

**Aus dem Institut für Tierpathologie des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin,
der Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie
und
dem Julius Wolff Institut
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin**

**Radiologischer und histomorphometrischer Vergleich
von Degradationsverhalten und Osseointegration
PEO-oberflächenmodifizierter und nichtoberflächenmodifizierter
ZX00-basierter Magnesiumimplantate:
eine *in vivo* Untersuchung nach 6, 12 und 18 Monaten im Minipig**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin**

**vorgelegt von
Christoph Joachim Leber
Tierarzt aus Bad Neustadt an der Saale**

**Berlin 2022
Journal-Nr.: 4355**

Aus dem Institut für Tierpathologie des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin,
der Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie
und
dem Julius Wolff Institut
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

**Radiologischer und histomorphometrischer Vergleich von Degradationsverhalten und
Osseointegration PEO-oberflächenmodifizierter und nichtoberflächenmodifizierter
ZX00-basierter Magnesiumimplantate:
eine *in vivo* Untersuchung nach 6, 12 und 18 Monaten im Minipig**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Christoph Joachim Leber

Tierarzt

aus Bad Neustadt an der Saale

Berlin 2022

Journal-Nr.: 4355

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Uwe Rösler
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Robert Klopffleisch
Zweiter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Dr. Max Heiland
Dritter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Johannes Handler

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

miniature pigs, bones, fractures, experimental surgery, surgical equipment, grafts,
grafting

Tag der Promotion: 06.10.2022

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <<https://dnb.de>> abrufbar.

ISBN: 978-3-96729-187-2

Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2022

Dissertation, Freie Universität Berlin

D188

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written authorization of the publisher.

Alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© Mensch und Buch Verlag 2022 Choriner Str. 85 - 10119 Berlin
verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

Meinen Liebsten

Alles ist ein Ganzes. Und wenn du etwas ganz fest willst, dann wird das gesamte Universum dazu beitragen, daß du es auch erreichst.

Paulo Coelho

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	V
Tabellenverzeichnis.....	VIII
Abkürzungsverzeichnis	IX
1 Einleitung.....	1
1.1 Hypothesen.....	3
1.2 Fragestellung und Zielsetzung der Dissertation.....	4
2 Literatur.....	7
2.1 Aufbau Schädelknochen und Knochenheilung	7
2.2 Osteosynthese	8
2.2.1 Titan.....	9
2.2.2 Resorbierbare Osteosynthesematerialien	11
2.2.2.1 Polymerbasierte Osteosynthesysteme	11
2.2.2.2 Magnesium im biologischen Organismus und in der Osteosynthese	12
2.3 Magnesiumlegierungen.....	14
2.3.1 Mechanische Eigenschaften.....	16
2.3.2 Biologische Verträglichkeit und Degradation	18
2.3.3 Bioaktivität	20
2.4 PEO-Oberflächenmodifikation	22
3 Material und Methoden	25
3.1 Studiendesign	25
3.1.1 Implantate	25
3.1.2 Versuchstiere	26
3.1.3 Haltung und Fütterung	26
3.1.4 Operation	27
3.1.5 Postoperatives Regime.....	30
3.1.6 Euthanasie.....	31
3.1.7 Entnahme der Knochenproben.....	32

3.1.8	Radiologische Auswertung	32
3.1.8.1	Erstellung der Micro-CTs	32
3.1.8.2	Vorbereitung für die Analyse der Micro-CTs	33
3.1.8.2.1	Erstellung der VOI zur Analyse des Residualvolumens	33
3.1.8.2.2	Erstellen der VOIs zur Analyse des umliegenden Knochens	36
3.1.8.2.3	Ermittlung der Thresholds für die Analyse der Micro-CT-Scans	39
3.1.8.2.4	Radiologische Referenzmessungen.....	42
3.1.8.2.5	Darstellung der VOIs als 3D-Projektion.....	43
3.1.9	Histomorphometrische Untersuchung	45
3.1.9.1	Vorbereitung der Proben	45
3.1.9.2	Fixierung, Entwässerung und Entfettung.....	45
3.1.9.3	Präinfiltration, Infiltration und Einbettung.....	46
3.1.9.4	Herstellung der Schriffe	48
3.1.9.5	Histomorphometrische Analyse	50
3.1.9.5.1	Vorbereitungen für die Analyse	50
3.1.9.5.1.1	Erstellung der ROI zur Quantifizierung des Knochenanteils.....	50
3.1.9.5.1.2	Erstellung der ROI zur Ermittlung der Residualfläche	52
3.1.9.5.1.3	Erfassung der unterschiedlichen Gewebe	52
3.1.9.5.2	Ermittlung des Referenzwertes für die Berechnung.....	53
3.1.9.5.3	Referenzmessung von Nativproben	53
3.2	Ausschluss von Proben	54
3.3	Statistik	56
4	Ergebnisteil.....	57
4.1	Untersuchung der Implantatresorption.....	57
4.1.1	Vergleich des Residualvolumens (SV/TV).....	57
4.1.2	Vergleich der Residualfläche (SA/TA)	59
4.1.3	Untersuchung des Residualvolumens (SV/TV) der Implantate zwischen den Untersuchungszeitpunkten	61

4.2	Untersuchung des dem Implantat anliegenden Knochens	63
4.2.1	Vergleich des Volumenanteils an mineralisiertem Knochen (BV/TV) in 2 Regionen um das Implantat zu jedem Untersuchungszeitpunkt.....	63
4.2.1.1	Vergleich des Volumenanteils an mineralisiertem Knochen (BV/TV) zwischen ursprünglicher Implantatgrenze und 0,5 mm Abstand	64
4.2.1.2	Vergleich des Volumenanteils an mineralisiertem Knochen (BV/TV) zwischen ursprünglicher Implantatgrenze und 1,5 mm Abstand	66
4.2.2	Vergleich des Flächenanteils an mineralisiertem Knochen (BA/TA) in 2 Regionen um das Implantat zu jedem Untersuchungszeitpunkt.....	68
4.2.2.1	Vergleich des Flächenanteils an mineralisiertem Knochen (BA/TA 0,5) zwischen ursprünglicher Implantatgrenze und 0,5 mm Abstand	69
4.2.2.2	Vergleich des Flächenanteils an mineralisiertem Knochen (BA/TA 1,5) zwischen ursprünglicher Implantatgrenze und 1,5 mm Abstand	71
4.2.3	Untersuchung des Volumenanteils an mineralisiertem Knochen (BV/TV) in 2 Regionen um das Implantat zwischen den Untersuchungszeitpunkten.....	73
4.2.3.1	Vergleich des Volumenanteils an mineralisiertem Knochen (BV/TV 0,5) zwischen den Entnahmezeitpunkten nach 6 Monaten und 18 Monaten für beide Schrauben	73
4.2.3.2	Vergleich des Volumenanteils an mineralisiertem Knochen (BV/TV 1,5) zwischen den Entnahmezeitpunkten nach 6 Monaten und 18 Monaten für beide Schrauben	75
5	Diskussion	77
5.1	Versuchsdurchführung.....	77
5.2	Untersuchung der Degradation.....	79
5.3	Untersuchung des Anteils an mineralisiertem Knochen um die Implantate.....	82
5.4	Schlussfolgerung und Ausblick	87
6	Zusammenfassung	89
7	Summary.....	91
8	Literaturverzeichnis	93
	Publikationsverzeichnis	XI
	Danksagung	XII

Inhaltsverzeichnis

Finanzierungsquellen	XIII
Interessenskonflikte.....	XIII
Selbstständigkeitserklärung	XIV

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 Mechanische Eigenschaften von Implantat und Gewebe	16
Abb. 2 Unbeschichtete CMF-Schraube	26
Abb. 3 PEO-beschichtete CMF-Schraube	26
Abb. 4 Exemplarische Übersicht der verschiedenen eingebrachten Implantate	28
Abb. 5 Inhomogene Knochendicke des <i>Os frontale</i>	29
Abb. 6 Heraustrennen des <i>Os frontale</i>	32
Abb. 7 Innenansicht des herausgetrennten <i>Os frontale</i>	32
Abb. 8 Entnommene Probe mit der Knochenstanze	32
Abb. 9 Micro-CT-Scan einer Probe im Längsquerschnitt	33
Abb. 10 Micro-CT-Scan einer nativen Schraube in Ausrichtung parallel zur Z-Achse	34
Abb. 11 Micro-CT-Scan einer nativen Schraube in Ausrichtung parallel zur Y-Achse	34
Abb. 12 Micro-CT-Scan im unteren Bereich einer nativen Schraube in Ausrichtung parallel zur Z-Achse	34
Abb. 13 Micro-CT-Scan einer beschichteten Schraube nach 12 Monaten Versuchszeit, Ausrichtung parallel zur Z-Achse im Bereich des Schraubenkopfes mit TORX (Schraubenmitnahmeprofil, auch Innensechsrund genannt)	34
Abb. 14 Micro-CT-Scan einer beschichteten Schraube nach 12 Monaten Versuchszeit, Ausrichtung parallel zur Z-Achse im mittleren Bereich der Schraube	34
Abb. 15 Micro-CT-Scan einer beschichteten Schraube nach 12 Monaten Versuchszeit, Ausrichtung parallel zur Z-Achse im Bereich der Schraubenspitze mit Kerbe rechtsseitig oben	34
Abb. 16 Micro-CT-Scan einer Probe nach 12 Monaten Versuchszeit, Standard-VOI im Bereich des Schraubenkopfes	35
Abb. 17 Micro-CT-Scan einer Probe nach 12 Monaten Versuchszeit, Standard-VOI im mittleren Teil der Schraube	35
Abb. 18 Micro-CT-Scan einer Probe nach 12 Monaten Versuchszeit, Standard-VOI im Bereich der Schraubenspitze mit befindlicher Kerbe rechtsseitig oben	35
Abb. 19 Knochenveränderungen im Micro-CT-Scan bis 1,5 mm um das ursprüngliche Implantat	36
Abb. 20 Knochenveränderungen im histologischen Bild bis circa 1,5 mm um das ursprüngliche Implantat	36
Abb. 21 VOI zur Auswertung des umliegenden Knochens ohne Berücksichtigung des <i>Sinus frontalis</i>	37

Abb. 22 Schematische Darstellung der VOI zur Auswertung des umliegenden Knochens ohne Berücksichtigung des <i>Sinus frontalis</i> im Längsquerschnitt	37
Abb. 23 VOI zur Auswertung des mineralisierten Knochenanteils bis 0,5 mm zur ursprünglichen Implantatgrenze	38
Abb. 24 Schematische Darstellung der VOI zur Auswertung des mineralisierten Knochenanteils bis 0,5 mm zur ursprünglichen Implantatgrenze im Längsquerschnitt	38
Abb. 25 VOI zur Auswertung des mineralisierten Knochenanteils bis 1,5 mm zur ursprünglichen Implantatgrenze	38
Abb. 26 Schematische Darstellung der VOI zur Auswertung des mineralisierten Knochenanteils bis 1,5 mm zur ursprünglichen Implantatgrenze im Längsquerschnitt	38
Abb. 27 Kontrolle des ermittelten Thresholdbereichs für die Quantifizierung der Schraube im mittleren Bereich der Schraube im Micro-CT-Scan	40
Abb. 28 Kontrolle des ermittelten Thresholdbereichs für die Quantifizierung der Schraube im unteren Bereich der Schraube im Micro-CT-Scan.....	40
Abb. 29 Kontrolle des ermittelten Thresholdbereichs für die Quantifizierung von mineralisierten Knochen im Micro-CT-Scan im mittleren Bereich der Schraube	41
Abb. 30 Kontrolle des ermittelten Thresholdbereichs für die Quantifizierung von mineralisierten Knochen im Micro-CT-Scan im unteren Bereich der Schraube	41
Abb. 31 3D-Rekonstruktionen des Implantatmaterials innerhalb der VOI RoiSet1x	43
Abb. 32 3D-Rekonstruktionen des mineralisierten Knochens innerhalb der VOIs Roi-TT-0,5-V als Querschnitt	44
Abb. 33 3D-Rekonstruktionen des mineralisierten Knochens innerhalb der VOIs Roi-TT-1,5-V als Querschnitt	44
Abb. 34 Knochenprobe im Einbettmedium	47
Abb. 35 Fertig ausgehärtete Probe	47
Abb. 36 Im Hartschnittmikrotom eingespannter Block	47
Abb. 37 Fertig geklebtes „Sandwich“	48
Abb. 38 Die Bandsäge beim Absägen	49
Abb. 39 Anätzen der Schriffe mit 1%iger Ameisensäure für eine Minute	49
Abb. 40 Arbeitsplatz für die Färbung der Schriffe	49
Abb. 41 Native Schraube im Querschnitt	50
Abb. 42 Standard-ROI	50
Abb. 43 Histologische Auswertungsbereiche vor der Korrektur	51
Abb. 44 Histologische Auswertungsbereiche nach der Korrektur	51

