt für eine schollenartige Ablösung des Materials, welche sich in vitro⁸⁸ und in den histologischen Bildern dieser Studie in vivo beobachten lässt (siehe Abb. 6.3 und 6.4).

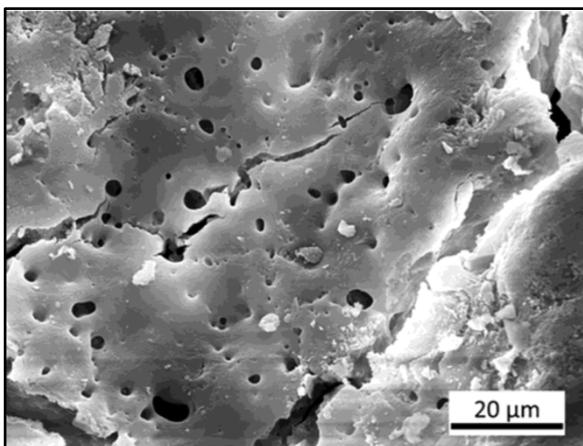


Abb. 6.3

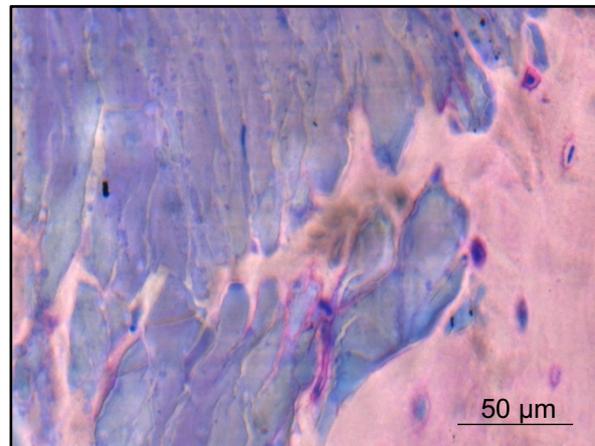


Abb. 6.4

Abb. 6.3: Entwicklung von Rissen in der PEO-Oberflächenmodifikation in vitro. Aus Kopp et al. 2019
Abb. 6.4: Schollenartige Ablösung des Magnesiums durch die Rissbildung.

Als notwendige Eigenschaften für Knochenersatzmaterialien werden Osteoinduktion, Osteogenese und Osteokonduktion beschrieben.⁹³ Eigenschaften, die auch bei Magnesiumimplantaten charakteristisch sind. Besonders die Osteoinduktivität⁷⁹ und die Förderung der Osteogenese⁸⁶ finden Erwähnung in der Literatur. Histologisch lassen sich bei den degradierenden Magnesiumimplantaten mit und ohne PEO-Oberflächenmodifikation Osteo-

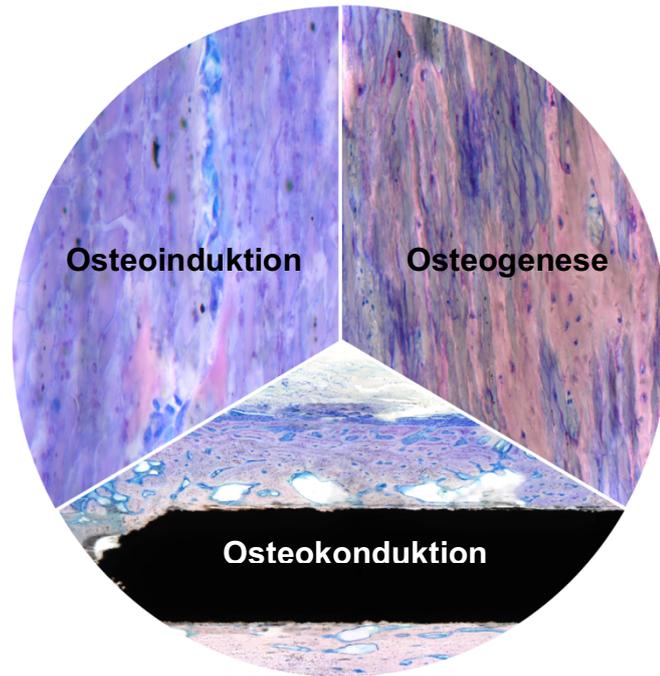


Abb. 6.5: Osteoinduktive, -konduktive und osteogenetische Eigenschaften des Magnesiums.

induktion, Osteogenese und Osteokonduktion beobachten (siehe Abb. 6.5). Es findet die Einwanderung von Stromazellen statt, die sich zu knochenbildenden Zellen differenzieren und für die Ablagerung von mineralisierter Matrix im Degradationsmaterial des Magnesiums sorgen (Osteoinduktion). Besonders bei den unbeschichteten Schrauben, bedingt durch die schnellere Degradation, kommt es zu einer Durchbauung der Schrauben durch mineralisierten Knochen (Osteogenese). Auf den Magnesiumimplantaten und eindringend in entstehende Risse des Implantatmaterials zeigt sich Knochenwachstum mit direktem Kontakt zum Implantatmaterial (Osteokonduktion).

Bei der histologischen Evaluation zeigen sich keine Anzeichen einer lokalen akuten oder chronischen Entzündung in den entnommenen Knochenproben. Andere Studien mit Magnesiumimplantaten im Großtiermodell von Schaller et al. 2016a³⁸, Naujokat et al. 2017⁸⁰ Schaller et al. 2018¹¹⁰ und Naujokat et al. 2019¹¹² kommen ebenfalls zu diesem Ergebnis.

Der lokale und systemische Einfluss von Seltenen Erden auf den menschlichen Körper ist ungeklärt. In vitro Experimente zeigen, dass eine zytotoxische Konzentration an Seltenen Erden während der Degradation vermutlich nicht erreicht wird,¹¹³⁻¹¹⁵ geben

aber gleichzeitig Hinweise auf mögliche Nebeneffekte wie Alkalisierung durch Magnesium¹¹⁵ und eine mögliche proinflammatorische Reaktion.¹¹³ Darüber hinaus konnten bei Seltenen Erden in vitro antikanzerogene Eigenschaften gezeigt werden,¹⁰ jedoch sind an dieser Stelle weitere Untersuchungen notwendig, um die Fragestellung zufriedenstellend beantworten zu können.

6.2 Quantifizierung des Knochens

Bedingt durch die Gasbildung bei der Degradation von Magnesiumimplantaten kann es zur Ausbildung von an die Implantate grenzenden Hohlräumen kommen, die im Extremfall die Stabilität der Osteosynthese gefährden können. Aufgrund der Hohlräume kommt es folglich zu einem reduzierten Knochenvolumen beziehungsweise einer reduzierten Knochenfläche des an die Implantate grenzenden Knochens. Bei erwachsenen Minipigs befindet sich im Markraum der langen Röhrenknochen überwiegend Fettmark, sodass der im Markraum befindliche Teil der Schraube beim Einbringen keinen Knochenkontakt aufweist. Im Markraum kommt es bei Magnesiumimplantaten zu einer Knochenanlagerung, die ebenfalls durch die Volumen- und Flächenquantifizierung bestimmt wird.

Im kortikalen Bereich zeigt sich in der Umgebung der beschichteten Schrauben nach 6 Monaten im Mikro-CT und in der Histologie ein höherer Knochenanteil, im Markraum jedoch findet eine stärkere Knochenanlagerung in der Umgebung der unbeschichteten Schrauben statt. Durch die schnellere Korrosion der unbeschichteten Schrauben kommt es zu einer Freisetzung größerer Mengen an Magnesiumionen, wodurch sich die vergleichsweise stärkere Stimulation der Knochenbildung bei den unbeschichteten Schrauben am ehesten erklären lässt.

Zu allen Entnahmezeitpunkten war der Knochenanteil um die Magnesiumimplantate reduziert. Die Reduktion des Knochenvolumens im Mikro-CT betrug maximal 16,37 Prozentpunkte (beschichtete Implantate nach 6 Monaten) und minimal 12,75 Prozentpunkte (unbeschichtete Implantate nach 6 Monaten). Entsprechend zeigt sich auch in der Histologie zu allen Entnahmezeitpunkten der Knochenanteil reduziert. Die maximale Reduktion betrug hier 34,39 Prozentpunkte (unbeschichtete Implantate

nach 6 Monaten) und minimale Reduktion betrug 26,61 Prozentpunkte (beschichtete Implantate nach 6 Monaten).