Abb. 45 Histomorphometrisch erfasste Gewebe innerhalb der ROIs in verschiedenen Farben	52
Abb. 46 Jiggered dot plot für den Parameter SV/TV	57
Abb. 47 3D-Darstellung des noch nicht resorbierten Implantatmaterials nach 18 Monaten ..	58
Abb. 48 Jiggered dot plot für den Parameter SA/TA	59
Abb. 49 Histologisch aufgearbeitetes unbeschichtetes Implantat (SA/TA 33,75%) zum Untersuchungszeitpunkt nach 12 Monaten	60
Abb. 50 Histologisch aufgearbeitetes beschichtetes Implantat (SA/TA 57,46%) zum Untersuchungszeitpunkt nach 12 Monaten	60
Abb. 51 Jiggered dot plot für den Parameter SV/TV zwischen den Untersuchungszeitpunkten der jeweiligen Schraube	61
Abb. 52 Jiggered dot plot für den Parameter BV/TV 0,5	64
Abb. 53 3D-Darstellung des Knochens im Abstand von 0,5 mm	65
Abb. 54 Jiggered dot plot für den Parameter BV/TV 1,5	66
Abb. 55 3D-Darstellung des Knochens im Abstand von 1,5 mm	67
Abb. 56 Jiggered dot plot für den Parameter BA/TA 0,5	69
Abb. 57 Histologisch aufbereitete Proben nach 18 Monaten Implantationszeit	70
Abb. 58 Jiggered dot plot für den Parameter BA/TA 1,5	71
Abb. 59 Zwei Schliffe nach der histomorphometrischen Analyse	72
Abb. 60 Jiggered dot plot für den Parameter BV/TV 0,5 zwischen den Untersuchungszeitpunkten der jeweiligen Schraube	73
Abb. 61 Jiggered dot plot für den Parameter BV/TV 1,5 zwischen den Untersuchungszeitpunkten der jeweiligen Schraube	75

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Tabelle mit Auflistung der Versuchstiere	27
Tabelle 2 Tabelle über die Implantationsdauer mit den Daten der Versuchstiere.....	29
Tabelle 3 Postoperative Komplikationen und Behandlung.....	30
Tabelle 4 Treshold Luft-Schraube/ Knochen.....	39
Tabelle 5 Threshold Schraube-Knochen.....	40
Tabelle 6 Quantifizierung des Residualvolumens der beiden nativen Schrauben	42
Tabelle 7 Ergebnis der Analyse des Knochenanteils von 6 Nativproben in beiden Auswertungsbereichen.....	42
Tabelle 8 Entwässerungsschema der Proben.....	45
Tabelle 9 Färbeschema der Schlifflinien.....	50
Tabelle 10 Ergebnis des Flächenanteils an mineralisierten Knochen in den Auswertungsbereichen BA/TA 0,5 und BA/TA 1,5 von 6 Nativproben	53
Tabelle 11 Entnommene Proben und davon auswertbare Proben im Micro-CT	54
Tabelle 12 Entnommene Proben und davon auswertbare Proben in der Histomorphometrie	55
Tabelle 13 Histomorphometrische Bilder der ausgeschlossenen Proben.....	55
Tabelle 14 Modellvorhersage für das Residualvolumen (SV/TV).....	58
Tabelle 15 Modellvorhersage für die Residualflächen (SA/TA).....	60
Tabelle 16 Modellvorhersage für das Residualvolumen zwischen den Untersuchungszeitpunkten nach 6 und 18 Monaten	62
Tabelle 17 Modellvorhersage für den Parameter BV/TV 0,5.....	65
Tabelle 18 Modellvorhersage für den Parameter BV/TV 1,5.....	67
Tabelle 19 Modellvorhersage für den Parameter BA/TA 0,5.....	70
Tabelle 20 Modellvorhersage für den Parameter BA/TA 1,5.....	72
Tabelle 21 Modellvorhersage für den Parameter BV/TV 0,5 zwischen den Untersuchungszeitpunkten nach 6 und 18 Monaten	74
Tabelle 22 Modellvorhersage für den Parameter BV/TV 1,5 zwischen den Untersuchungszeitpunkten nach 6 und 18 Monaten	76

Abkürzungsverzeichnis

AO	Arbeitsgemeinschaft für Osteosynthesefragen
BA	bone area
BV	bone volume
Ca-P	Kalzium-Phosphat
CMF	craniomaxillofacial
CMFB	PEO-beschichtete CMF-Schraube
CMFU	PEO-unbeschichtete CMF-Schraube
CT	Computertomographie
GFRC	glass fibre reinforced composite
H ₂ O	Wasser
hBMSC	human bone marrow-derived mesenchymal stem cells
HIF-2 α	hypoxia-Inducible Factor 2-alpha
KGW	Körpergewicht
Mg	Magnesium
Mg(OH) ₂	Magnesiumhydroxid
MgO	Magnesiumoxid
Micro-CT	Mikrofokus Computertomographie
MRT	Magnetresonanztomographie
PEO	Plasmaelektrolytische Oxidation
PGA	polyglykolic acid
PLLA	L-Isomerform von Polyester Polylactid
PGC-1 α	peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha
PMMA	Polymethylmethacrylat
ROI	region of interest
SA	screw area
SV	screw volume
TA	total area
TV	total volume
VEGF	vascular endothelial growth factor
VOI	volume of interest
ZX00	Legierung auf Magnesiumbasis

1 Einleitung

Die gestiegene Zahl an Kopf- und Gesichtsverletzungen in den letzten Jahrzehnten bei Menschen geht mehrheitlich auf die höhere Dichte des Straßenverkehrs, die gestiegene Anzahl an Freizeitaktivitäten und aggressiver ausgetragene zwischenmenschliche Konflikte zurück (HORCH 2006, SCHUBERT 2007). Auch Unfälle mit neuartigen Verkehrsmitteln wie E-Scootern führen vor allem zu Verletzungen in diesem Bereich sowie der oberen Extremitäten (KLEINERTZ et al. 2021). In der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie werden zur Reposition von Frakturen unter anderem Mini- und Mikroplatten verwendet, um eine schnelle Heilung zu ermöglichen (SIEWERT und BRAUER 2007). Die Frakturversorgung mittels Mini- und Mikroplattensystemen aus Titan gilt als therapeutischer Goldstandard (ARVIANA et al. 2018, KOERDT et al. 2020). Das Implantationsmaterial besitzt genügend Stabilität für den Einsatz in lasttragenden Bereichen (BANERJEE et al. 2019), es besteht jedoch ein deutlicher Unterschied des Elastizitätsmoduls (E-Modul) gegenüber dem des Knochens, was in Stress-shielding resultieren kann (GRIMM 2002, BANERJEE et al. 2019). Unter Stress-shielding versteht man eine Osteopenie, die durch eine zu starre Frakturüberbrückung entstehen kann (SUMITOMO et al. 2008, KENNADY et al. 1989, PAAVOLAINEN et al. 1978). In der pädiatrischen Medizin können nicht resorbierbare Implantate zu Wachstumseinschränkungen des Knochens führen (YERIT et al. 2005) und das Implantationsmaterial kann in den wachsenden Schädelknochen translozieren, sodass histologische Veränderungen des Gehirns als mögliche Folge beschrieben sind (YU et al. 1996). Deshalb wird die Entfernung der Implantate bei diesen Patienten empfohlen (O'CONNELL et al. 2009). Beim Einbringen (FRISKEN et al. 2002) sowie durch Lockerung und Abnutzung der Titanimplantate kann es zu einem Partikelabrieb kommen, welcher intrazelluläre Anomalien verursachen kann (CASE et al. 1994). Nach erfolgreicher Heilung wird die routinemäßige Entfernung von asymptomatischen, nicht resorbierbaren Osteosyntheseimplantaten kontrovers diskutiert (THORÉN et al. 2008, YU et al. 2019), kann aber aus ästhetischen Gründen im Gesichtsbereich oder bei auftretenden Komplikationen wie Infektionen, weichgewebiger Plattenexposition, Schmerzen, Materiallockerung, anhaltenden Sensibilitätsstörungen oder Fremdkörpergefühl notwendig sein (HERNANDEZ ROSA et al. 2016, PAN und PATIL 2014, ORRINGER et al. 1998). Mit resorbierbaren Osteosynthesystemen ist es möglich, auf eine neuerliche Operation zur Materialentfernung und den damit verbundenen Morbiditätsrisiken zu verzichten (ORRINGER et al. 1998, PAN und PATIL 2014). Ferner können durch die Verwendung von resorbierbaren Implantaten Artefakte bei Bildgebungsmodalitäten wie CT und MRT bei postoperativen Verlaufskontrollen verringert werden (RENDENBACH et al. 2018).

Resorbierbare Polymerimplantate weisen eine niedrigere Festigkeit und ein niedrigeres E-Modul als kortikaler Knochen auf (LUTHRINGER et al. 2014, ZHAO et al. 2017a), was ihre Nutzung auf nichtlasttragende Bereiche limitiert (WILTFANG 2002, GRÜN et al. 2018a). Die Abbaugeschwindigkeit des Polymers hängt im Wesentlichen von dessen Zusammensetzung ab, sodass Implantate aus Polyhydroxyessigsäure (PGA) ihre gesamte Masse innerhalb von 6 bis 12 Monaten verlieren können (PIETRZAK et al. 1997). Im Gegensatz dazu kann von Implantaten aus der L-Isomerform von Polyester Polylactid (PLLA) nach über 5 Jahren noch Implantationsmaterial vorhanden sein (SUURONEN et al. 1998). Bei der Verwendung von Polymerimplantaten zählen chronische Fremdkörperreaktionen teilweise auch Jahre nach der Implantation zu den häufigsten Komplikationen (BERGSMA 1995, BÖSTMAN und PIHLAJAMÄKI 2000a, BÖSTMAN und PIHLAJAMÄKI 2000b).

Magnesiumimplantate können im Gegensatz zu Polymerimplantaten über eine höhere Bruchkraft verfügen, was in einer höheren mechanischen Belastbarkeit resultiert (EZECHIELI et al. 2016, BANERJEE et al. 2019). Deshalb können Magnesiumimplantate bei geringerer Implantatgröße gegenüber Polymerimplantaten verbesserte mechanische Eigenschaften für die Verwendung in lasttragenden und mechanisch beanspruchten Regionen besitzen (EZECHIELI et al. 2016, SCHALLER et al. 2018, BANERJEE et al. 2019). Durch ähnliche mechanische Eigenschaften wie kortikaler Knochen können magnesiumbasierte Implantate ausreichend Stabilität bieten und gleichzeitig das Auftreten des Stress-shieldings deutlich verringern (BANERJEE et al. 2019).

Bei *in vitro* und *in vivo* Versuchen von Magnesiumimplantaten wurden weder lokale noch systemische pathologische Reaktionen beschrieben, was auf eine gute biologische Verträglichkeit hinweist (XU et al. 2007, LI et al. 2008, ZHANG et al. 2009, CASTELLANI et al. 2011, WINDHAGEN et al. 2013, CHOU et al. 2013, WAIZY et al. 2014, EZECHIELI et al. 2014, DIEKMANN et al. 2016, BIBER et al. 2016, SCHALLER et al. 2018, NAUJOKAT et al. 2017, JUNG et al. 2019).

Das größte Problem für den routinemäßigen Einsatz in der Mund-, Kiefer-, Gesichtschirurgie stellt die Freisetzung von Gas während des Degradationsprozesses der Magnesiumimplantate dar, was zu subkutanen und intraossären Gasansammlungen führen kann (REIFENRATH et al. 2010, SCHALLER et al. 2016a, SCHALLER et al. 2017, NAUJOKAT et al. 2017, SCHALLER et al. 2016b, WITTE et al. 2005, IMWINKELRIED et al. 2013, DIEKMANN et al. 2016, CHAYA et al. 2015b). Durch zu schnelle Korrosion besteht somit die Möglichkeit, dass die mechanische Integrität beeinträchtigt wird, bevor eine suffiziente Heilung erfolgt ist (STAIGER et al. 2006, ZHAO et al. 2017a).

Durch Oberflächenmodifikation und Beschichtung sowie durch die Verwendung von Magnesiumlegierungen lässt sich Einfluss auf die mechanischen Eigenschaften nehmen und das Degradationsverhalten verlangsamen (ZHENG et al. 2014, GU et al. 2014). Somit

konnten bereits die ersten Implantate aus Magnesiumlegierungen erfolgreich beim Menschen eingesetzt werden (BIBER et al. 2016, HOLWEG et al. 2020b). Bei Magnesiumimplantaten der Legierung WE43 kann die Modifikation der Oberfläche durch plasmaelektrolytische Oxidation (PEO) über den Zeitraum von bis zu 12 Monaten eine Verlangsamung der Degradation und eine Verbesserung der Osseointegration bewirken (IMWINKELRIED et al. 2013, SCHALLER et al. 2016a, SCHALLER et al. 2017, RENDENBACH et al. 2021). Bei der Verwendung von nichtoberflächenmodifizierten ZX00-Magnesiumlegierungen, welche keine Seltenen Erden enthalten, wurden bereits vielversprechende mechanische Eigenschaften und klinische Ergebnisse beschrieben (GRÜN et al. 2018b, HOLWEG et al. 2020b, HOFSTETTER 2015a), welche durch PEO-Oberflächenmodifikation noch weiter verbessert werden könnten.