Die komplikationslose Einheilung von Magnesiumimplantaten konnte bereits in zahlreichen ähnlichen Großtiermodellen gezeigt werden.^{38-40,80,110,112} Bei der Verwendung von Magnesiumimplantaten zeigt sich stets die charakteristische Auflockerung der umgebenden Knochenstruktur. Schaller et al. 2016a³⁸ vergleicht Titanimplantate mit Magnesiumimplantaten mit und ohne Plasmaelektrolytbeschichtung. Es zeigt sich eine signifikant höhere Knochendichte (BV/TV) um die Titanimplantate (79.2 ± 10.6) im Vergleich zu den beschichteten (46.4 ± 12.4 , $p < 0.001$) und unbeschichteten Implantaten (34.1 ± 9.5 , $p < 0.001$) nach 3 Monaten. Eine signifikant höhere Knochendichte zeigt sich um die beschichteten Implantate im Vergleich zu den unbeschichteten Implantaten ($p = 0.035$). Gleiche Ergebnisse zeigen sich nach 6 Monaten.³⁸ Im Gegensatz dazu beschreibt Naujokat et al. 2019¹¹² keine signifikante Beeinflussung der Knochenheilung, Biokompatibilität und Korrosionsgeschwindigkeit durch Hydrierung oder Fluoridierung. In unseren Ergebnissen ist das Knochenvolumen um die Magnesiumimplantate im Vergleich zum Referenzwert ebenfalls immer reduziert. Im Vergleich zwischen der UC-VOI/ROI und der GC-VOI/ROI ist die Knochendichte konsistent stärker im GC-Bereich reduziert. Die Auswirkung der Gasbildung zeigt sich dementsprechend am stärksten im direkten Grenzbereich zwischen Knochen und Schrauben.

Im Markraum fand bei allen Implantaten eine durch das Magnesium angeregte Knochenanlagerung statt. Bedingt durch die unterschiedliche Kortikalisdicke beträgt der Referenzwert >0 . Insgesamt lagert sich mehr Knochen in der Umgebung der unbeschichteten Schrauben an. Die GM-VOI/ROI zeigt dabei konsistent höhere Werte, als die UM-ROI/VOI, sowohl im Mikro-CT als auch histologisch. Die Studie von Schaller et al. 2016a³⁸ zeigt, dass eine signifikante Reduktion der Resorptionsgeschwindigkeit mit einem signifikant höheren Anteil an gebildeten Knochen um die Implantate korrespondiert. Diese Feststellung deckt sich nur teilweise mit unseren Ergebnissen. Es zeigt sich zwar mehr Knochen über der Platte bei den beschichteten Platten, aber mehr neu gebildeter Knochen im Markraum um die unbeschichteten Implantate.

Als Limitationen der Messmethode und mögliche Fehlerquellen ist zum einen die unterschiedliche Kortikalisdicke intraindividuell zu nennen. Eine dicke Kortikalis führt zu einem höheren Wert des BV/TV bzw. MdB.Tt.Ar in GM- und UM-VOI/ROI, da sie eine vermehrte Knochenneubildung vortäuscht. Eine sehr dünne Kortikalis sorgt im Gegensatz dazu nicht zu einem niedrigeren Wert in der Quantifizierung im Markraum, wohl aber zu einem niedrigeren Wert der Knochenquantifizierung im kortikalen Bereich, da sich zum Entnahmezeitpunkt nicht unterscheiden lässt, ob eine Knochenresorption stattgefunden hat oder die Kortikalis physiologischer Weise dünner war. Zum anderen stellt die genutzte Thresholdquantifizierung eine mögliche Limitation dar, da durch den radiologischen Threshold Korrosionsmaterial nicht immer klar vom Knochen zu trennen war, bedingt durch die Änderung der Radiogenität des Magnesiums im Laufe des Degradationsprozesses.

6.3 Osseointegration

6.3.1 Bone-Implant-Contact

Durch die Quantifizierung von Leerräumen, Bindegewebe, Implantatmaterial und Knochen wurde der direkte Kontakt zwischen Implantatmaterial und Knochen (BIC) bestimmt.

In der SC-ROI nimmt der BIC im Vergleich nach 6 und 12 Monaten bei den unbeschichteten Implantaten von 18,18 % auf 24,77 % zu (Kruskal-Wallis-Test, $p > 0,9999$) und bei den beschichteten Implantaten von 51,65 % auf 26,54 % ab (Kruskal-Wallis-Test, $p = 0,5054$). In der SM-ROI nimmt der BIC im Vergleich nach 6 und 12 Monaten bei den unbeschichteten Implantaten von 22,51 % auf 31,38 % zu (Kruskal-Wallis-Test, $p = 0,5188$) und bei den beschichteten Implantaten ab von 52,78 % auf 36,98 % (Kruskal-Wallis-Test, $p > 0,9999$). Nach 6 Monaten findet sich ein signifikanter Unterschied zwischen den unbeschichteten und den beschichteten Implantaten in SC- und SM-ROI. Es findet sich also ein mehr als doppelt so hoher BIC bei den beschichteten Implantaten in SC- und SM-ROI. Nach 12 Monaten ist dieser Unterschied wesentlich geringer, sodass in allen ROIs sowohl die unbeschichteten als auch die beschichteten Schrauben einen BIC von zwischen 24,77 % und 36,98 % aufweisen. Die Anwendung der PEO-Oberflächenmodifikation führt zu einer

herabgesetzten Korrosionsgeschwindigkeit. Dieser Effekt hält jedoch nicht bis zum Entnahmezeitpunkt nach 12 Monaten an.

In Bezug auf die Schaftregion der Magnesiumschrauben zeigten Chaya et al. 2015⁸¹ nach 8 Wochen eine Kontaktfläche von 25 %. Dieser Wert liegt nahe an den in dieser Studie gemessenen und ist durch die Bestimmung in der Schaftregion der Schrauben im Röhrenknochen als am ähnlichsten zu unserer Messung anzusehen.

Auch in anderen Studien konnte die Verbesserung des BICs durch die Verwendung einer Elektrolytbeschichtung von WE43-basierten Magnesiumimplantaten, und somit einer herabgesetzten Korrosionsgeschwindigkeit gezeigt werden. Die histologisch bestimmte Kontaktfläche in Schaller et al. 2016a³⁸ zeigt einen signifikant höheren BIC bei Titanimplantaten im Vergleich zu beschichteten und unbeschichteten Magnesiumimplantaten nach 12 und 24 Wochen Standzeit. Nach einer Standzeit von 12 Wochen beträgt der BIC bei den Titanimplantaten 85.5 ± 11.8 %, bei den beschichteten Implantaten 62.7 ± 5.5 % ($p < 0.001$) und bei den unbeschichteten Implantaten 54.4 ± 7.7 % ($p < 0.001$). Nach einer Standzeit von 24 Wochen steigt der BIC bei den Titanimplantaten auf 90.5 ± 2.9 %, mit einem signifikanten Unterschied zu den beschichteten Magnesiumimplantaten (73.2 ± 5.9 %, $p = 1/4 0.006$) und zu den unbeschichteten Magnesiumimplantaten (46.1 ± 11.4 %, $p < 0.001$).³⁸ Im Gegensatz zur Gewebequantifizierung und darüber bestimmten Kontaktfläche erfolgt die Bestimmung des BICs bei Schaller et al. 2016a und 2016b über ein Gitternetz „cycloid grid“ und es werden nur die proximale und distale Schraube pro Platte gemessen. Weitere Studien bestätigen diese Ergebnisse: Schaller et al. 2016b⁴⁰ konnte bei der Verwendung von Magnesiumschrauben nach 3 und 6 Monaten einen signifikant höheren BIC bei Titanimplantaten im Minipigmodell im Vergleich zu WE43-basierten Magnesiumimplantaten mit und ohne Plasmaelektrolytbeschichtung zeigen, wobei der BIC der oberflächenmodifizierten Implantate einen signifikanten Unterschied zu den Implantaten ohne Oberflächenmodifikation aufwies.⁴⁰ Schaller et al. 2017³⁹ kommen im Röhrenknochen zu einem korrespondierenden Ergebnis. Die Studie vergleicht WE43-basierte Magnesiumimplantate mit und ohne Plasmaelektrolytbeschichtung nach 3 und 6 Monaten Implantationszeit in Rippen von Minipigs mit und ohne Osteotomie. Nach 6 Monaten beträgt der BIC bei intakten Rippen bei den beschichteten Implantaten 75,8 % und bei den unbeschichteten Implantaten 68,8 % ($p=0,37$).³⁹ Bedingt durch die andere Bestimmungsmethode des BICs ergibt sich eine eingeschränkte Vergleichbarkeit zur Literatur.