Um weitere Erkenntnisse zur ZX00-Legierung und der PEO-Oberflächenmodifikation für den unbedenklichen klinischen Einsatz im kraniofazialen Bereich zu gewinnen, werden in dieser Studie erstmalig ZX00-Schrauben mit und ohne PEO-Oberflächenmodifikation im Langzeitversuch über 6, 12 und 18 Monaten in Göttinger Minipigs verwendet. Es wird evaluiert, ob die PEO-Beschichtung bei ZX00-Implantaten erfolgreich die Degradation und die damit verbundene Gasfreisetzung verlangsamt. Dadurch könnte es zu einer verbesserten Reaktion des Knochens auf das degradierende Implantat im Sinne von weniger Hohlräumen in dem am Implantat anliegenden Knochen kommen. Ziel ist es, das Degradationsverhalten sowie die Reaktion des Schädelknochens auf die Degradation von PEO-modifizierten und nichtoberflächenmodifizierten ZX00-Magnesiumschrauben im Großtiermodell zu vergleichen.

1.1 Hypothesen

Für die PEO-beschichteten und unbeschichteten ZX00-Implantate nach 6, 12 und 18 Monaten Implantationszeit ergeben sich daraus folgende Hypothesen:

1. PEO-oberflächenmodifizierte ZX00-Magnesiumimplantate degradieren im Göttinger Minipig über einen Zeitraum von 6, 12 und 18 Monaten langsamer als nicht-oberflächenmodifizierte ZX00-Magnesiumimplantate.
 - a) Gemessen an einem höheren Residualvolumen (SV/TV) der PEO-modifizierten Implantate nach 6,12 und 18 Monaten im Micro-CT.
 - b) Gemessen an einer höheren Residualfläche (SA/TA) der PEO-modifizierten Implantate nach 6,12 und 18 Monaten in der Histomorphometrie.
 - c) Gemessen an einem geringeren Unterschied des Residualvolumens (SV/TV) der PEO-modifizierten Implantate zwischen 6 und 18 Monaten im Micro-CT.

2. Die langsamere Degradation von PEO-oberflächenmodifizierten ZX00-Magnesiumimplantaten im Göttinger Minipig über einen Zeitraum von 6, 12 und 18 Monaten verzögert die Gasbildung und reduziert die Entstehung von Hohlräumen um das Implantat im Vergleich zu nichtoberflächenmodifizierten ZX00-Magnesiumimplantaten. Dies führt zu einem höheren Knochenanteil um die Implantate.

- a) Gemessen als höherer Volumenanteil an mineralisiertem Knochen (BV/TV) in zwei Regionen (0,5 und 1,5 mm) um die PEO-modifizierten Implantate zu jedem Untersuchungszeitpunkt im Micro-CT.
- b) Gemessen als höherer Flächenanteil an mineralisiertem Knochen (BA/TA) in zwei Regionen (0,5 und 1,5 mm) um die PEO-modifizierten Implantate zu jedem Untersuchungszeitpunkt in der Histomorphometrie.
- c) Gemessen als größerer Volumenanteil an mineralisiertem Knochen (BV/TV) nach 18 Monaten als nach 6 Monaten in zwei Regionen (0,5 und 1,5 mm) um die PEO-modifizierten Implantate im Micro-CT.

1.2 Fragestellung und Zielsetzung der Dissertation

Damit resorbierbare Magnesiumimplantate routinemäßig klinisch etabliert und ihre geeigneten mechanischen und osteostimulativen Effekte genutzt werden können, muss das während der Degradation freigesetzte Gas und die Alkalisierung des Gewebes kontrolliert werden. Da die Reaktion des Körpers auf Implantate durch *in vitro* Versuche nicht vollständig widerspiegelt werden kann, ist es von großer Bedeutung, dass diese Materialien *in vivo* getestet werden (WITTE et al. 2008, SANCHEZ et al. 2015). Aktuelle Studien zur Magnesiumlegierung ZX00 weisen auf ein vielversprechendes Verhalten *in vivo* hin (GRÜN et al. 2018b, HOLWEG et al. 2020a, HOLWEG et al. 2020b), welches durch PEO-Modifikation noch weiter verbessert werden könnte.

Um die Unbedenklichkeit für den routinemäßigen klinischen Einsatz zu gewährleisten, ist es wichtig, das Degradationsverhalten und die Reaktion des Knochens über die bisher untersuchten Zeiträume hinaus zu evaluieren.

Dies ist nach bestem Wissen die erste Studie, die das Degradationsverhalten sowie die Reaktion des dem Implantat umgebenden Knochens von ZX00-Magnesiumschrauben mit und ohne PEO-Oberflächenmodifikation im Großtierversuch über den Zeitraum von 6, 12 und 18 Monaten untersucht.

Das in dieser Studie verwendete Göttinger Minipig stellt auf Grund seiner menschenähnlichen Anatomie, Physiologie, Knochenstruktur und Knochenumbauprozesse ein geeignetes Tiermodell für die Untersuchung derartiger Implantatmaterialien dar (SWINDLE et al. 2012, ŠTEMBÍREK et al. 2012, SCHLEGEL et al. 2009, PEARCE et al.

2007, WANG et al. 2007). Bei der Micro-CT-Untersuchung kann anhand dreidimensionaler Messungen die Berechnung des noch vorhandenen Volumenanteils des Implantats erfolgen. In der histologischen Untersuchung kann der noch nicht resorbierte Anteil mittels der noch vorhandenen Querschnittsfläche des Implantats errechnet werden. So kann das Degradationsverhalten der ZX00-Magnesiumschrauben und der Einfluss der PEO-Beschichtung untersucht werden. Ebenfalls kann mit beiden Methoden der um das Implantat liegende Knochen analysiert und die Anteile an mineralisierten Knochen in VOIs (Volumes of Interest) im Micro-CT und ROIs (Regions of Interest) in der Histomorphometrie errechnet werden, um die Knochenreaktion auf das während der Degradation frei werdende Gas zu untersuchen.

Anhand der aktuellen wissenschaftlichen Erkenntnisse setzt sich diese Dissertation erstmalig mit folgenden Fragen auseinander:

- Degradieren PEO-beschichtete ZX00-Magnesiumimplantate über den Implantationszeitraum von 6, 12 und 18 Monaten im Minipig langsamer als unbeschichtete ZX00-Implantate?
- Führt die PEO-Beschichtung der ZX00-Magnesiumimplantate gegenüber unbeschichteten ZX00-Magnesiumimplantaten zu einem höheren Anteil an mineralisierten Knochen um die Implantate nach 6, 12 und 18 Monaten Untersuchungszeit im Minipig?

2 Literatur

2.1 Aufbau Schädelknochen und Knochenheilung

Knochen erfüllen neben wichtigen Stoffwechsellleistungen auch die Schutz- und Stützfunktionen des Skeletts (LIEBICH 2004, KÖNIG und LIEBICH 2005). Dies wird durch die Kombination von Zellen und extrazellulärer Matrix sowie der Zusammensetzung aus organischem und anorganischem Material möglich (HOHMANN 2015). Ein Drittel der Trockensubstanz besteht aus organischem Material, überwiegend aus Kollagenfasern Typ I, in geringeren Anteilen auch Fetten und Kohlenhydraten. Die noch nicht mineralisierte Grundsubstanz der Knochenmatrix wird als Osteoid bezeichnet und besteht aus Proteoglykanen, Glykosaminoglykanen, Chondroitinsulfaten, Kollagenfasern, Keratansulfaten, Plasmaproteinen, Wachstumsfaktoren, Osteonectin und Osteocalcin (HOHMANN 2015, LIEBICH 2004). Bei der Mineralisierung werden die anorganischen Materialanteile, welche überwiegend aus Kalziumphosphat, Kalziumkarbonat, Magnesiumphosphat und Kalziumfluorid bestehen (HOHMANN 2015, LIEBICH 2004) und den übrigen Anteil an Trockensubstanz bilden, in das Osteoid eingelagert (KÖNIG und LIEBICH 2005). Kalziumphosphatverbindungen umgeben dabei als Hydroxylapatit appositionell die Kollagenfasern als kristalline Raumgitter (LIEBICH 2004). Dadurch erhält der Knochen Stabilität (LIEBICH 2004) und durch die enthaltenen Kollagenfasern Elastizität gegenüber Spannungen (HOHMANN 2015, LIEBICH 2004, KÖNIG und LIEBICH 2005).

Die Knochenbildung kann im Wesentlichen auf zwei verschiedene Weisen erfolgen: durch chondrale Ossifikation, bei der sich mesenchymale Zellen über Knorpelzellen zu Knochenzellen differenzieren, welche deshalb auch indirekte Ossifikation genannt wird oder durch desmale Ossifikation (direkte Ossifikation), bei der eine direkte Differenzierung von Mesenchymzellen zu Osteoblasten stattfindet, welche Kollagenfasern und Osteoid produzieren (LIEBICH 2004, SALOMON und ACHILLES 2008, KÖNIG und LIEBICH 2005). Osteoid wird durch Mineralisierung zu verkalktem Ossein, welches schließlich die Osteoblasten einschließt, die dann zu Osteozyten differenzieren (LIEBICH 2004, KÖNIG und LIEBICH 2005, SALOMON und ACHILLES 2008). Durch beide Ossifikationen kann Geflechtknochen entstehen, welcher sich weiter zu Lamellenknochen entwickeln kann (SCHNORR und KRESSIN 2006). Letztgenannter erhält den Namen durch die parallel angeordneten Kollagenfasern und bildet die Grundlage für die platten Knochen, wie das *Os frontale* (LIEBICH 2004, KÖNIG und LIEBICH 2005, SCHNORR und KRESSIN 2006).

Ossa plana (platte Knochen) setzen sich aus der *Tabula externa* und *interna*, zwei dichte Knochenplatten sowie einer dazwischenliegenden *Diploe*, einer mit Hohlräumen enthaltenen Spongiosa, zusammen oder enthalten dazwischen eine pneumatisierte Höhle und bilden

somit einen *Sinus* (GROSSER 1950, LIEBICH 2004, KÖNIG und LIEBICH 2005, SALOMON und ACHILLES 2008). So enthält zum Beispiel das *Os frontale* die *Sinus frontalis*. Es bildet kranial mit der *Squama frontalis* die Stirn, seitlich Teile der Augenhöhle und ist an der Begrenzung des Nasenskeletts beteiligt (SCHMITZ und BLEY 2015, BOMMAS-EBERT et al. 2006, SALOMON und ACHILLES 2008). Bei Frakturen werden die primäre und sekundäre Knochenheilung unterschieden (SALOMON und ACHILLES 2008). Die primäre (direkte) Knochenheilung setzt voraus, dass die Fraktarenden nicht weiter als 1 mm auseinanderliegen und optimal zueinanderstehen (LÜLLMANN-RAUCH und ASAN 2019). Die direkte Überbrückung des Frakturspalts durch Bildung von Lamellenknochen wird als Kontaktheilung bezeichnet. Bildet sich über Gefäßeinsprossung zunächst Geflechtknochen, der im weiteren Verlauf durch Lamellenknochen ersetzt wird, spricht man von Spaltheilung (SALOMON und ACHILLES 2008). Heilt Knochen sekundär, kommt es über eine aseptische Entzündungsreaktion zur Rekrutierung mesenchymaler Stammzellen und zur Bildung eines primären faserknorpeligen Kallusgewebes im Frakturspalt, welches durch Umbauprozesse und Mineralisierung zunächst zu Geflecht- und schließlich Lamellenknochen umgebaut wird (SALOMON und ACHILLES 2008, KÖNIG und LIEBICH 2005, MARSELL und EINHORN 2011).

2.2 Osteosynthese

Um die Voraussetzung für eine primäre Knochenheilung zu ermöglichen, werden die Fraktarenden direkt aufeinander stehend unter Kompression mithilfe von Osteosynthesystemen wie Schrauben, Drähten oder Platten fixiert (SALOMON und ACHILLES 2008, SIEWERT und BRAUER 2007).

Die Plattenosteosynthese mit Mikro- oder Miniplattensystemen aus Titan ist der Goldstandard in der Behandlung von Mittelgesichtsfrakturen (ARVIANA et al. 2018, KOERDT et al. 2020). Durch die interne Fixierung der Knochenfragmente nach anatomischer Reposition kann bei den Patienten auf eine Fixation des Ober- und Unterkiefers für 6 bis 8 Wochen, wie bei der konservativen Therapie, verzichtet werden (HORCH 2006). Die Osteosynthesysteme besitzen eine hohe Primärstabilität und individuelle dreidimensionale Anpassungsfähigkeit (GILARDINO et al. 2009). Sie können somit die grundlegenden Prinzipien des Frakturmanagements der Arbeitsgemeinschaft für Osteosynthese (AO) erfüllen, welche die Frakturposition, die stabile Frakturfixierung, die Erhaltung der Blutzufuhr und eine frühzeitige und sichere Mobilisation beinhalten (BUCKLEY et al. 2017). Dadurch kann eine anatomisch korrekte Heilung der Gesichtskonturen gewährleistet werden (SCHUBERT 2007). Speziell in der frontalen, supraorbitalen und nasoorbitalen Ethmoidregion haben Miniplatten den Vorteil, dass sie durch die dünne Hautoberfläche

weniger prominent und sichtbar sind, aber stark genug, um die Frakturen zu stabilisieren (FRANCEL et al. 1992).

Die routinemäßige Entfernung von nicht resorbierbaren Osteosyntheseimplantaten nach erfolgreicher Heilung wird kontrovers diskutiert (THORÉN et al. 2008, YU et al. 2019). So ist sie bei asymptomatischen Platten nicht indiziert, kann aber beim Auftreten von Langzeitkomplikationen notwendig werden (THORÉN et al. 2008, YU et al. 2019). Eine klinische Verlaufskontrolle, gegebenenfalls auch nach längerem Intervall, sind daher mitunter erforderlich (THORÉN et al. 2008, YU et al. 2019).

Einen Vorteil könnten in dieser Hinsicht resorbierbare Implantate bieten. Das ideale biologisch abbaubare Material sollte ausreichend Stabilität, eine angemessene Abbaurate, eine ausgezeichnete Hämkompatibilität und Biokompatibilität aufweisen (CHEN et al. 2014). Nach dem Einbringen der Implantate sollte im besten Fall ein direkter Kontakt zwischen Knochen und Implantat ohne eine Bindegewebsschicht hergestellt werden (ZHANG et al. 2009).

2.2.1 Titan

Titan-Osteosynthesesysteme sind signifikant stärker und steifer als polymerbasierte Systeme (BUIJS et al. 2007). Durch die mechanischen Eigenschaften ist es möglich, Platten von geringerer Materialstärke zu verwenden (SCHUMANN et al. 2013). Sie sind korrosionsbeständig (SOLAR et al. 1979) und können eine sehr gute Osseointegration aufweisen (ACERO et al. 1999).

Durch die mechanischen Eigenschaften der Titanplatten, insbesondere eines deutlich höheren Elastizitätsmoduls (E-Modul) und einer höheren Steifigkeit gegenüber dem des kortikalen Knochens, kann es zu einem Stress-shielding-Effekt kommen (GRIMM 2002, BANERJEE et al. 2019), was in einer Atrophie des darunter liegenden Knochens resultieren und zur Entwicklung von Resorptionshohlräumen führen kann (PAAVOLAINEN et al. 1978, SUMITOMO et al. 2008). Stress-Shielding kann zu einer erheblichen Abnahme der Knochenfestigkeit führen, wohingegen weniger starre Platten gemäß des Wolff'schen Gesetzes der funktionalen Wiederherstellung die Reaktion des Knochengewebes auf natürliche Weise beeinflussen können und dies zu einem Zuwachs an kortikalem Knochen führen kann (SUMITOMO et al. 2008, WOLFF 1892, KENNADY et al. 1989).

Die Entfernung des nicht resorbierbaren Materials wird nicht nur wegen eines möglichen Stress-shielding-Effekts durchgeführt, sondern auch aus ästhetischen Gründen insbesondere im Gesichtsbereich (ALPERT und SELIGSON 1996) und um Artefakte bei bildgebenden Verfahren im Heilungsverlauf zu vermeiden (RENDENBACH et al. 2018). Ferner zählen Infektionen, weichgewebige Plattenexposition, Schmerzen, Materiallockerung, anhaltende Sensibilitätsstörungen oder Fremdkörpergefühl zu den Ursachen für eine

Materialentfernung (PAN und PATIL 2014, ORRINGER et al. 1998). Derartige Folgeeingriffe sind wiederum mit Kosten und einem neuerlichen Morbiditätsrisiko verbunden (ORRINGER et al. 1998, PAN und PATIL 2014). Allerdings wird bei pädiatrischen Behandlungen die routinemäßige Entfernung bereits von einige Chirurgen durchgeführt (O'CONNELL et al. 2009), da im wachsenden kraniofazialen Skelett Mikroplattensysteme intrakraniell zwischen innere und äußere Kortikalis translozieren können und dies zu mikroskopischen Veränderungen der Hirnhäute und des Gehirns führen kann (YU et al. 1996). Des Weiteren können verbleibende Platten zu Wachstumseinschränkungen und Stress-shielding im wachsenden Skelett führen und sollten daher bei diesen Patienten entfernt werden (O'CONNELL et al. 2009, KATOU et al. 1996, YERIT et al. 2005).

Sowohl beim Einbringen der Metallimplantate (FRISKEN et al. 2002), als auch durch Lockerung und Abnutzung kann es zu einem Partikelabrieb kommen (CASE et al. 1994). Diese können intrazelluläre Anomalien verursachen, als allergische Sensibilisatoren wirken, zu Gewebeveränderungen führen und in Lymphknoten, Knochenmark, Leber und Milz nachgewiesen werden (CASE et al. 1994, MOBERG et al. 1989). Es wurde beschrieben, dass sie in Lymphknoten, je nach Konzentration, zur Nekrose führen können und daher auch von einer schädlichen Wirkung auf die Organe ausgegangen werden kann (CASE et al. 1994).

Die Titanpartikel können Makrophagen aktivieren, woraufhin proinflammatorische Zytokine freigesetzt werden, die zu einer chronischen Entzündung und einer faserigen Verkapselung führen können (KATOU et al. 1996, HAYNES et al. 1998). Die chronische Exposition von Knochenmarkszellen gegenüber Titanpartikeln kann zu einer verminderten Knochenbildung an der Knochen-Implantat-Grenze führen (WANG et al. 2002). Abriebpartikel der Metallimplantate können die Zytokinexpression modulieren, sodass eine Zunahme an knochenresorbierenden und eine Abnahme an knochenbildenden Zytokinen beschrieben wurde (WANG 1996). Durch die Titanpartikel kann es so zu einer Knochenresorption durch Induktion der Osteoklastendifferenzierung kommen (BI et al. 2001).

Bei der postoperativen bildgebenden Diagnostik können Artefakte durch Interferenzen aufgrund höherer magnetischen Suszeptibilitätswerte zum umgebenden Gewebe auftreten (LEE et al. 2007, SMEETS et al. 2017, HARGREAVES et al. 2011). Resorbierbare Implantate können im Vergleich zu nicht resorbierbaren Titanimplantaten weniger Artefakte verursachen, was insbesondere bei postoperativen Verlaufskontrollen die Beurteilung der Bildgebung hinsichtlich implantatassoziierter Komplikationen, aber auch bei Tumornachsorgen vereinfachen kann (RENDENBACH et al. 2018).

2.2.2 Resorbierbare Osteosynthesematerialien

2.2.2.1 Polymerbasierte Osteosynthesysteme

Mit resorbierbaren Osteosynthesematerialien kann auf eine Materialentfernung mit den damit verbundenen Risiken verzichtet werden (ASHAMMAKHI und ROKKANEN 1997, BIBER et al. 2016). Beim klinischen Einsatz von resorbierbaren Implantaten in der pädiatrischen kraniofazialen Chirurgie können Komplikationen von nicht resorbierbaren Implantaten vermieden werden und somit eine überlegende Option darstellen (AHMAD et al. 2008, HAYDEN GEPHART et al. 2013). Bei röntgentransparenten und nicht magnetischen polymeren Materialien treten weniger Interferenzen bei Bildgebungsmodalitäten wie Computertomographie und Magnetresonanztomographie auf (DOROZHKIN 2009, SHELLOCK et al. 1992, RENDENBACH et al. 2018).

Bioresorbierbare Polymere bestehen hauptsächlich aus hochmolekularen aliphatischen Polyestern mit wiederkehrenden Einheiten von α -Hydroxysäurederivaten, die durch Ringöffnungspolymerisation hergestellt werden (DOROZHKIN 2009, SCHUMANN et al. 2013, zitiert nach HASTINGS und DUCHEYNE 1984).

Aus Glykolsäure, welche auch während des normalen Körperstoffwechsels produziert wird, können beispielsweise durch diese Reaktion Polymerimplantate aus Polyglykolsäure (PGA) hergestellt werden (ASHAMMAKHI und ROKKANEN 1997).

Die Abbaugeschwindigkeit eines bioresorbierbaren Polymers wird vor allem durch seinen hydrophil-hydrophoben Charakter und seine Mikrostruktur beeinflusst (PIETRZAK et al. 1997).

Die Mikrostruktur eines Polymers bezieht sich darauf, ob es amorph oder kristallin ist (COX et al. 2005). Amorphe Mikrostruktur bedeutet, dass die Polymerketten zufällig zueinander ausgerichtet sind (PIETRZAK et al. 1997). Kristalline Bereiche implizieren einen geordneten Zustand, in dem die benachbarten Ketten parallel und eng beieinander liegen (PIETRZAK et al. 1997). Da Polymerkristalle sehr dicht und stabil sind, erhöht eine Erhöhung des Kristallinitätsgrades die Festigkeit (PIETRZAK et al. 1997).

Die Absorption dieser Polymere beginnt *in vivo* mit der Depolymerisation durch Hydrolyse ihrer Esterbindungen, wobei die Wassermoleküle die chemischen Bindungen der Polymere hydrolysieren und die langen Polymerketten in viele kurze Ketten zerschneiden (PIETRZAK et al. 1997). Das Gesamtvolumen wird somit reduziert und die Festigkeit des Polymers nimmt ab, was letztendlich zum Integritätsverlust und zur Fragmentierung des Implantats führt (PIETRZAK et al. 1997). Bei der anschließenden Metabolisierung werden Fragmente durch Makrophagen phagozytiert, im Zitronensäurezyklus in Wasser und Kohlendioxid metabolisiert und anschließend ausgeschieden (SUURONEN und LINDQVIST 2002, PIETRZAK et al. 1997).

Die Resorption führt zu einem Festigkeits- und Massenverlust, sodass das Implantat seine biomechanische Stabilität verliert, schon bevor ein signifikanter Massenverlust auftritt (PIETRZAK et al. 1997). Durch niedrigere Festigkeitswerte und ein niedrigeres E-Modul als kortikaler Knochen (LUTHRINGER et al. 2014, ZHAO et al. 2017a) sind Polymerimplantate für lastragende Bereiche nicht geeignet (GRÜN et al. 2018a, WILTFANG 2002).

Die Geschwindigkeit des Abbaus hängt im Wesentlichen von der Zusammensetzung des Polymers ab und es gibt für jedes in der Medizin verwendete Implantatmaterial aus Polymeren und Copolymeren eigene Festigkeitswerte und Eigenschaften (PIETRZAK et al. 1997). Ein Implantat aus reinem PGA, welches hydrophil ist und dadurch schnell hydrolysiert wird (COX et al. 2005), kann innerhalb eines Monats die gesamte Festigkeit und innerhalb von 6 - 12 Monaten die gesamte Masse verlieren (PIETRZAK et al. 1997). Es werden dabei große Mengen an sauren Glykolsäuremonomeren freigesetzt, die den lokalen pH-Wert absenken können (PIETRZAK et al. 1997). Die pH-Reduktion kann zu einer direkten Stimulierung von Osteoklasten führen, was in einer Knochenresorption und den damit auftretenden Komplikationen resultieren kann (ARNETT 2008).

Im Gegensatz dazu wurde beschrieben, dass PLLA, welche hydrophob ist, viel langsamer resorbiert (COX et al. 2005). Das Implantationsmaterial war nach 5 Jahren noch teilweise vorhanden (SUURONEN et al. 1998). Die pH-Reduktion spielt dabei eine geringere Rolle als abbauresistente Kristalle, die zu Komplikationen führen können (PIETRZAK et al. 1997, SUN et al. 2014, WINDHAGEN et al. 2013).

Zu den häufigsten Komplikationen bei Polymerimplantaten zählen chronische Fremdkörperreaktionen, welche von erythematösen Papeln bis hin zu ausgedehnten osteolytischen Läsionen reichen und in wenigen Fällen zu einer schweren Osteoarthritis führen können (BERGSMA 1995, BÖSTMAN und PIHLAJAMÄKI 2000a, BÖSTMAN und PIHLAJAMÄKI 2000b, SUN et al. 2014). Studien zufolge kann es selten im späteren Heilungsverlauf zum Bruch des Implantats kommen, was zu schweren Knorpelschäden führen kann (LEMBECK und WÜLKER 2005). Polymerschrauben weisen nicht nur ein erhöhtes Bruchrisiko bei der Schraubeninsertion auf, sondern können auch bei fachgerechter Handhabung im Degradationsprozesses zu einer Erweiterung des Knochentunnels führen (ZHENG et al. 2014).