Alle Studien zeigen eine Verbesserung des BICs durch Beschichtung nach einer Standzeit von 3 Monaten und 6 Monaten.^{39,40} Dies deckt sich mit den Ergebnissen dieser Studie. Nach 12 Monaten zeigt sich eine bedeutend stärkere Korrosion der Implantate als nach einer Standzeit von 3 oder 6 Monaten. Aufgrund des Vorliegens der Implantate im stark korrodierten Zustand ist einerseits die Messung der Kontaktfläche erschwert und andererseits die Gasbildung stärker als in den Anfangsstadien kurz nach der Implantation bei intakter Beschichtung. Die Ergebnisse aus der Literatur sind auch deshalb nur eingeschränkt übertragbar, da es sich um Knochen mit anderem Aufbau handelt. So verfügt das Os frontale nicht über die klassische Struktur mit kortikalem Knochen und Markraum und die Rippen besitzen einen kleineren Durchmesser und sind bei Minipigs mit einem höheren Anteil an Geflechtknochen gefüllt als die langen Röhrenknochen der Extremitäten. Zu den Limitationen der histomorphometrischen Bestimmung des BICs zählt die Zweidimensionalität, da die Messung anhand nur eines Schliffs erfolgt.

6.3.2 Quantifizierung des lamellären Knochens

Während der Knochenheilung bildet sich zuerst Geflechtknochen, welcher dann anschließend ein Remodelling durchläuft, wobei wieder lamellärer Knochen mit Ausrichtung der Lamellen entsprechend ihrer Hauptbelastungszone entsteht.⁴⁹ Ein geringerer Anteil an Geflechtknochen um die Schrauben lässt dementsprechend auf eine kleinere Umbauzone und somit eine geringere, durch das Magnesium stattgefundene Lyse schließen.

Sowohl nach 6 als auch nach 12 Monaten ist ein höherer Anteil an lamellärem Knochen in der kortikalen ROI nachweisbar. Nach 6 Monaten befindet sich 12,26 % mehr lamellärer Knochen in der Umgebung der beschichteten Implantate und nach 12 Monaten 10,60 % mehr lamellärer Knochen in der Umgebung der beschichteten Implantate. In beiden Gruppen zeigt sich eine Abnahme des Anteils an lamellärem Knochen von 30,01 % auf 25,51 % bei den unbeschichteten Implantaten (Kruskal-Wallis-Test, $p > 0,9999$) und von 42,27 % auf 36,11 % bei den beschichteten Implantaten (Kruskal-Wallis-Test, $p > 0,9999$). Bedingt durch das langsam laufende Remodelling, scheint die Umbauzone über den Untersuchungszeitraum zuzunehmen. Insgesamt ist die Regenerationsgeschwindigkeit der Knochen von Schwein und

Mensch sehr ähnlich, im Bezug zur kompletten Knochenmasse des Menschen findet ein Remodelling von 5-15 % pro Jahr statt.¹¹¹

Schweine haben eine Remodelling-Rate, die der des Menschen sehr ähnlich ist. Die Rate an erneuertem Knochen pro Tag wird bei Schweinen mit 1.2-1.5mm/Tag angegeben, beim Menschen mit 1.0-1.5mm/Tag.¹¹¹ Im Umbauprozess vom Geflecht zum lamellären Knochen legen die multizellulären Einheiten 50-100µm/Tag zurück, wenn sie Platz für den Aufbau einer neuen Lamelle schaffen.⁴⁸ Jedoch wird für die Termination des Abbaus und den erneuten Knochenaufbau wesentlich mehr Zeit benötigt, so vergehen für 2 Wochen Resorption 4-5 Wochen für die Umstellung zum Aufbau und ca. 4 Monate für den Aufbau.¹¹⁶

Wodurch die oft als „leere Lakunen“ bezeichneten, an die Magnesiumimplantate grenzenden Hohlräume entstehen, ist noch nicht abschließend geklärt. Als Ursache wird primär die Gasbildung diskutiert, die durch die Magnesiumdegradation zustande kommt⁸⁰. Verschiedene Faktoren können den Beginn der Knochenresorption auslösen. So z.B. Mikroschäden im Kanalikulisystem der Osteoblasten.¹¹⁶

In vitro konnte eine toxische Wirkung bei hohen Magnesiumionenkonzentrationen in der Lebend-Tot-Färbung bei WE43 gezeigt werden⁶³, wie sie möglicherweise lokal bei der Korrosion der Implantate entsteht. Durch den wiederkehrenden lokalen Konzentrationsanstieg kommt es möglicherweise partiell zu Zellschäden, die dann einen Wiederaufbau durch Geflechtknochen zur Folge haben. Ebenfalls in vitro ist ein alkalischer pH-Shift durch die freiwerdenden Ionen aufgetreten,⁸⁵ im Implantatbett waren jedoch keine pH-Veränderungen nachweisbar. Jedoch sind auch hier temporäre lokale Schäden nicht auszuschließen.⁸⁵

Durch den Abfall des Anteils an lamellärem Knochen um die Schrauben liegt die Hypothese nahe, dass es durch die andauernde Degradation und damit verbundene Gasbildung zu einer Behinderung des Remodellings und sogar zu einem weiteren Umbau von lamellärem Knochen in Geflechtknochen kommt. Die oberflächenmodifizierten Schrauben zeigen hier eine geringere Umbauzone als die Schrauben ohne Oberflächenmodifikation. Um dem Knochen bestmögliche Bedingungen zu bieten, wäre vermutlich nach einer initial uneingeschränkten Stabilität für den Zeitraum der Frakturheilung über 6 Wochen anschließend eine Resorption innerhalb der nächsten 2-3 Monate ideal.

Bei der Unterscheidung zwischen lamellärem und Geflechtknochen handelt es sich um einen händisch gelegten Parameter ohne vorherige Randomisierung. Auch kann

bereits erfolgtes Remodelling nicht mehr abgebildet werden, ein bereits direkt nach der Implantation stattgefundenen starker Umbauprozess kann dadurch nicht mehr zu sehen sein.

6.3.3 Quantifizierung der Überwachung der Platte

Durch die frei werdenden Magnesiumionen wird eine Knochenneubildung induziert, welche unter anderem zum Überwachsen der Platten führt. In der Studie von Chaya et al. 2015⁸¹ kommt es zu einem kompletten Überwachsen der Platten nach 4 Monaten.⁸¹ Im Vergleich zu Titanimplantaten kommt es bei Magnesiumplatten zu einer vermehrten Knochenbildung.⁸¹ Auch Naujokat et al. 2017 beschreibt die Knochenneubildung auf den Magnesiumimplantaten, allerdings erschien die Knochenneubildung um die Titanimplantate im Vergleich stabiler.

Im Unterschied zwischen beschichteten und unbeschichteten WE43-basierten Magnesiumimplantaten beschreibt Schaller et al 2016³⁸, dass es mit einer langsameren Degradation zu einer signifikant höheren Menge an neu gebildetem Knochen um die beschichteten Implantate nach 4 und 6 Monaten Standzeit kommt. Es zeigt sich die gleiche Tendenz wie in den Ergebnissen in dieser Studie, bei der zu beiden Entnahmezeitpunkten die beschichteten Platten stärker von Knochen überwachsen sind. Über den Untersuchungszeitraum kommt es jedoch nicht zu einer weiteren Zunahme der Menge an Knochen über der Platte, sondern die Menge an Knochen über der Platte nimmt bei allen Implantaten im Vergleich zwischen 6 und 12 Monaten ab. Mit einer Abnahme von 2,61 mm² auf 1,30 mm² bei den unbeschichteten Implantaten (Kruskal-Wallis-Test, $p > 0,9999$) hat sich der Wert halbiert, im Bezug auf die beschichteten Implantate findet bei einer Reduktion von 6,95 mm² auf 4,25 mm² (Kruskal-Wallis-Test, $p = 0,9590$) eine Reduktion um ungefähr ein Drittel statt. Eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen wäre das voranschreitende Remodelling des Knochens, da der Anteil an neu gebildetem Knochen über der Platte nicht der ursprünglichen Knochenstruktur entspricht und so keinen biomechanischen Zweck erfüllt.

Auch hier zählt zu den Limitationen der Messung die alleinige Bestimmung in der Histologie anhand eines Schliffes. Alle histologisch bestimmten Parameter wurden aus händisch gelegten Gewebsmasken berechnet.

6.4 Fazit

Nach bestem Wissen handelt es sich um die erste Studie, die WE43-Magnesiumimplantate mit und ohne PEO-Oberflächenmodifikation über den Zeitraum von zwölf Monaten im Großtier untersucht.

Es zeigen sich vielversprechende Ergebnisse für die Entwicklung oberflächenmodifizierter Osteosynthesysteme, da sich durch die Verwendung von einer PEO-Oberflächenmodifikation die Implantatdegradation im kortikalen Bereich signifikant verzögern und dadurch auch die Knochenqualität steigern und die Osseointegration nach 6 und 12 Monaten verbessern lässt. Es zeigt sich eine gute Verträglichkeit der Implantate, keine Entzündungsreaktion und eine adäquate Geschwindigkeit der Implantatresorption. Diese Umstände ebnen den Weg für eine Verwendung am Menschen.

Darüber hinaus zeigen sich Eigenschaften des Magnesiums, die Ideen bezüglich weiterer Anwendungsmöglichkeiten anregen. Durch die gesteigerte Knochenbildung auf den Magnesiumimplantaten und im Markraum unterstützt es die These, dass Magnesium sich für Indikationen eignet, wo die gesteigerte Knochenbildung wünschenswert ist. Dazu gehört beispielsweise das Überbrücken von Critical-Size-Defekten oder der Einsatz am osteoporotischen Knochen.

Insgesamt werden jedoch noch weitere Studien benötigt, um die Reaktion des Knochens auf das Magnesium weiter zu verstehen und einen sicheren Einsatz am Menschen zu gewährleisten. Ziel dieser Studien sollte sein, die Frakturheilung unter Anwesenheit von Magnesium zu evaluieren und den Einsatz von Magnesiumplatten unter lasttragenden Bedingungen zu untersuchen. Zu den Limitationen dieser Studie zählt das Fehlen von biomechanischen Tests und das Fehlen von Kurzzeitergebnissen, da es sich um einen Verträglichkeitstest und kein Frakturmodell handelt.

7 Literaturverzeichnis

- (1) Gesundheit Statistik Gesundheitsberichterstattung des Bundes http://www.gbe-bund.de/gbe10/pkg_isgbe5.prc_isgbe?p_uid=gast&p_aid=0&p_sprache=D (accessed Jun 14, 2019).
- (2) Kraft, A.; Abermann, E.; Stigler, R.; Zsifkovits, C.; Pedross, F.; Kloss, F.; Gassner, R. Craniomaxillofacial Trauma: Synopsis of 14,654 Cases with 35,129 Injuries in 15 Years. *Craniomaxillofacial Trauma Reconstr.* **2012**, 5 (1), 41–50. <https://doi.org/10.1055/s-0031-1293520>.
- (3) Kaura, S.; Kaur, P.; Bahl, R.; Bansal, S.; Sangha, P. Retrospective Study of Facial Fractures. *Ann. Maxillofac. Surg.* **2018**, 8 (1), 78–82. https://doi.org/10.4103/ams.ams_73_17.
- (4) Singh, V.; Malkunje, L.; Mohammad, S.; Singh, N.; Dhasmana, S.; Das, S. K. The Maxillofacial Injuries: A Study. *Natl. J. Maxillofac. Surg.* **2012**, 3 (2), 166–171. <https://doi.org/10.4103/0975-5950.111372>.
- (5) Moberg, L. E.; Nordenram, A.; Kjellman, O. Metal Release from Plates Used in Jaw Fracture Treatment. A Pilot Study. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* **1989**, 18 (5), 311–314.
- (6) Case, C. P.; Langkamer, V. G.; James, C.; Palmer, M. R.; Kemp, A. J.; Heap, P. F.; Solomon, L. Widespread Dissemination of Metal Debris from Implants. *J. Bone Joint Surg. Br.* **1994**, 76 (5), 701–712.
- (7) Steinemann, S. G. Metal for Craniomaxillofacial Internal Fixation Implants and Its Physiological Implications. In *Craniomaxillofacial Reconstructive and Corrective Bone Surgery: Principles of Internal Fixation Using the AO/ASIF Technique*; Greenberg, A. M., Prein, J., Eds.; Springer New York: New York, NY, 2002; pp 107–112. https://doi.org/10.1007/978-0-387-22427-5_12.
- (8) Solar, R. J.; Pollack, S. R.; Korostoff, E. In Vitro Corrosion Testing of Titanium Surgical Implant Alloys: An Approach to Understanding Titanium Release from Implants. *J. Biomed. Mater. Res.* **1979**, 13 (2), 217–250. <https://doi.org/10.1002/jbm.820130206>.
- (9) Schlegel, K. A.; Eppeneder, S.; Wiltfang, J. Soft Tissue Findings above Submerged Titanium Implants—a Histological and Spectroscopic Study. *Biomaterials* **2002**, 23 (14), 2939–2944. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(01\)00423-9](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(01)00423-9).
- (10) Witte, F.; Hort, N.; Vogt, C.; Cohen, S.; Kainer, K. U.; Willumeit, R.; Feyerabend, F. Degradable Biomaterials Based on Magnesium Corrosion. *Curr. Opin. Solid State Mater. Sci.* **2008**, 12 (5), 63–72. <https://doi.org/10.1016/j.cossms.2009.04.001>.
- (11) Kennady, M. C.; Tucker, M. R.; Lester, G. E.; Buckley, M. J. Stress Shielding Effect of Rigid Internal Fixation Plates on Mandibular Bone Grafts. A Photon Absorption Densitometry and Quantitative Computerized Tomographic Evaluation. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* **1989**, 18 (5), 307–310. [https://doi.org/10.1016/S0901-5027\(89\)80101-8](https://doi.org/10.1016/S0901-5027(89)80101-8).
- (12) Paavolainen, P.; Karaharju, E.; Slätis, P.; Ahonen, J.; Holmström, T. Effect of Rigid Plate Fixation on Structure and Mineral Content of Cortical Bone. *Clin. Orthop.* **1978**, No. 136, 287–293.
- (13) Hernandez Rosa, J.; Villanueva, N. L.; Sanati-Mehrizi, P.; Factor, S. H.; Taub, P. J. Review of Maxillofacial Hardware Complications and Indications for Salvage. *Craniomaxillofacial Trauma Reconstr.* **2016**, 9 (2), 134–140. <https://doi.org/10.1055/s-0035-1570074>.
- (14) Pan, Z.; Patil, P. M. Titanium Osteosynthesis Hardware in Maxillofacial Trauma Surgery: To Remove or Remain? A Retrospective Study. *Eur. J. Trauma Emerg. Surg.* **2014**, 40 (5), 587–591. <https://doi.org/10.1007/s00068-013-0348-5>.
- (15) O’Connell, J.; Murphy, C.; Ikeagwuani, O.; Adley, C.; Kearns, G. The Fate of Titanium Miniplates and Screws Used in Maxillofacial Surgery: A 10 Year Retrospective Study. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* **2009**, 38 (7), 731–735.

<https://doi.org/10.1016/j.ijom.2009.02.016>.

- (16) Yu, Y.; Liu, W.; Chen, J.; Quan, L.; Zheng, X.; Liu, L. No Need to Routinely Remove Titanium Implants for Maxillofacial Fractures. *J. Oral Maxillofac. Surg.* **2019**, *77* (4), 783–788. <https://doi.org/10.1016/j.joms.2018.10.022>.
- (17) Orringer, J. S.; Barcelona, V.; Buchman, S. R. Reasons for Removal of Rigid Internal Fixation Devices in Craniofacial Surgery. *J. Craniofac. Surg.* **1998**, *9* (1), 40–44.
- (18) Yu, J. C.; Bartlett, S. P.; Goldberg, D. S.; Gannon, F.; Hunter, J.; Habecker, P.; Whitaker, L. A. An Experimental Study of the Effects of Craniofacial Growth on the Long-Term Positional Stability of Microfixation. *J. Craniofac. Surg.* **1996**, *7* (1), 64–68.
- (19) Francel, T. J.; Birely, B. C.; Ringelman, P. R.; Manson, P. N. The Fate of Plates and Screws after Facial Fracture Reconstruction. *Plast. Reconstr. Surg.* **1992**, *90* (4), 568–573.
- (20) Staiger, M. P.; Pietak, A. M.; Huadmai, J.; Dias, G. Magnesium and Its Alloys as Orthopedic Biomaterials: A Review. *Biomaterials* **2006**, *27* (9), 1728–1734. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.10.003>.
- (21) Böstman, O.; Pihlajamäki, H. Clinical Biocompatibility of Biodegradable Orthopaedic Implants for Internal Fixation: A Review. *Biomaterials* **2000**, *21* (24), 2615–2621. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(00\)00129-0](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(00)00129-0).
- (22) Böstman, O. M.; Pihlajamäki, H. K. Adverse Tissue Reactions to Bioabsorbable Fixation Devices. *Clin. Orthop. Relat. Res.* **2000**, *371*, 216.
- (23) Bergsma, E. J.; Rozema, F. R.; Bos, R. R. M.; Bruijn, W. C. D. Foreign Body Reactions to Resorbable Poly(l-Lactide) Bone Plates and Screws Used for the Fixation of Unstable Zygomatic Fractures. *J. Oral Maxillofac. Surg.* **1993**, *51* (6), 666–670. [https://doi.org/10.1016/S0278-2391\(10\)80267-8](https://doi.org/10.1016/S0278-2391(10)80267-8).
- (24) Witte, F. Reprint of: The History of Biodegradable Magnesium Implants: A Review. *Acta Biomater.* **2015**, *23 Suppl*, S28–40. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2015.07.017>.
- (25) Technologische Grundlagen – Syntellix AG <https://www.syntellix.de/produkte/technologische-grundlagen.html> (accessed Jan 5, 2020).
- (26) Witte, F.; Kaese, V.; Haferkamp, H.; Switzer, E.; Meyer-Lindenberg, A.; Wirth, C. J.; Windhagen, H. In Vivo Corrosion of Four Magnesium Alloys and the Associated Bone Response. *Biomaterials* **2005**, *26* (17), 3557–3563. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2004.09.049>.
- (27) Wu, Y. F.; Wang, Y. M.; Jing, Y. B.; Zhuang, J. P.; Yan, J. L.; Shao, Z. K.; Jin, M. S.; Wu, C. J.; Zhou, Y. In Vivo Study of Microarc Oxidation Coated Biodegradable Magnesium Plate to Heal Bone Fracture Defect of 3mm Width. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2017**, *158*, 147–156. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.06.031>.
- (28) Yu, Y.; Lu, H.; Sun, J. Long-Term in Vivo Evolution of High-Purity Mg Screw Degradation - Local and Systemic Effects of Mg Degradation Products. *Acta Biomater.* **2018**, *71*, 215–224. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.02.023>.
- (29) Draxler, J.; Martinelli, E.; Weinberg, A. M.; Zitek, A.; Irrgeher, J.; Meischel, M.; Stanzl-Tschegg, S. E.; Mingler, B.; Prohaska, T. The Potential of Isotopically Enriched Magnesium to Study Bone Implant Degradation in Vivo. *Acta Biomater.* **2017**, *51*, 526–536. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2017.01.054>.
- (30) Wong, H. M.; Yeung, K. W. K.; Lam, K. O.; Tam, V.; Chu, P. K.; Luk, K. D. K.; Cheung, K. M. C. A Biodegradable Polymer-Based Coating to Control the Performance of Magnesium Alloy Orthopaedic Implants. *Biomaterials* **2010**, *31* (8), 2084–2096. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.11.111>.
- (31) Gray, J. E.; Luan, B. Protective Coatings on Magnesium and Its Alloys — a Critical Review. *J. Alloys Compd.* **2002**, *336* (1), 88–113. [https://doi.org/10.1016/S0925-8388\(01\)01899-0](https://doi.org/10.1016/S0925-8388(01)01899-0).
- (32) Kamrani, S.; Fleck, C. Biodegradable Magnesium Alloys as Temporary Orthopaedic Implants: A Review. *BioMetals* **2019**, *32* (2), 185–193. <https://doi.org/10.1007/s10534-019->