2.2.2.2 Magnesium im biologischen Organismus und in der Osteosynthese

Magnesium besitzt wichtige physiologische Funktionen für den Körper (HARTWIG 2001). Intrazellulär kommt es nach Kalium am zweithäufigsten vor und ist im Körper das am vierthäufigsten vorkommende Kation (FAWCETT et al. 1999, SWAMINATHAN 2003, HARTWIG 2001), welches vor allem im Dünndarm aufgenommen und hauptsächlich renal ausgeschieden wird (VORMANN 2003, SARIS et al. 2000, JAHNEN-DECHENT und

KETTELER 2012). Die totale Menge im Serum beträgt circa 1,7-2,5 mg/dl (TOPF und MURRAY 2003, MUSSO 2009), jedoch befindet sich weniger als 1% im Blut (ELIN 1988). Die durchschnittliche Gesamtmenge an Magnesium im menschlichen Körper beträgt circa 24 g, wovon sich etwa die Hälfte im Knochen und die andere Hälfte im Weichgewebe befindet (ELIN 1988).

Die zelluläre Aufnahme wurde durch spezifische TRPM-„Chanzyme“ beschrieben (Melastatin-verwandte Unterfamilie der Transient Receptor Potential (TRP)-Kanäle und Enzyme) (SCHLINGMANN und GUDERMANN 2005), welche durch Stimuli wie Spannung, Ca^{2+} , Temperatur, Zellschwellung, Lipidverbindungen und andere endogene und exogene Liganden gut reguliert sind (KRAFT und HARTENECK 2005). Magnesium wird als Ko-Faktor bei über 300 enzymatischen Reaktionen, für den Energiestoffwechsel, zur Aufrechterhaltung genomischer Stabilität und der Membranstabilität sowie zur Nukleinsäurensynthese benötigt, moduliert die Signaltransduktion und die Zellproliferation (HARTWIG 2001, JAHNEN-DECHENT und KETTELER 2012, SARIS et al. 2000).

Es dient als Mineralstoff als wichtiger Bestandteil im Knochenaufbau, wobei eine hohe Magnesiumzufuhr über die Nahrung mit einer höheren Knochendichte verbunden sein könnte (MARTINI 1999) und es bei Magnesiummangel durch eine Zunahme der Knochenresorption und eine Abnahme der Knochenbildung zum Knochenverlust kommen kann (ISHIMI 2010). Magnesium ist an vielen physiologischen Funktionen, wie dem Herzrhythmus, Gefäßtonus, Nervenfunktion, Muskelkontraktion- und Entspannung beteiligt (JAHNEN-DECHENT und KETTELER 2012) und kann zusätzlich in frühen Stadien vor einer Tumorentstehung schützen (HARTWIG 2001). Eine erhöhte Magnesiumkonzentration in Wunden bedingt eine erhebliche Steigerung der Migration von Entzündungszellen, Keratinozyten, Fibroblasten und Neovaskulatur, was einen positiven Einfluss im Sinne einer Beschleunigung der Wundheilung vermuten lässt (GRZESIAK und PIERSCHBACHER 1995).

Es wurde beschrieben, dass Magnesium antiinflammatorisch wirken kann und dahingehend auch klinisch Verwendung finden könnte (SUN et al. 2020).

Klinisch zeigen sich teilweise ähnliche Symptome bei Hypo- und Hypermagnesiämie, wobei letzteres seltener ist (JAHNEN-DECHENT und KETTELER 2012). Eine Hypomagnesiämie wird bei Diabetes mellitus, arterielle Hypertonie, Osteoporose sowie bei gastrointestinalen und renalen Verlusten beobachtet (SWAMINATHAN 2003, ELIN 1988).

Klinisch zeigt sich dies in schweren Fällen in Form von neurologischen und kardiovaskulären Symptomen, wie beispielsweise Schwäche, Zittern, Krämpfe oder Herzrhythmusstörungen, was durch orale Supplementierung von Magnesium und intravenöser Zugabe therapiert werden kann (ELIN 1988, SWAMINATHAN 2003, VAN LAECKE 2019).

Hypermagnesiämie tritt fast ausschließlich bei Patienten mit erheblich verminderter Nierenfunktion und in Verbindung mit einer hohen Magnesiumzufuhr durch Supplemente oder Medikamente auf (SWAMINATHAN 2003, VAN LAECKE 2019). Symptome beginnen ab einem Serumlevel von circa 5-7 mg/dl mit Benommenheit, Erbrechen, Lethargie und gehen dann über zum Verlust tiefer Sehnenreflexe, Hypotension und Somnolenz (7,0-12 mg/dl) bis zum kompletten Herzblock, Atemstillstand, Paralyse und Koma (>12 mg/dl) und sind somit lebensbedrohlich (TOPF und MURRAY 2003, SWAMINATHAN 2003). Die Therapie erfolgt mittels Dialyse und einer Antagonisierung der klinischen Symptome durch Kalzium (TOPF und MURRAY 2003, SWAMINATHAN 2003).

Diverse Studien kommen zu dem Ergebnis, dass die Tagesmenge der Magnesiumfreisetzung auch bei schnell korrodierenden Implantaten immer noch im Milligrammbereich und weit unter der Tagesmenge der Magnesiumaufnahme liegt und somit sicher in der Anwendung sein müsste (LI et al. 2004, GU und ZHENG 2010).

Damit Magnesium als biodegradierbares Implantat verwendet werden kann, müssen bestimmte Voraussetzungen erfüllt sein. Das Implantat sollte eine angemessene Primärstabilität aufweisen sowie moderat und homogen im Gleichgewicht mit dem Knochenheilungsprozess korrodieren (KRAUS et al. 2012). Zusätzlich bedarf es einer guten Biokompatibilität als biologische Wirtsreaktion auf das Implantat einschließlich der Metabolisierung der freigesetzten Korrosionsprodukte und die Gewebeheilung sollte letztendlich ohne Implantatrückstände abgeschlossen werden (ZHENG et al. 2014, KRAUS et al. 2012, YANG et al. 2018). Nach fast 150 Jahren Forschung an Magnesium und seinen Legierungen als Implantatmaterial (WITTE 2010) konnte 2013 das erste Implantat auf Magnesiumbasis zugelassen werden (BIBER et al. 2016).

2.3 Magnesiumlegierungen

Die reine Form von Magnesium weist ungeeignete Eigenschaften für die Anwendung als Implantatmaterial auf (GU et al. 2014). Insbesondere das bei der Korrosion frei werdende Gas kann die mechanische Integrität beeinträchtigen (GU et al. 2014, STAIGER et al. 2006). Durch Legierungsentwicklung, Wärmebehandlung und plastische Verformung können die mechanischen und korrosiven Eigenschaften verbessert werden (CHEN et al. 2014, CHEN et al. 2018). Für die Entwicklung der Legierungskomposition werden die Toxizität der verwendeten Elemente, die Festigkeit und Duktilität der Legierung nach Zugabe der Elemente und der Einfluss der Elemente auf das Korrosionsverhalten untersucht (CHEN et al. 2014). Die entwickelten binäre Legierungen werden vor allem als Grundlage für Multi-Element Legierungen auf Magnesiumbasis verwendet (CHEN et al. 2014). Durch Verarbeitungsprozesse der plastischen Verformung wie Strangpressen, Walzen, Ziehen und Schmieden kann die Festigkeit von Magnesiumlegierungen aufgrund des Widerstands gegen

Versetzungsbewegungen verbessert werden (CHEN et al. 2018). Bei der Wärmebehandlung wird das Mikrogefüge der Legierung verändert, was zu Veränderung der Kornverfeinerung und der Verfestigung der zweiten Phase führen kann (CHEN et al. 2018). Die Legierungselemente haben Einfluss auf die Mischkristallverfestigung, Ausscheidungshärtung und Kornverfeinerung der Legierung und können so zur Verbesserung der mechanischen (BAMBERGER und DEHM 2008) und korrosiven Eigenschaften führen (ZHAO et al. 2017b). Um bessere mechanische Eigenschaften für magnesiumbasierte Implantate zu erhalten, wurden auch Legierungen mit Aluminium und Seltenen Erden und anderen Elementen untersucht, die weniger biokompatibel oder deren biologische Eigenschaften unbekannt sind (WITTE et al. 2008, CHEN et al. 2014). Dabei können Magnesiumlegierungen, die Seltene Erden Elemente enthalten, die höchsten Festigkeits- und Dehnungswerte sowie ein geeignetes Korrosionsverhalten aufweisen (CHEN et al. 2014). Aktuelle Studien, bei welchen die Magnesiumlegierung WE43, bestehend aus 4 Gewichts-% Yttrium (W), 3 Gewichts-% Seltenen Erden (E) und 93 Gewichts-% Magnesium, mit und ohne Plasmaelektrolytbeschichtung verwendet wurde, zeigen vielversprechende Ergebnisse (SCHALLER et al. 2018, RENDENBACH et al. 2021). Es wurde bei der Verwendung von anderen Seltenen-Erden-Legierungen allerdings beschrieben, dass es *in vivo* zur Anreicherung dieser Elemente in Milz, Leber, Lunge und Niere (MYRISSA et al. 2017) und *in vitro* zu verminderten Lebensfähigkeit, Apoptose und Nekrose von Immunzellen kommen kann (JIN et al. 2018). Die Legierungen für Implantate sollten biokompatibel sein, weshalb es hinsichtlich der Zusammensetzung vorteilhaft ist auf Elemente zurückzugreifen, die bereits im Körper vorkommen oder als Spurenelemente benötigt werden, wie etwa Kalzium und Zink (POINERN et al. 2013, HOU et al. 2019, CHEN et al. 2014).

Magnesium-Zink-Legierungen können die zweitstärksten Festigkeits- und Dehnungswerte aufweisen und die Korrosionsrate kann reduziert werden, ohne Seltene Erden zu enthalten (CHEN et al. 2014). Das Spurenelement Zink kommt im Körper vor allem im Muskel vor (ZHENG et al. 2014) und ist für die Entwicklung und Aufrechterhaltung der Funktion des Immunsystems essenziell (LASTRA et al. 2001, DARDENNE 2002, HAASE und RINK 2013). Kalzium ist ein wichtiger Bestandteil der Knochen (LIEBICH 2004), kann als Ion die Mineralisierung durch Stimulation der Osteoblasten fördern (LIU et al. 2008) und die Osteoklastenfunktion regulieren (KURODA et al. 2008, ASAGIRI und TAKAYANAGI 2007). Das Element kann somit einen positiven Einfluss auf die Knochenregeneration haben (CHANG et al. 2000).

Die Magnesiumlegierungen ZX00 und ZX10, welche Zink (Z) und Calcium (X) in sehr geringen Anteilen enthalten, wurden in diversen Studien hinsichtlich ihrer Degradationseigenschaften, Biokompatibilität und mechanischen Eigenschaften untersucht und zeigen bereits vielversprechende Ergebnisse (CIHOVA et al. 2019, JAFARI et al. 2017,

HOLWEG et al. 2020a, GRÜN et al. 2018b, HOFSTETTER et al. 2014, HOFSTETTER 2015a, HOU et al. 2019).

2.3.1 Mechanische Eigenschaften

Das Ziel der Osteosynthese ist die Stabilisierung der Fraktur während der Heilung, um eine ausreichende Entlastung zu erreichen (KRAUS et al. 2012). Bei resorbierbaren Implantaten bedeutet das, dass nach ausreichender Stabilisierung eine allmähliche Lastübertragung auf das zu heilende Gewebe stattfinden und letztendlich vollständig auf dieses übergehen muss, wie in Abbildung 1 (Abb.1) dargestellt (CLAES 1992, WITTE et al. 2011). Wenn die Knochenheilung abgeschlossen ist, sollte das Implantat die mechanische Funktion verloren haben und letztendlich vollständig resorbiert sein (CLAES 1992, WITTE et al. 2011).

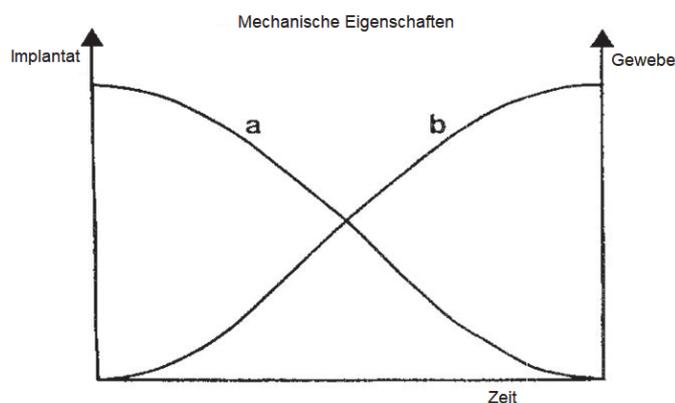


Abb. 1 Mechanische Eigenschaften von Implantat und Gewebe

Optimaler zeitlicher Verlauf der Degradation des Implantats mit allmählicher Lastübertragung auf das heilende Gewebe. „a“ entspricht den abnehmenden mechanischen Eigenschaften des Implantats während der Degradation, „b“ entspricht dem wachsenden mechanischen Widerstand des Gewebes während der Heilung. Die Kraftübertragung von Implantat auf Gewebe sollte zum Schutz des Gewebes möglichst gleichmäßig während des Heilungsprozesses erfolgen, um die optimale Gewebefestigkeit zu erreichen (in Anlehnung an: CLAES 1992, WITTE et al. 2011).