00170-y.

- (33) Plaass, C.; von Falck, C.; Ettinger, S.; Sonnow, L.; Calderone, F.; Weizbauer, A.; Reifenrath, J.; Claassen, L.; Waizy, H.; Daniilidis, K.; Stukenborg-Colsman, C.; Windhagen, H. Bioabsorbable Magnesium versus Standard Titanium Compression Screws for Fixation of Distal Metatarsal Osteotomies - 3 Year Results of a Randomized Clinical Trial. *J. Orthop. Sci. Off. J. Jpn. Orthop. Assoc.* **2018**, *23* (2), 321–327. <https://doi.org/10.1016/j.jos.2017.11.005>.
- (34) Plaass, C.; Ettinger, S.; Sonnow, L.; Koenneker, S.; Noll, Y.; Weizbauer, A.; Reifenrath, J.; Claassen, L.; Daniilidis, K.; Stukenborg-Colsman, C.; Windhagen, H. Early Results Using a Biodegradable Magnesium Screw for Modified Chevron Osteotomies. *J. Orthop. Res. Off. Publ. Orthop. Res. Soc.* **2016**, *34* (12), 2207–2214. <https://doi.org/10.1002/jor.23241>.
- (35) Klauser, H. Internal Fixation of Three-Dimensional Distal Metatarsal I Osteotomies in the Treatment of Hallux Valgus Deformities Using Biodegradable Magnesium Screws in Comparison to Titanium Screws. *Foot Ankle Surg. Off. J. Eur. Soc. Foot Ankle Surg.* **2018**. <https://doi.org/10.1016/j.fas.2018.02.005>.
- (36) Lee, J.-W.; Han, H.-S.; Han, K.-J.; Park, J.; Jeon, H.; Ok, M.-R.; Seok, H.-K.; Ahn, J.-P.; Lee, K. E.; Lee, D.-H.; Yang, S.-J.; Cho, S.-Y.; Cha, P.-R.; Kwon, H., Nam, T.-H.; Han, J., Rho, H.-J.; Lee, K.-S., Kim, Y.-C., Mantovani, D. Long-Term Clinical Study and Multiscale Analysis of in Vivo Biodegradation Mechanism of Mg Alloy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2016**, *113* (3), 716–721. <https://doi.org/10.1073/pnas.1518238113>.
- (37) Kose, O.; Turan, A.; Unal, M.; Acar, B.; Guler, F. Fixation of Medial Malleolar Fractures with Magnesium Bioabsorbable Headless Compression Screws: Short-Term Clinical and Radiological Outcomes in Eleven Patients. *Arch. Orthop. Trauma Surg.* **2018**, *138* (8), 1069–1075. <https://doi.org/10.1007/s00402-018-2941-x>.
- (38) Schaller, B.; Saulacic, N.; Imwinkelried, T.; Beck, S.; Liu, E. W. Y.; Gralla, J.; Nakahara, K.; Hofstetter, W.; Iizuka, T. In Vivo Degradation of Magnesium Plate/Screw Osteosynthesis Implant Systems: Soft and Hard Tissue Response in a Calvarial Model in Miniature Pigs. *J. Cranio-Maxillo-fac. Surg. Off. Publ. Eur. Assoc. Cranio-Maxillo-fac. Surg.* **2016**, *44* (3), 309–317. <https://doi.org/10.1016/j.jcms.2015.12.009>.
- (39) Schaller, B.; Saulacic, N.; Beck, S.; Imwinkelried, T.; Liu, E. W. Y.; Nakahara, K.; Hofstetter, W.; Iizuka, T. Osteosynthesis of Partial Rib Osteotomy in a Miniature Pig Model Using Human Standard-Sized Magnesium Plate/Screw Systems: Effect of Cyclic Deformation on Implant Integrity and Bone Healing. *J. Cranio-Maxillo-fac. Surg. Off. Publ. Eur. Assoc. Cranio-Maxillo-fac. Surg.* **2017**, *45* (6), 862–871. <https://doi.org/10.1016/j.jcms.2017.03.018>.
- (40) Schaller, B.; Saulacic, N.; Beck, S.; Imwinkelried, T.; Goh, B. T.; Nakahara, K.; Hofstetter, W.; Iizuka, T. In Vivo Degradation of a New Concept of Magnesium-Based Rivet-Screws in the Minipig Mandibular Bone. *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* **2016**, *69*, 247–254. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.06.085>.
- (41) Lüllmann-Rauch, Renate. Taschenlehrbuch Histologie. In *Taschenlehrbuch Histologie*; Georg Thieme Verlag KG, 2009; pp 144–158, 165.
- (42) Lippert, Herbert. Lehrbuch Anatomie. In *Lehrbuch Anatomie*; Elsevier GmbH, Urban & Fischer Verlag München, 32-35; Vol. 5. Auflage.
- (43) Baig, M. A.; Bacha, D. Histology, Bone. In *StatPearls*; StatPearls Publishing: Treasure Island (FL), 2019.
- (44) Einhorn, T. A.; Gerstenfeld, L. C. Fracture Healing: Mechanisms and Interventions. *Nat. Rev. Rheumatol.* **2015**, *11* (1), 45–54. <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2014.164>.
- (45) Phillips, A. M. Overview of the Fracture Healing Cascade. *Injury* **2005**, *36* (3, Supplement), S5–S7. <https://doi.org/10.1016/j.injury.2005.07.027>.
- (46) Kolar, P.; Schmidt-Bleek, K.; Schell, H.; Gaber, T.; Toben, D.; Schmidmaier, G.;

- Perka, C.; Buttgereit, F.; Duda, G. N. The Early Fracture Hematoma and Its Potential Role in Fracture Healing. *Tissue Eng. Part B Rev.* **2010**, *16* (4), 427–434. <https://doi.org/10.1089/ten.teb.2009.0687>.
- (47) Bucher, C. H.; Lei, H.; Duda, G. N.; Schmidt-Bleek, H.-D. V. and K. The Role of Immune Reactivity in Bone Regeneration. *Adv. Tech. Bone Regen.* **2016**. <https://doi.org/10.5772/62476>.
- (48) Marsell, R.; Einhorn, T. A. The Biology of Fracture Healing. *Injury* **2011**, *42* (6), 551–555. <https://doi.org/10.1016/j.injury.2011.03.031>.
- (49) Schmidt-Bleek, K.; Petersen, A.; Dienelt, A.; Schwarz, C.; Duda, G. N. Initiation and Early Control of Tissue Regeneration – Bone Healing as a Model System for Tissue Regeneration. *Expert Opin. Biol. Ther.* **2014**, *14* (2), 247–259. <https://doi.org/10.1517/14712598.2014.857653>.
- (50) Ketenjian, A.; Arsenis, C. Morphological and Biochemical Studies During Differentiation and Calcification of Fracture Callus Cartilage. *Clin. Orthop.* **1975**, *107*, 266–273.
- (51) Claes, L.; Blakytyn, R.; Göckelmann, M.; Schoen, M.; Ignatius, A.; Willie, B. Early Dynamization by Reduced Fixation Stiffness Does Not Improve Fracture Healing in a Rat Femoral Osteotomy Model. *J. Orthop. Res.* **2009**, *27* (1), 22–27. <https://doi.org/10.1002/jor.20712>.
- (52) Willie, B. M.; Blakytyn, R.; Glöckelmann, M.; Ignatius, A.; Claes, L. Temporal Variation in Fixation Stiffness Affects Healing by Differential Cartilage Formation in a Rat Osteotomy Model. *Clin. Orthop.* **2011**, *469* (11), 3094–3101. <https://doi.org/10.1007/s11999-011-1866-2>.
- (53) Morgan, E. F.; Salisbury Palomares, K. T.; Gleason, R. E.; Bellin, D. L.; Chien, K. B.; Unnikrishnan, G. U.; Leong, P. L. Correlations between Local Strains and Tissue Phenotypes in an Experimental Model of Skeletal Healing. *J. Biomech.* **2010**, *43* (12), 2418–2424. <https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2010.04.019>.
- (54) Claes, L.; Wolf, S.; Augat, P. Mechanische Einflüsse auf die Callusheilung. *Chir.* **2000**, *71* (9), 989–994. <https://doi.org/10.1007/s001040051172>.
- (55) Winkler, T.; Sass, F. A.; Duda, G. N.; Schmidt-Bleek, K. A Review of Biomaterials in Bone Defect Healing, Remaining Shortcomings and Future Opportunities for Bone Tissue Engineering: The Unsolved Challenge. *Bone Jt. Res.* **2018**, *7* (3), 232–243. <https://doi.org/10.1302/2046-3758.73.BJR-2017-0270.R1>.
- (56) Sohn, H.-S.; Oh, J.-K. Review of Bone Graft and Bone Substitutes with an Emphasis on Fracture Surgeries. *Biomater. Res.* **2019**, *23* (1), 9. <https://doi.org/10.1186/s40824-019-0157-y>.
- (57) Michelet, F. X.; Deymes, J.; Dessus, B. Osteosynthesis with Miniaturized Screwed Plates in Maxillo-Facial Surgery. *J. Maxillofac. Surg.* **1973**, *1* (2), 79–84.
- (58) Champy, M.; Loddé, J. P.; Schmitt, R.; Jaeger, J. H.; Muster, D. Mandibular Osteosynthesis by Miniature Screwed Plates via a Buccal Approach. *J. Maxillofac. Surg.* **1978**, *6*, 14–21. [https://doi.org/10.1016/S0301-0503\(78\)80062-9](https://doi.org/10.1016/S0301-0503(78)80062-9).
- (59) Gutwald, Ralf. Neue Entwicklungen Und Aspekte Der Miniplattenosteosynthese - Oberflächenkonfiguration, Schraubendesign, Fixierungstechnik, BMP -. 2004.
- (60) Wiltfang, J. Osteosynthesesysteme in der Mund-, Kiefer-, Gesichtschirurgie. *HNO* **2002**, *50* (9), 800–811. <https://doi.org/10.1007/s00106-002-0667-z>.
- (61) Rendenbach, C.; Sellenschloh, K.; Gerbig, L.; Morlock, M. M.; Beck-Broichsitter, B.; Smeets, R.; Heiland, M.; Huber, G.; Hanken, H. CAD-CAM Plates versus Conventional Fixation Plates for Primary Mandibular Reconstruction: A Biomechanical in Vitro Analysis. *J. Cranio-Maxillo-fac. Surg. Off. Publ. Eur. Assoc. Cranio-Maxillo-fac. Surg.* **2017**, *45* (11), 1878–1883. <https://doi.org/10.1016/j.jcms.2017.08.024>.
- (62) Liu, M.; Uggowitzer, P. J.; Nagasekhar, A. V.; Schmutz, P.; Easton, M.; Song, G.-L.;

- Atrens, A. Calculated Phase Diagrams and the Corrosion of Die-Cast Mg–Al Alloys. *Corros. Sci.* **2009**, *51* (3), 602–619. <https://doi.org/10.1016/j.corsci.2008.12.015>.
- (63) Jung, O.; Smeets, R.; Porchetta, D.; Kopp, A.; Ptock, C.; Müller, U.; Heiland, M.; Schwade, M.; Behr, B.; Kröger, N.; Kluwe, L.; Hanken, H.; Hartjen, P. Optimized in Vitro Procedure for Assessing the Cytocompatibility of Magnesium-Based Biomaterials. *Acta Biomater.* **2015**, *23*, 354–363. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2015.06.005>.
- (64) Mang, H. A.; Hofstetter, G. Grundlagen der Elastizitätstheorie. In *Festigkeitslehre*; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2013; pp 19–105. https://doi.org/10.1007/978-3-642-40752-9_3.
- (65) Chakraborty Banerjee, P.; Al-Saadi, S.; Choudhary, L.; Harandi, S. E.; Singh, R. Magnesium Implants: Prospects and Challenges. *Mater. Basel Switz.* **2019**, *12* (1). <https://doi.org/10.3390/ma12010136>.
- (66) Niinomi, M.; Nakai, M.; Hieda, J. Development of New Metallic Alloys for Biomedical Applications. *Acta Biomater.* **2012**, *8* (11), 3888–3903. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2012.06.037>.
- (67) Pobloth, A.-M.; Checa, S.; Razi, H.; Petersen, A.; Weaver, J. C.; Schmidt-Bleek, K.; Windolf, M.; Tatai, A. Á.; Roth, C. P.; Schaser, K.-D.; Duda, G.; Schwabe, P. Mechanobiologically Optimized 3D Titanium-Mesh Scaffolds Enhance Bone Regeneration in Critical Segmental Defects in Sheep. *Sci. Transl. Med.* **2018**, *10* (423). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aam8828>.
- (68) Zhao, D.; Witte, F.; Lu, F.; Wang, J.; Li, J.; Qin, L. Current Status on Clinical Applications of Magnesium-Based Orthopaedic Implants: A Review from Clinical Translational Perspective. *Biomaterials* **2017**, *112*, 287–302. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2016.10.017>.
- (69) Wolf, F. I.; Cittadini, A. Chemistry and Biochemistry of Magnesium. *Mol. Aspects Med.* **2003**, *24* (1), 3–9. [https://doi.org/10.1016/S0098-2997\(02\)00087-0](https://doi.org/10.1016/S0098-2997(02)00087-0).
- (70) Magnesium: Its Biologic Significance, by J. K. Aikawa - Wallach - 1982 - Medical Physics - Wiley Online Library <https://aapm.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1118/1.595176> (accessed May 24, 2019).
- (71) Vormann, J. Magnesium: Nutrition and Metabolism. *Mol. Aspects Med.* **2003**, *24* (1), 27–37. [https://doi.org/10.1016/S0098-2997\(02\)00089-4](https://doi.org/10.1016/S0098-2997(02)00089-4).
- (72) Jahnen-Dechent, W.; Ketteler, M. Magnesium Basics. *Clin. Kidney J.* **2012**, *5* (Suppl 1), i3–i14. <https://doi.org/10.1093/ndtplus/sfr163>.
- (73) Martini, L. A. Magnesium Supplementation and Bone Turnover. *Nutr. Rev.* **1999**, *57* (7), 227–229. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.1999.tb06948.x>.
- (74) Rude, R. K. Magnesium Deficiency: A Cause of Heterogenous Disease in Humans. *J. Bone Miner. Res.* **1998**, *13* (4), 749–758. <https://doi.org/10.1359/jbmr.1998.13.4.749>.
- (75) Swaminathan, R. Magnesium Metabolism and Its Disorders. *Clin. Biochem. Rev.* **2003**, *24* (2), 47–66.
- (76) Touyz, R. M. Magnesium in Clinical Medicine. *Front. Biosci. J. Virtual Libr.* **2004**, *9*, 1278–1293.
- (77) Saris, N.-E. L.; Mervaala, E.; Karppanen, H.; Khawaja, J. A.; Lewenstam, A. Magnesium: An Update on Physiological, Clinical and Analytical Aspects. *Clin. Chim. Acta* **2000**, *294* (1), 1–26. [https://doi.org/10.1016/S0009-8981\(99\)00258-2](https://doi.org/10.1016/S0009-8981(99)00258-2).
- (78) Kamrani, S.; Fleck, C. Biodegradable Magnesium Alloys as Temporary Orthopaedic Implants: A Review. *Biomaterials Int. J. Role Met. Ions Biol. Biochem. Med.* **2019**, *32* (2), 185–193. <https://doi.org/10.1007/s10534-019-00170-y>.
- (79) Farraro, K. F.; Kim, K. E.; Woo, S. L.-Y.; Flowers, J. R.; McCullough, M. B. Revolutionizing Orthopaedic Biomaterials: The Potential of Biodegradable and Bioresorbable Magnesium-Based Materials for Functional Tissue Engineering. *J. Biomech.* **2014**, *47* (9), 1979–1986. <https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2013.12.003>.