Damit die Stabilität zu Beginn der Heilung gewährleistet wird, sollte das Osteosynthesematerial ähnliche mechanische Eigenschaften wie kortikaler Knochen aufweisen (GRIMM 2002).

Magnesiumlegierungen besitzen eine Dichte von circa $1,74\text{-}2\text{ g/cm}^3$ und ein E-Modul (auch Youngsches Modul genannt) von circa $41\text{-}45\text{ GPa}$ ähnlich wie beim menschlichen Knochen ($1,8\text{-}2,1\text{ g/cm}^3$; $3\text{-}20\text{ GPa}$) (BANERJEE et al. 2019). Das Elastizitätsmodul ist im Hookschen Gesetz bei einaxialer Beanspruchung definiert als die Proportionalitätskonstante zwischen Spannung und Dehnung eines festen Werkstoffs im linear-elastischen Bereich (also bis zu dem Bereich, bei dem sich der Werkstoff verformt) und besitzt die Einheit der Spannung (MANG und HOFSTETTER 2013). Je größer der Widerstand des Werkstoffs gegenüber Verformung ist, desto höher ist sein E-Modul (MANG und HOFSTETTER 2013).

Titanlegierungen besitzen eine höhere Dichte und ein deutlich höheres E-Modul (110-117 GPa) (BANERJEE et al. 2019, STAIGER et al. 2006), wohingegen Implantate auf Polymerbasis niedrigere Dichten und ein niedrigeres E-Modul als Knochen aufweisen (ZHAO et al. 2017a, LUTHRINGER et al. 2014).

Auch im Vergleich der Zug- und Druckfestigkeit kann Magnesium dem kortikalen Knochen ähnlicher sein als die genannten alternativen Materialien (ZHAO et al. 2017a, STAIGER et al. 2006, WITTE et al. 2008). Besteht ein großer Unterschied zwischen den mechanischen Eigenschaften, insbesondere des E-Moduls von Implantat und Knochengewebe, kann dies zu Problemen bei der Knochenregeneration führen (BANERJEE et al. 2019).

Damit der Knochen die notwendige mechanische Stimulation zur Heilung erhält, muss auf die Fraktur eine gewisse Spannung/Belastung wirken (WINKLER et al. 2018). Gemäß des Wolffschen Gesetzes der funktionalen Wiederherstellung wird die Reaktion des Knochengewebes auf natürliche Weise beeinflusst (WOLFF 1892, SUMITOMO et al. 2008).

Besitzt ein Osteosynthesematerial ein zu geringes E-Modul, steigt die Belastung der Fraktur über den optimalen Schwellenwert. Es wirkt also auf die Fraktarenden eine erhöhte Spannung, welche der Knochen durch die Bildung von Kallus auszugleichen versucht (GRIMM 2002). Kommt es zur überschießenden Kallusbildung aufgrund von zu großer Bewegung im Frakturspalt, spricht man von hypertropher Pseudoarthrose und es kann zur Verzögerung oder zum Ausbleiben der knöchernen Wiederherstellung führen (CLAES et al. 2000). Ebenso fehlen bei zu starrer Fixation die mechanischen Stimuli zur knöchernen Differenzierung des Kallusgewebes (CONNOLLY 1985, WINKLER et al. 2018). Schirmt das Implantat im weiteren Heilungsverlauf die Spannung der Fraktur durch ein zu hohes E-Modul übermäßig ab und unterschreitet den Schwellenwert, kann es zum Knochenabbau unter dem Implantat kommen und zum Stress-shielding-Effekt führen (GRIMM 2002, TERJESEN und APALSET 1988, NAGELS et al. 2003, SRINIVASAN et al. 2017, SUMNER und GALANTE 1992). Es wurde beschrieben, dass eine geringere Abschirmung durch mechanobiologische Optimierung von 3D-Titan-Mesh-Gerüsten zu einer früheren Defektüberbrückung und einer verstärkten Bildung von enchondralem Knochen führt und somit die Knochenregeneration verbessert werden kann (POBLOTH et al. 2018). Durch die ähnlichen mechanischen Eigenschaften von Magnesiumlegierungen gegenüber kortikalem Knochen kann der Abschirmungseffekt deutlich verringert (FARRARO et al. 2014, SEAL et al. 2009) und trotzdem eine ausreichende Stabilität gewährleistet werden (BANERJEE et al. 2019, STAIGER et al. 2006, ZHAO et al. 2017a). Die Magnesiumlegierung ZX10 (Mg-1Zn-0,3Ca, in Gewichts-%) kann eine Zugstreckgrenze (TYS) von 238 MPa, Zugfestigkeit (UTS) von 265 MPa und eine Bruchdehnung von 31% (HOFSTETTER et al. 2015b) besitzen, die Magnesiumlegierung ZX00 (Mg-0,45Zn-0,45Ca, in Gewichts-%) eine YYS von 284 MPa, eine UTS von $285,7 \pm 3,1$ MPa und eine Bruchdehnung von $18,2 \pm 2,1$ % (HOLWEG et al.

2020a). ERINC et al. (2009) postulieren, dass Magnesiumimplantate eine TYS von > 200 MPa und eine Bruchdehnung von > 15% besitzen sollten. Somit könnten auch ähnliche Legierungskompositionen mit Zink und Calcium für den Einsatz als Osteosynthesematerial geeignet sein.

2.3.2 Biologische Verträglichkeit und Degradation

Viele *in vitro* Studien beschreiben gute biologische Verträglichkeiten von Magnesiumlegierungen (JUNG et al. 2019, CHOU et al. 2013, LI et al. 2008, HONG et al. 2013). Auch *in vivo* wurden gute Biokompatibilität im direkt anliegenden Gewebe und auch keine pathologischen Auswirkungen in Organen oder Blutwertveränderungen beobachtet (NAUJOKAT et al. 2017, CASTELLANI et al. 2011, SCHALLER et al. 2018, XU et al. 2007, DIEKMANN et al. 2016, HOLWEG et al. 2020b).

Ähnliche Legierungskompositionen, wie die in dieser Studie verwendete Legierung, wurden als zytokompatibel gemäß DIN EN ISO 10993-5 postuliert (ZHANG et al. 2011a, ZHANG et al. 2011b). *In vitro* wurde eine gute Zelllebensfähigkeit von humanen Osteoblasten (HOU et al. 2019) und perivaskulären Zellen aus der menschlichen Nabelschnur (HUCPV) (BOHLEN et al. 2020) auf den Legierungen und keine induzierte Toxizität bei L-929-Zellen beschrieben (ZHANG et al. 2011a, ZHANG et al. 2011b). Des Weiteren wurden die Implantate *in vivo* bei der Einheilung gut toleriert, was eine gute Biokompatibilität des Materials bestätigen kann (ZHANG et al. 2011b, LEE et al. 2016, GRÜN et al. 2018b, HOLWEG et al. 2020a, HOLWEG et al. 2020b).

Das Hauptproblem seit der Verwendung der ersten Magnesiumimplantate bis heute ist die Implantatkorrosion und die damit verbundene Freisetzung von Gas in das umliegende Gewebe (WITTE 2010). Die Korrosion umfasst den Abbau eines Materials aufgrund einer Reaktion mit seiner Umgebung unter Einfluss chemischer, physikalischer und elektrochemischer Faktoren (ZENG et al. 2008). Bei *in vitro* und *in vivo* Versuchen konnte gezeigt werden, dass das Korrosionsverhalten unter anderem von pH-Wert, Wassergehalt, Temperatur und Ionenzusammensetzung beeinflusst wird und sich dahingehend unterscheiden kann (SONG und ATRENS 1999, WITTE et al. 2006). Während die *in vitro* Bedingungen somit hauptsächlich vom verwendeten Korrosionsmedium abhängen, spielen bei der Korrosion *in vivo* der Ort der Implantation, das umgebende Gewebe und der Blutfluss eine entscheidende Rolle (SONG und ATRENS 1999, SANCHEZ et al. 2015, WITTE et al. 2006, WITTE et al. 2008).

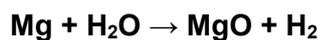
Wenn Magnesium in wässrige Umgebung gebracht wird, findet folgende Gesamtreaktion statt (STAIGER et al. 2006):



Die Gesamtkorrosionsreaktion von Magnesium kann in eine chemische und zwei elektrochemische Reaktionen unterteilt werden (POURBAIX 1974, THOMAS et al. 2015):



Darin zeigt sich, dass beim Abbau des Implantats sowohl Wasserstoffgas als auch Magnesiumhydroxid entsteht. Da Letzteres als Base wirkt, kann es zu einer Alkalisierung der Umgebung kommen (GHALI et al. 2004). Wenn durch Puffermechanismen ein Ausgleich nicht mehr möglich ist, kann das physiologische Reaktionsgleichgewicht im menschlichen Körper erheblich nachteilig beeinflusst werden (SONG und SONG 2007) und zu einem Vergiftungseffekt führen, wenn der lokale *in vivo* pH-Wert über 7,8 liegt (KAMRANI und FLECK 2019). Klinisch kann dies in einer Hypoglykämie und einer Hypokaliämie resultieren und unter anderem Herzrhythmusstörungen sowie Muskelkrämpfe hervorrufen (LANG 2019). In einer zweiten Reaktion entsteht aus Magnesium und Wasser Magnesiumoxid und Wasserstoff (KOPP et al. 2019):



Die Bildung von Magnesiumoxid und -hydroxid unmittelbar auf der Magnesiummatrix kann temporär vor weiterer Korrosion schützen, da beide in wässriger Lösung schlecht löslich sind (KOPP et al. 2019). Allerdings findet die Reaktion nur in Abwesenheit von Anionen wie Chloridionen statt (VIRTANEN 2011). Bei Anwesenheit von Chlorid, welches reichlich im Blut und anderen Körperflüssigkeiten vorkommt, kann bei Konzentrationen von über 30 mmol/l das lösliche Magnesiumchlorid entstehen, welches die schützende Kristallstruktur des Schutzfilms auf dem Magnesium durchbricht (GHALI et al. 2004, ZHANG et al. 2009, ESMAILY et al. 2017). Dies kann zum raschen Abbau des Implantats mit einhergehender unkontrollierter Bildung von Gas führen, wobei theoretisch die Korrosion von einem Gramm Magnesium zur Bildung von einem Liter Wasserstoffgas führt (WITTE et al. 2005).

Es wurde beschrieben, dass intraossäre Hohlräume in dem am Implantat anliegenden Knochen (REIFENRATH et al. 2010, HUEHNERSCHULTE et al. 2012, SCHALLER et al. 2016a, SCHALLER et al. 2017, NAUJOKAT et al. 2017) und subkutane Gasansammlungen im umliegenden Gewebe entstehen können, wenn mehr Wasserstoff freigesetzt wird, als sich im umliegenden Gewebe lösen oder vom extrazellulären Medium abtransportiert werden kann (MEIER und PANZICA 2017, CHAYA et al. 2015b, WITTE et al. 2005, LI et al. 2018, SCHALLER et al. 2016b, DIEKMANN et al. 2016, IMWINKELRIED et al. 2013). Dies kann die mechanische Integrität (GRAY und LUAN 2002, SINGH RAMAN et al. 2015), den Knochen-Implantat-Kontakt (KRAUS et al. 2012) und den vollständigen Knochenaufbau um die Implantate beeinträchtigen (KRAUS et al. 2012, LENSING et al. 2014).

Um die rasche Alkalisierung des Gewebes und den nachteiligen Effekt des unkontrolliert erzeugten Wasserstoffgases zu reduzieren, kann durch Legieren die Korrosionsrate verlangsamt werden (SONG und SONG 2007, AGARWAL et al. 2016).

Die Legierungselemente können mit Magnesium oder untereinander reagieren und intermetallische Phasen bilden, welche sich entlang der Korngrenzen verteilen oder sich in der Magnesiummatrix lösen und so das Mikrogefüge, die mechanischen Eigenschaften und das Korrosionsverhalten beeinflussen (DING et al. 2014). Für die Magnesiumlegierungen ZX00 und ZX10 wurden langsame und homogene Korrosionsgeschwindigkeiten mit einhergehender adäquater Gasfreisetzung beschrieben (HOFSTETTER et al. 2014, GRÜN et al. 2018b, CLEMENT 2019, BOHLEN et al. 2020). Obwohl es bei HOLWEG et al. (2020a) zu verkapselten Gashohlräumen um ZX00-Implantate kam, welche röntgenologisch als strahlendurchlässige Bereiche beschrieben wurden, konnte keine Lockerung von Schrauben, zystischer Verkapselung oder Beeinträchtigung der Frakturheilung festgestellt werden. Ferner postulieren sie aber, die langfristigen Auswirkungen der Gashohlräumbildung um die Implantate herum zu untersuchen (HOLWEG et al. 2020a). Einen weiteren Ansatz zur Verbesserung der Korrosionsbeständigkeit von Magnesium können Oberflächenmodifikationen bieten (SONG und SONG 2007).