- (80) Naujokat, H.; Seitz, J.-M.; Açil, Y.; Damm, T.; Möller, I.; Gülses, A.; Wiltfang, J. Osteosynthesis of a Cranio-Osteoplasty with a Biodegradable Magnesium Plate System in Miniature Pigs. *Acta Biomater.* **2017**, *62*, 434–445. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2017.08.031>.
- (81) Chaya, A.; Yoshizawa, S.; Verdelis, K.; Myers, N.; Costello, B. J.; Chou, D.-T.; Pal, S.; Maiti, S.; Kumta, P. N.; Sfeir, C. In Vivo Study of Magnesium Plate and Screw Degradation and Bone Fracture Healing. *Acta Biomater.* **2015**, *18*, 262–269. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2015.02.010>.
- (82) Imwinkelried, T.; Beck, S.; Iizuka, T.; Schaller, B. Effect of a Plasmaelectrolytic Coating on the Strength Retention of in Vivo and in Vitro Degraded Magnesium Implants. *Acta Biomater.* **2013**, *9* (10), 8643–8649. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2012.08.047>.
- (83) Jung, O.; Porchetta, D.; Schroeder, M.-L.; Klein, M.; Wegner, N.; Walther, F.; Feyerabend, F.; Barbeck, M.; Kopp, A. In Vivo Simulation of Magnesium Degradability Using a New Fluid Dynamic Bench Testing Approach. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20* (19). <https://doi.org/10.3390/ijms20194859>.
- (84) Jung, O.; Smeets, R.; Hartjen, P.; Schnettler, R.; Feyerabend, F.; Klein, M.; Wegner, N.; Walther, F.; Stangier, D.; Henningsen, A.; Rendenbach, C.; Heiland, M.; Barbeck, M.; Kopp, A. Improved In Vitro Test Procedure for Full Assessment of the Cytocompatibility of Degradable Magnesium Based on ISO 10993-5/-12. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20* (2). <https://doi.org/10.3390/ijms20020255>.
- (85) Imwinkelried, T.; Beck, S.; Iizuka, T.; Schaller, B. Effect of a Plasmaelectrolytic Coating on the Strength Retention of in Vivo and in Vitro Degraded Magnesium Implants. *Acta Biomater.* **2013**, *9* (10), 8643–8649. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2012.08.047>.
- (86) Chakraborty Banerjee, P.; Al-Saadi, S.; Choudhary, L.; Harandi, S. E.; Singh, R. Magnesium Implants: Prospects and Challenges. *Mater. Basel Switz.* **2019**, *12* (1). <https://doi.org/10.3390/ma12010136>.
- (87) Lévesque, J.; Hermawan, H.; Dubé, D.; Mantovani, D. Design of a Pseudo-Physiological Test Bench Specific to the Development of Biodegradable Metallic Biomaterials. *Acta Biomater.* **2008**, *4* (2), 284–295. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2007.09.012>.
- (88) Kopp, A.; Derra, T.; Müther, M.; Jauer, L.; Schleifenbaum, J. H.; Voshage, M.; Jung, O.; Smeets, R.; Kröger, N. Influence of Design and Postprocessing Parameters on the Degradation Behavior and Mechanical Properties of Additively Manufactured Magnesium Scaffolds. *Acta Biomater.* **2019**. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2019.04.012>.
- (89) Barati Darband, Gh.; Aliofkhaezaei, M.; Hamghalam, P.; Valizade, N. Plasma Electrolytic Oxidation of Magnesium and Its Alloys: Mechanism, Properties and Applications. *J. Magnes. Alloys* **2017**, *5* (1), 74–132. <https://doi.org/10.1016/j.jma.2017.02.004>.
- (90) Wong, H. M.; Wu, S.; Chu, P. K.; Cheng, S. H.; Luk, K. D. K.; Cheung, K. M. C.; Yeung, K. W. K. Low-Modulus Mg/PCL Hybrid Bone Substitute for Osteoporotic Fracture Fixation. *Biomaterials* **2013**, *34* (29), 7016–7032. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.05.062>.
- (91) Yoshizawa, S.; Brown, A.; Barchowsky, A.; Sfeir, C. Magnesium Ion Stimulation of Bone Marrow Stromal Cells Enhances Osteogenic Activity, Simulating the Effect of Magnesium Alloy Degradation. *Acta Biomater.* **2014**, *10* (6), 2834–2842. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2014.02.002>.
- (92) Yoshizawa, S.; Brown, A.; Barchowsky, A.; Sfeir, C. Role of Magnesium Ions on Osteogenic Response in Bone Marrow Stromal Cells. *Connect. Tissue Res.* **2014**, *55* (sup1), 155–159. <https://doi.org/10.3109/03008207.2014.923877>.
- (93) Wang, W.; Yeung, K. W. K. Bone Grafts and Biomaterials Substitutes for Bone Defect Repair: A Review. *Bioact. Mater.* **2017**, *2* (4), 224–247.

<https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2017.05.007>.

(94) Kopp, A.; Derra, T.; Müther, M.; Jauer, L.; Schleifenbaum, J. H.; Voshage, M.; Jung, O.; Smeets, R.; Kröger, N. Influence of Design and Postprocessing Parameters on the Degradation Behavior and Mechanical Properties of Additively Manufactured Magnesium Scaffolds. *Acta Biomater.* **2019**. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2019.04.012>.

(95) Jung, O.; Smeets, R.; Kopp, A.; Porchetta, D.; Hiester, P.; Heiland, M.; Friedrich, R. E.; Precht, C.; Hanken, H.; Gröbe, A.; Hartjen, P. PEO-Generated Surfaces Support Attachment and Growth of Cells In Vitro with No Additional Benefit for Micro-Roughness in Sa (0.2-4 Mm). *Vivo Athens Greece* **2016**, *30* (1), 27–33.

(96) Barati Darband, Gh.; Aliofkhaezai, M.; Hamghalam, P.; Valizade, N. Plasma Electrolytic Oxidation of Magnesium and Its Alloys: Mechanism, Properties and Applications. *J. Magnes. Alloys* **2017**, *5* (1), 74–132.

<https://doi.org/10.1016/j.jma.2017.02.004>.

(97) Hornberger, H.; Virtanen, S.; Boccaccini, A. R. Biomedical Coatings on Magnesium Alloys – A Review. *Acta Biomater.* **2012**, *8* (7), 2442–2455.

<https://doi.org/10.1016/j.actbio.2012.04.012>.

(98) Wang, Y. Q.; Wu, K.; Zheng, M. Y. Effects of Reinforcement Phases in Magnesium Matrix Composites on Microarc Discharge Behavior and Characteristics of Microarc Oxidation Coatings. *Surf. Coat. Technol.* **2006**, *201* (1–2), 353–360.

<https://doi.org/10.1016/j.surfcoat.2005.11.129>.

(99) Sankara Narayanan, T. S. N.; Park, I. S.; Lee, M. H. Strategies to Improve the Corrosion Resistance of Microarc Oxidation (MAO) Coated Magnesium Alloys for Degradable Implants: Prospects and Challenges. *Prog. Mater. Sci.* **2014**, *60*, 1–71.

<https://doi.org/10.1016/j.pmatsci.2013.08.002>.

(100) Jung, O.; Smeets, R.; Porchetta, D.; Kopp, A.; Ptock, C.; Müller, U.; Heiland, M.; Schwade, M.; Behr, B.; Kröger, N.; Kluwe, L.; Hanken, H.; Hartjen, P. Optimized in Vitro Procedure for Assessing the Cytocompatibility of Magnesium-Based Biomaterials. *Acta Biomater.* **2015**, *23*, 354–363. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2015.06.005>.

(101) Ibrahim, H.; Esfahani, S. N.; Poorganji, B.; Dean, D.; Elahinia, M. Resorbable Bone Fixation Alloys, Forming, and Post-Fabrication Treatments. *Mater. Sci. Eng. C* **2017**, *70*, 870–888. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.09.069>.

(102) Ma, W. H.; Liu, Y. J.; Wang, W.; Zhang, Y. Z.; Ma, W. H.; Liu, Y. J.; Wang, W.; Zhang, Y. Z. Improved Biological Performance of Magnesium by Micro-Arc Oxidation. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **2015**, *48* (3), 214–225. <https://doi.org/10.1590/1414-431x20144171>.