2.3.3 Bioaktivität

Bei der Verwendung von Magnesiumimplantaten wurde ein stimulierender Effekt auf die Weichgewebebildung (MCBRIDE 1938) und Knochenneubildung beschrieben (CHAYA et al. 2015b, RENDENBACH et al. 2021). Dieser osteostimulierende Effekt, welcher sich auf zelluläre und molekulare Mechanismen von Magnesiumionen auf die Osteogenese zurückführen lässt, ist wünschenswert bei der Frakturheilung mit Implantaten (WANG et al. 2020).

Die Osteostimulation beinhaltet die Osteoinduktion, Osteokonduktion und Osseointegration (WANG et al. 2020). Osteoinduktion bedeutet die Rekrutierung unreifer Stamm- und Osteoprogenitorzellen zur Knochenheilungsstelle und deren Stimulation zur Osteogenese, so dass diese sich zu Präosteoblasten und darüber hinaus weiterentwickeln (ALBREKTSSON und JOHANSSON 2001). Das Wachstum von Knochen auf der Oberfläche von Implantaten wird Osteokonduktion genannt (ALBREKTSSON und JOHANSSON 2001). Um eine stabile Verankerung eines Implantats zu erreichen, ist ein direkter Knochen-Implantat-Kontakt notwendig, was der Begriff Osseointegration impliziert (ALBREKTSSON und JOHANSSON 2001, WINKLER et al. 2018).

Bei der Verwendung von Magnesiumimplantaten wurden im Vergleich zu Titan- und Polymerimplantaten höhere Knochenanteile im umgebenden Knochen (CASTELLANI et al. 2011, WITTE et al. 2005) und im Vergleich zu Titanimplantaten höhere Knochen-Implantat-

Kontakte beschrieben (CASTELLANI et al. 2011). Ferner wurde bei Magnesiumimplantaten eine fortschreitende Knochenneubildung über den Implantaten beobachtet (CHAYA et al. 2015b, RENDENBACH et al. 2021).

Vermutet wird ein Zusammenhang zwischen der Degradation und der Zelldifferenzierung sowie der Osteoblastenaktivierung (WITTE et al. 2005, CHAYA et al. 2015a).

Der genaue Mechanismus der durch das Magnesiumimplantat induzierten Knochenneubildung ist noch nicht vollständig geklärt. Eine entscheidende Rolle für die Verbesserung der Zellebensfähigkeit sowie der osteoblastischen Differenzierung scheint die richtige Menge an frei werdenden Magnesiumionen zu sein (WONG et al. 2013). Es wird vermutet, dass Mg^{2+} -Ionen die Zellen zur Osteoblastendifferenzierung stimulieren (PARK et al. 2013). Magnesiumionen können zu einer schnellen Osteokonduktion führen (PARK et al. 2012b, YAMASAKI et al. 2002), die Knochenbildung fördern (YAMASAKI et al. 2003) und die Osseointegration verbessern (PARK et al. 2012a, PARK et al. 2013). Auch das Hauptkorrosionsprodukt $Mg(OH)_2$ könnte zu einem verstärkten Knochenwachstum in der direkten Umgebung und zu einer vorübergehenden verminderten Knochenresorption führen (JANNING et al. 2010). Es wurde beschrieben, dass durch die Freisetzung von Mg^{2+} -Ionen aus den Magnesiumlegierungen Signalwege der Knochenzellen moduliert werden und sich eine verstärkte Knochenregeneration zeigen kann (YOSHIZAWA et al. 2014a, ZREIQAT et al. 2005, LI et al. 2014a).

Es wird vermutet, dass die Zelladhäsion durch Integrin assoziierte Signaltransduktionswege erfolgt, an denen auch das Schlüsselprotein Shc beteiligt ist (ZREIQAT et al. 2002). Das Shc-Protein kann über Integrine die knochenbildungsbezogene Genexpression modulieren (LEE et al. 2008). Durch Anwesenheit von Magnesium kann eine erhöhte Integrinexpression und eine verstärkte Genexpression von extrazellulären Matrixproteinen erfolgen, was zu einer verstärkten Osteoblastenadhäsion führen kann (ZREIQAT et al. 2002).

Es wurde beschrieben, dass bei magnesiummodifizierten Implantaten vermehrt das Shc-Protein aktiviert wurde, welches einen Integrationspunkt zwischen Integrinen und dem Ras/MAP-Kinase-Weg darstellt (ZREIQAT et al. 2005).

Der MAP-Kinase-Signaltransduktionsweg spielt eine wichtige Rolle in der Knochenzellendifferenzierung (RODRÍGUEZ-CARBALLO et al. 2016). Die Hochregulierung der MAP-Kinase und die vermehrte Aktivierung der Shc-Proteine deuten auf deren Vermittlung von osteoblastischen Zellinteraktionen hin (ZREIQAT et al. 2005). Somit kann eine Implantatoberfläche aus Magnesium zu einer erfolgreichen Differenzierung und Funktion der Osteoblasten an der Knochen-Implantat-Grenze beitragen (ZREIQAT et al. 2005).

Neben den beschriebenen Effekten zur osteogenen Differenzierung ist die Angiogenese eine Schlüsselkomponente der Knochenregeneration (HANKENSON et al. 2011). Die Angiogenese wird durch eine Vielzahl von Wachstumsfaktoren reguliert, insbesondere durch

den vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF), um das Einwachsen von Blutgefäßen zu induzieren und den metabolisch aktiven regenerierenden Kallus mit Sauerstoff und Nährstoffen zu versorgen (HANKENSON et al. 2011). Freigesetzte Mg^{2+} -Ionen aus Magnesiumlegierungen können die Angiogenese induzieren, indem sie über die HIF-2 α -Produktion bei undifferenzierten hBMSC (menschliche mesenchymale Stammzellen aus dem Knochenmark) und die PGC-1 α -Produktion bei osteogenen hBMSC die Expression von VEGF erhöhen (YOSHIZAWA et al. 2014a, YOSHIZAWA et al. 2014b). So kommen YOSHIZAWA et al. (2014a, 2014b) zu dem Ergebnis, dass eine angemessene Freisetzung von Mg^{2+} aus Magnesiumlegierungen die Knochenheilung verbessern könnte.

2.4 PEO-Oberflächenmodifikation

Damit Implantate auf Magnesiumbasis sicher als Humanimplantate eingesetzt werden können, muss ihr Abbauverhalten vorhersagbar und einstellbar sein (KOPP et al. 2019).

Um die Degradationsgeschwindigkeit und den damit einhergehenden nachteiligen Effekt der Gasbildung zu regulieren, werden Oberflächenmodifikationen und Beschichtungen entwickelt, welche die Korrosionsbeständigkeit erhöhen (IBRAHIM et al. 2017).

Die plasmaelektrolytische Oxidation (PEO), auch als Mikrolichtbogenoxidation (MAO) oder anodische Funkenabscheidung (ASD) bezeichnet, ist ein Verfahren zur Oberflächenveredelung von metallischen Werkstoffen (SIMCHEN et al. 2020).

In einem elektrolytischen Bad wird zwischen der aus der Legierungskomponente bestehenden Anode und einer Kathode eine hohe Spannung angelegt, um an der Oberfläche der Legierung ein Plasma zu erzeugen, welches die Oxidation induziert (YANG et al. 2011, HORNBERGER et al. 2012).

Zunächst reagiert das Legierungsmaterial selbst sowohl mit dem aus den Elektrolyten bereitgestellten Sauerstoff als auch mit den Elektrolyten und führt zur Bildung einer dünnen passiven Oxidschicht (SIMCHEN et al. 2020). Durch eine weitere Erhöhung des Potentials wächst die passive Oxidschicht und erhöht den elektrischen Widerstand weiter (SIMCHEN et al. 2020).

Beim Spannungsdurchschlag entstehen Entladungskanäle an der Elektrolyt-Gas-Grenzschicht, welche in die Oxidschicht eindringen (SIMCHEN et al. 2020). In diesen Kanälen werden thermisch aktivierte Ionen aus der Legierung ausgestoßen und bewegen sich vom Implantat weg, während sich Sauerstoffionen zum Implantat hinbewegen (SIMCHEN et al. 2020, DARBAND et al. 2017). Die Kationen der Legierung reagieren mit Anionen zu Oxiden und werden abgeschieden (SANKARA NARAYANAN et al. 2014, SIMCHEN et al. 2020). Die Beschichtung kann so gleichzeitig nach innen zur Legierung und nach außen zur Beschichtungsoberfläche wachsen (HUSSEIN et al. 2013, DARBAND et al. 2017).

Das Wachstum der Schicht ist eine Kombination aus elektrischen Entladungsvorgängen, die zum Schmelzen und zur Oxidation des Substrats führen, welches dann durch den Entladungskanal ausfließt und an der Grenzfläche zwischen Oberfläche und Elektrolyt abkühlt (HUSSEIN et al. 2013). Weiterhin kann dies zur lokalen Zerstörung der äußersten Schicht durch starke Entladungen und zum Diffusionsprozess des Sauerstoffs zum Legierungssubstrat und der dortigen Reaktion mit den Mg^{2+} -Ionen führen (HUSSEIN et al. 2013).

Die Folge ist ein dreischichtiger Aufbau: eine defektfreie dünne Schicht, welche zickzackförmig direkt dem Implantat anliegt und gut integriert ist, einer kompakten Mittelschicht und einer äußeren porösen Schicht (SIMCHEN et al. 2020, HORNBERGER et al. 2012, DARBAND et al. 2017). Die Entladungskanäle sind von lokalen Mikrorissen umgeben, die durch die Abkühlung der geschmolzenen Oxide entstehen. Diese Poren verbessern das Wachstum von Hydroxylapatit auf der Oberfläche und erhöhen die Haftfestigkeit durch mechanische Verriegelung (DARBAND et al. 2017, YANG et al. 2011).

Die Porosität (SANKARA NARAYANAN et al. 2014) und die Qualität der entstandenen stabilen keramisierten Oxidschicht können durch die gewählten Elektrolyte, Legierung und durch die Verarbeitungsparameter, wie der Reaktionszeit und des Potentials, bestimmt werden (SIMCHEN et al. 2020, HORNBERGER et al. 2012, DARBAND et al. 2017). Die Schichtdicke kann zwischen 5 und 200 μm variieren (DARBAND et al. 2017).

KOPP et al. (2019) postulieren, dass eine kleine Porengröße positive Auswirkungen auf die Degradation hat und eine PEO-Oberflächenmodifikation die Korrosionsrate bei WE43 Implantaten innerhalb der ersten 21 Tage erfolgreich senken kann. Durch abnehmende Stabilität der PEO-Oberfläche kann dann durch die Poren und Risse Flüssigkeit eindringen und Magnesiumhydroxid entstehen, welches das Implantat temporär vor weiterer Korrosion schützt (KOPP et al. 2019, LI et al. 2014b). Im weiteren Korrosionsverlauf kann es durch das Vorhandensein von Chloridionen zur Auflösung des passiven Magnesiumhydroxidfilms kommen (KOPP et al. 2019, LI et al. 2014b) und das Korrosionsmedium so bis zum Implantatinneren vordringen (KOPP et al. 2019). Diese Korrosionsnester führen im Inneren zur fortschreitenden Implantatkorrosion, während die äußere Schicht intakt bleibt (KOPP et al. 2019). Die verzögerte Korrosion kann von Anfang an eine erhöhte Osteoblastenanlagerung und damit ein stabiles Knochen-Implantat-Interface ermöglichen (FISCHERAUER et al. 2013). Bei schnell korrodierenden ZX50-Magnesiumlegierung mit MAO-Beschichtung wurde die Ausbildung von Korrosionsnestern nach anfänglicher Korrosionsverlangsamung beschrieben, welche in einer inhomogenen Korrosion und einem insgesamt schnelleren Implantatabbau gegenüber nichtmodifizierten Implantaten resultierte (FISCHERAUER et al. 2013).

Die Ergebnisse von *in vivo* Studien mit PEO-beschichteten WE43 Implantaten im Vergleich zu unbeschichteten Implantaten weisen nach bis zu 6 Monaten bei den oberflächenmodifizierten Implantaten eine langsamere Degradation mit einhergehender verzögerter Gasbildung auf (IMWINKELRIED et al. 2013, SCHALLER et al. 2016a, SCHALLER et al. 2016b, RENDENBACH et al. 2021). Es wurden bei den oberflächenmodifizierten Implantaten gegenüber den nichtmodifizierten ein höherer Knochen-Implantat-Kontakt (SCHALLER et al. 2016a, SCHALLER et al. 2016b, RENDENBACH et al. 2021) und eine höhere Knochendichte des dem Implantat anliegenden Knochens beschrieben (SCHALLER et al. 2016a, SCHALLER et al. 2016b). Die stabile Frakturfixation könnte so während des für die Frakturheilung typischerweise erforderlichen Zeitraums verbessert (IMWINKELRIED et al. 2013) und die Belastung des postoperativ gereizten umliegenden Gewebes durch freigesetztes Gas minimiert werden (FISCHERAUER et al. 2013).