(103) Zreiqat, H.; Howlett, C. R.; Zannettino, A.; Evans, P.; Schulze-Tanzil, G.; Knabe, C.; Shakibaei, M. Mechanisms of Magnesium-Stimulated Adhesion of Osteoblastic Cells to Commonly Used Orthopaedic Implants. *J. Biomed. Mater. Res.* **2002**, *62* (2), 175–184.

<https://doi.org/10.1002/jbm.10270>.

(104) Al-Bustani, S.; Austin, G.; Ambrose, E.; Miller, J.; Hackman, T.; Halvorson, E. Miniplates Versus Reconstruction Bars for Oncologic Free Fibula Flap Mandible Reconstruction. *Ann. Plast. Surg.* **2016**, *77* (3), 314–317.

<https://doi.org/10.1097/SAP.0000000000000497>.

(105) Gilardino, M. S.; Chen, E.; Bartlett, S. P. Choice of Internal Rigid Fixation Materials in the Treatment of Facial Fractures. *Craniomaxillofacial Trauma Reconstr.* **2009**, *2* (1), 49–60. <https://doi.org/10.1055/s-0029-1202591>.

(106) Rendenbach, C.; Schoellchen, M.; Bueschel, J.; Gauer, T.; Sedlacik, J.; Kutzner, D.; Vallittu, P. K.; Heiland, M.; Smeets, R.; Fiehler, J.; Siemonsen, S. Evaluation and Reduction of Magnetic Resonance Imaging Artefacts Induced by Distinct Plates for Osseous Fixation: An in Vitro Study @ 3 T. *Dentomaxillofacial Radiol.* **2018**, *47* (7), 20170361.

<https://doi.org/10.1259/dmfr.20170361>.

(107) Katou, F.; Andoh, N.; Motegi, K.; Nagura, H. Immuno-Inflammatory Responses in the

- Tissue Adjacent to Titanium Miniplates Used in the Treatment of Mandibular Fractures. *J. Cranio-Maxillofac. Surg.* **1996**, 24 (3), 155–162. [https://doi.org/10.1016/S1010-5182\(96\)80049-7](https://doi.org/10.1016/S1010-5182(96)80049-7).
- (108) Wolff, J. *Das Gesetz der Transformation der Knochen*; Hirschwald: Berlin, 1892.
- (109) Buijs, G. J.; van der Houwen, E. B.; Stegenga, B.; Bos, R. R. M.; Verkerke, G. J. Mechanical Strength and Stiffness of Biodegradable and Titanium Osteofixation Systems. *J. Oral Maxillofac. Surg. Off. J. Am. Assoc. Oral Maxillofac. Surg.* **2007**, 65 (11), 2148–2158. <https://doi.org/10.1016/j.joms.2007.04.010>.
- (110) Schaller, B.; Matthias Burkhard, J. P.; Chagnon, M.; Beck, S.; Imwinkelried, T.; Assad, M. Fracture Healing and Bone Remodeling With Human Standard-Sized Magnesium Versus Polylactide-Co-Glycolide Plate and Screw Systems Using a Mini-Swine Craniomaxillofacial Osteotomy Fixation Model. *J. Oral Maxillofac. Surg. Off. J. Am. Assoc. Oral Maxillofac. Surg.* **2018**, 76 (10), 2138–2150. <https://doi.org/10.1016/j.joms.2018.03.039>.
- (111) Pearce, A. I.; Richards, R. G.; Milz, S.; Schneider, E.; Pearce, S. G. Animal Models for Implant Biomaterial Research in Bone: A Review. *Eur. Cell. Mater.* **2007**, 13, 1–10.
- (115) Willbold, E.; Kaya, A. A.; Kaya, R. A.; Beckmann, F.; Witte, F. Corrosion of Magnesium Alloy AZ31 Screws Is Dependent on the Implantation Site. *Mater. Sci. Eng. B* **2011**, 176 (20), 1835–1840. <https://doi.org/10.1016/j.mseb.2011.02.010>.
- (112) Naujokat, H.; Ruff, C. B.; Klüter, T.; Seitz, J.-M.; Açil, Y.; Wiltfang, J. Influence of Surface Modifications on the Degradation of Standard-Sized Magnesium Plates and Healing of Mandibular Osteotomies in Miniature Pigs. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* **2019**, 0 (0). <https://doi.org/10.1016/j.ijom.2019.03.966>.
- (113) Drynda, A.; Deinet, N.; Braun, N.; Peuster, M. Rare Earth Metals Used in Biodegradable Magnesium-Based Stents Do Not Interfere with Proliferation of Smooth Muscle Cells but Do Induce the Upregulation of Inflammatory Genes. *J. Biomed. Mater. Res. A* **2009**, 91A (2), 360–369. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.32235>.
- (114) Feyerabend, F.; Fischer, J.; Holtz, J.; Witte, F.; Willumeit, R.; Drücker, H.; Vogt, C.; Hort, N. Evaluation of Short-Term Effects of Rare Earth and Other Elements Used in Magnesium Alloys on Primary Cells and Cell Lines. *Acta Biomater.* **2010**, 6 (5), 1834–1842. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2009.09.024>.
- (115) Feyerabend, F.; Wendel, H.-P.; Mihailova, B.; Heidrich, S.; Agha, N. A.; Bismayer, U.; Willumeit-Römer, R. Blood Compatibility of Magnesium and Its Alloys. *Acta Biomater.* **2015**, 25, 384–394. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2015.07.029>.
- Oral Maxillofac. Surg.* **2018**, 76 (10), 2138–2150. <https://doi.org/10.1016/j.joms.2018.03.039>.
- (116) Kenkre, J. S.; Bassett, J. The Bone Remodelling Cycle. *Ann. Clin. Biochem.* **2018**, 55 (3), 308–327. <https://doi.org/10.1177/0004563218759371>.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Heilwig Fischer, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „6- und 12- Monats-Ergebnisse des Vergleichs zwischen PEO-oberflächenmodifizierten und WE43 basierten Magnesiumimplantaten ohne Oberflächenmodifikation im Schweinemodell“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Betreuer, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Danksagung

Mein Dank gilt meinem Doktorvater Univ.-Prof. Dr. med. Dr. med. dent. Max Heiland, Klinikdirektor der Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie der Charité Universitätsmedizin Berlin, und Univ.-Prof. Dr.-Ing. Georg Duda, Institutsdirektor des Julius Wolff Instituts für Biomechanik und Muskuloskeletale Regeneration der Charité Universitätsmedizin Berlin, für die Möglichkeit, diese Arbeit unter ihrer Schirmherrschaft durchführen zu können.

Für die exzellente Betreuung möchte ich mich ganz herzlich bei Dr. med. vet. Anne-Marie Pobloth, Frau PD Dr. rer. nat. Katharina Schmidt-Bleek und PD Dr. med. Dr. med. dent. Carsten Rendenbach bedanken. Ihr hattet immer ein offenes Ohr und einen guten Ratschlag parat, habt in mir die Faszination für die Grundlagenforschung geweckt und mich durch euren unerschütterlichen Optimismus beeindruckt. Vielen Dank für euer Vertrauen.

Während der Durchführung meiner Arbeit habe ich eng mit meinen Doktorbrüdern und auch mit den Tierärzten und Tierpflegern in Hamburg kooperiert. Für die gute Zusammenarbeit in Tierstall und Labor danke ich Dr. med. dent. Henri Kreiker und Christoph Leber, sowie für die tierärztliche und tierpflegerische Betreuung des Projekts und die Unterstützung in Hamburg Dr. med. vet. Aline Reitmeier, Dr. med. vet. Lena Brix und Jutta Dammann. Für die Hilfe bei der statistischen Auswertung möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. med. Dr. med. dent. Benedicta Beck-Broichsitter bedanken.

Besonders bedanken möchte ich mich bei den technischen Angestellten des Julius Wolff Instituts, hauptsächlich bei Sabine Stumpp, Marzena Princ und Mario Thiele, für die Hilfe bei allen methodischen Fragen rund um Histologie und Mikro-CT, für die moralische Unterstützung und die unterhaltsamen Stunden im Labor. Ihr wart immer da, wenn es darum ging, das Unmögliche möglich zu machen. Ohne euer Wissen und Können wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Vielen Dank auch an alle anderen JWI'ler, die durch ihre fachlichen Ratschläge, durch Korrekturlesen oder einfach durch ihre Gesellschaft bei einer Tasse Kaffee zum Entstehen dieser Arbeit beigetragen haben.

Für den Rückhalt und das Verständnis gilt mein Dank meiner Familie, meinen Freunden und ganz besonders meinem Mann Malte. Ihr habt mich durch die Zeit der Promotion begleitet und mit euren aufmunternden Worten, eurem Glauben an mich und euren Anregungen entscheidend zum Entstehen dieser Arbeit beigetragen. Euch an meiner Seite zu wissen ist ein großes Privileg, für das ich sehr dankbar bin.