Ferner postulieren GU et al. (2011) eine begünstigte Zelladhäsion, Proliferation und Differenzierung als Ergebnis einer verzögerten Degradation mit einhergehender langsamerer Magnesiumionenfreisetzung und einer geringeren pH-Schwankung im Kulturmedium. PEO-beschichtete Magnesiumimplantate können im Vergleich zu reinen Magnesiumimplantaten eine geringere Zytotoxizität und eine verbesserte Biokompatibilität aufweisen (JO et al. 2012, MA et al. 2015).

Durch Verlangsamung der Korrosion und somit der längeren Erhaltung der mechanischen Eigenschaften könnten langsam korrodierende PEO-oberflächenmodifizierte Magnesiumlegierungen für den Einsatz in lasttragenden Bereichen geeignet sein (DARBAND et al. 2017, MA et al. 2015).

3 Material und Methoden

3.1 Studiendesign

Die Untersuchungen wurden im Rahmen eines größeren Projekts durchgeführt, bei dem verschiedene Magnesiumlegierungen hinsichtlich ihrer Biokompatibilität, ihres Degradationsverhaltens sowie die Reaktion des umliegenden Gewebes auf die Degradation in Göttinger Minipigs untersucht wurden. Dabei wurden jedem Tier zwölf Schrauben in das *Os frontale* implantiert, darunter vier winkelstabile ZX00-Magnesiumschrauben, je 2 unbeschichtete und 2 PEO-beschichtete. An je einem Vorder- und einem Hinterlauf wurden noch weitere Implantate aus anderen Legierungen eingesetzt. Nach einer Beobachtungszeit von 6, 12 und 18 Monaten wurden die Tiere euthanasiert und *in vivo* Untersuchungen durchgeführt.

Zu Beginn dieser Dissertation lagen die zu untersuchenden Proben nach 6 und 12 Monaten Versuchszeit als Micro-CT-Rohdaten vor und waren in Blöcke aus Polymethylmethacrylat (PMMA) eingebettet. Die zu dem Zeitpunkt vorhandenen Proben, welche nach 18 Monaten Versuchszeit Aufschluss geben sollten, befanden sich in der aufsteigenden Alkoholreihe zur Entwässerung. Die Euthanasie und Probenentnahme der Tiere „3.7“ und „3.8“ und alle weiteren Bearbeitungen und Auswertungen der Proben wurden im Rahmen dieser Doktorarbeit angefertigt. Methodisch wurde sich in einigen Schritten an der Arbeit von FISCHER (2021) orientiert.

3.1.1 Implantate

Verwendet wurden 72 winkelstabile Schrauben für den craniomaxillofazialen (CMF) Bereich mit einer Länge von 5 mm und einem Durchmesser von max. 2,3 mm. Die Schrauben hatten eine konische Form und das Gewinde schloss den Schraubenkopf mit ein (Abb. 2 und 3). Die Hälfte der Implantate wurde vor dem Versuch durch Meotec GmbH & Co. KG mittels PEO modifiziert. Die ZX00-Legierung enthielt neben Magnesium gewichtsbezogen circa 0,7% Zink und circa 0,6% Calcium in der Legierung.

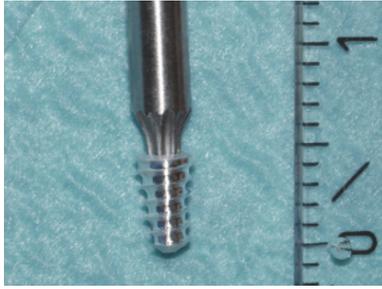


Abb. 2 Unbeschichtete CMF-Schraube

Das Gewinde der Schraube schließt den Schraubenkopf mit ein, die Länge beträgt 5 mm, der maximale Durchmesser 2,3 mm. Die Schraube besitzt einen TORX (Innensechsrund) und hat eine glänzende Oberfläche.

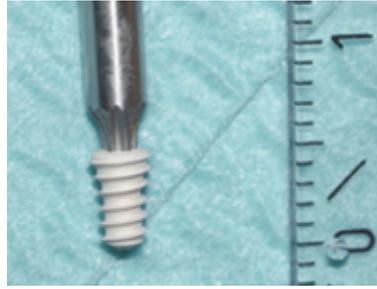


Abb. 3 PEO-beschichtete CMF-Schraube

Das Gewinde der Schraube schließt den Schraubenkopf mit ein, die Länge beträgt 5 mm, der maximale Durchmesser 2,3 mm. Die Schraube besitzt einen TORX (Innensechsrund) und hat eine grau-matte Oberfläche.

3.1.2 Versuchstiere

Der Versuch wurde unter Einhaltung aller Richtlinien zu Tierschutz und Ethik mit Genehmigung vom Amt für Gesundheits- und Verbraucherschutz Hamburg (Antrag 49/16) mit je sechs Göttinger Minipigs in drei Gruppen durchgeführt.

Die Tiere stammten von C. Schlesinger, Dorfstraße 17, Klein Erkmannsdorf 01454 Radeberg und von Gerd Heinrichs, Tichelkamp 14, 52525 Heinsberg.

3.1.3 Haltung und Fütterung

Nach anfänglicher Gesundheitsuntersuchung durch einen Tierarzt bekamen die Tiere (Tabelle 1) eine vierwöchige Eingewöhnungsphase in der zentralen Tierhaltung am Uniklinikum Hamburg-Eppendorf (Forschungstierhaltung, Gebäude N67, Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf, Martinistr 52, 20246 Hamburg), bevor dort auch die Versuchsdurchführung, Euthanasie und Entnahme der Proben stattfand. Die Tiere wurden über den Versuchszeitraum mindestens zu zweit in Boxen auf Stroh gehalten. Das verwendete Futter „Ssniff Minipig Haltungsfutter“ (Ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest Deutschland) und Wasser standen den Tieren *ad libitum* zur Verfügung.

Entsprechend der FELASA Empfehlungen erfolgten vierteljährliche Hygienemonitorings mit Untersuchung auf Endo- und Ektoparasiten sowie serologische Untersuchungen.

Tabelle 1 Tabelle mit Auflistung der Versuchstiere

Die Tabelle enthält die tierspezifische Identifikationsnummer für den Versuch, die Ohrmarke/Kennzeichnung der Versuchstiere, deren Gewicht bei Ankunft, deren Geschlecht und deren Standzeit nach der Operation bis zur Euthanasie.

Tier	Ohrmarke/Kennzeichnung	Gewicht	Geschlecht	Standzeit
1.3	Keine Ohrmarke, Kennzeichnung hinten blau	53,5 kg	m/kastriert	6 Monate
1.4	Keine Ohrmarke, Kennzeichnung hinten grün	51,0 kg	m/kastriert	6 Monate
1.5	Keine Ohrmarke, keine Kennzeichnung	58,5 kg	m/kastriert	6 Monate
1.7	Ohrmarke 832	45,0 kg	m/kastriert	6 Monate
3.1	Ohrmarke 612	45,5 kg	w	6 Monate
2.7	Ohrmarke 840	39,0 kg	m/kastriert	6 Monate
1.6	Keine Ohrmarke, vorne blau	56,0 kg	m/kastriert	12 Monate
2.1	Keine Ohrmarke, Kennzeichnung vorne rot	74,0 kg	m/kastriert	12 Monate
2.2	Keine Ohrmarke, vorne grün	70,5 kg	m/kastriert	12 Monate
2.3	Keine Ohrmarke, Kennzeichnung hinten rot	63,5 kg	m/kastriert	12 Monate
2.5	Keine Ohrmarke, Kennzeichnung schwarz gefleckt	51,5 kg	m/kastriert	12 Monate
3.4	Ohrmarke 577	30,0 kg	w	12 Monate
1.1	Ohrmarke 649	39,0 kg	m/kastriert	18 Monate
2.4	Keine Ohrmarke, Kennzeichnung blau	60,0 kg	w	18 Monate
3.7	Ohrmarke 090	49,0 kg	m/kastriert	18 Monate
3.3	Ohrmarke 648	42,0 kg	w	18 Monate
3.5	Ohrmarke 609	38,5 kg	w	18 Monate
3.8	Keine Ohrmarke, besondere Merkmale: schwarz gescheckt	44,5 kg	m/kastriert	18 Monate

3.1.4 Operation

Die Sedation der Tiere erfolgte mit 4 mg/kg KGW Azaperon (Stresnil, Elanco, Bad Homburg, Deutschland) und die anschließende Einleitung der Anästhesie intramuskulär mit 2 mg/kg KGW Xylazin (Xylapan, Vetoquinol, Ismaning, Deutschland) sowie 20 mg/kg KGW Ketamin (Ketasin, Virbac, Glattbrugg, Schweiz). An der Ohrvene wurde für intravenöse Applikationen ein Venenzugang gelegt.

Für die Intubation wurden mit Hilfe von Miller Laryngoskop Größe 4 die Standardtuben 6-7 mm (Portex, Smiths, Medical, Kent, England) verwendet und das automatische Narkosegerät auf 40% O₂ und 1,6-2% Sevofluran (Dräger, Lübeck, Deutschland) eingestellt und damit die Narkose aufrechterhalten. Mit dem Gewicht der Tiere erfolgte eine Anpassung des Richtwerts des Atemvolumens (400 ml) und der Atemfrequenz (circa 20/Minute).

Während der gesamten Dauer der Operation wurden die Vitalfunktionen, die Sauerstoffsättigung, der Blutdruck, die Herzfrequenz via EKG und die Körpertemperatur durch regelmäßige Messungen klinisch überwacht. Intraoperativ erhielten die Tiere intramuskulär eine Single-shot Antibiose Amoxicillin/Clavulansäure (Synulox, Zoetis, Berlin, Deutschland) mit einer Dosierung von 8,75 mg/kg KGW. Während der Operation erfolgte die Analgesie mit Fentanyl 10 µg/kg/h über einen Perfusor. Zum Schutz vor Austrocknung wurde in die Augen nach Einleitung der Narkose Bepanthensalbe (Bepanthen, Bayer, Leverkusen, Deutschland) gegeben. Das Operationsfeld wurde mit Povidon-Iod (Betasisodona, Braun, Melsungen, Deutschland) desinfiziert. Die Tiere wurden auf Schaumstoffkissen in Bauchlage fixiert und mit einem Schlitztuch abgedeckt.

Im Bereich des *Os frontale* wurde über einen T-förmigen Schnitt das Weichgewebe und das Periost mobilisiert und je Schwein wurden zwölf Implantate (Abb. 4) nach Vorbohrung inseriert. Darunter waren vier winkelstabile CMF-Schrauben der Magnesiumlegierung ZX00, wovon die Hälfte PEO-oberflächenmodifiziert waren. Die übrigen Implantate wurden im Rahmen anderer wissenschaftlicher Arbeiten ausgewertet und bestanden aus vier kanülierten WE43-Magnesiumschrauben, davon die Hälfte PEO-oberflächenmodifiziert, einer kanülierten Titanschraube, ein ResorbX-Pin und zwei ResorbXC-Pins.

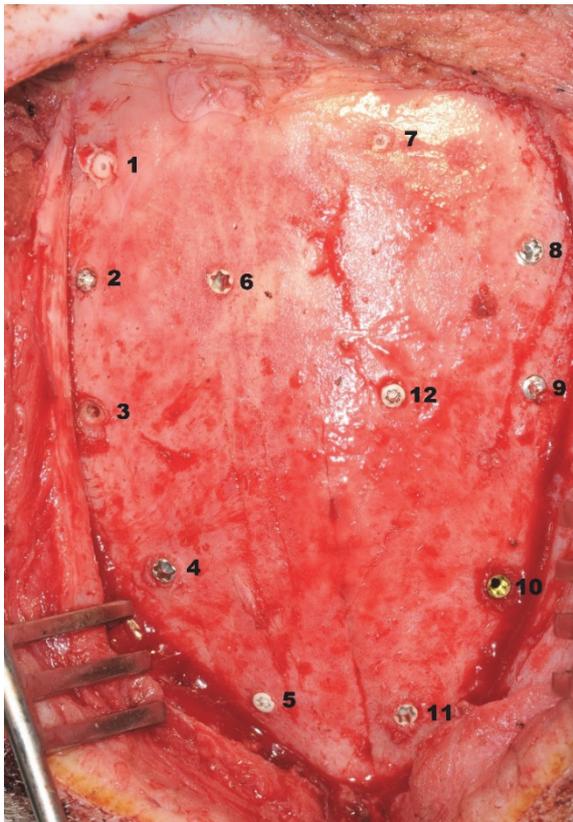


Abb. 4

Abb. 4 Exemplarische Übersicht der verschiedenen eingebrachten Implantate

Die Abbildung zeigt eine exemplarische Übersicht der verschiedenen in das *Os frontale* randomisiert eingebrachten Implantate. Jede Implantatlokalisierung wurde mit einer Nummer versehen, damit bei der späteren Probenentnahme die Zuordnung erfolgen konnte. Die nachfolgende Übersicht enthält die Zuordnung der Nummern zu den jeweiligen Implantaten auf der Abbildung.

1	ResorbXC Pin	7	ResorbXC Pin
2	ZX00 CMF-Schraube unbeschichtet	8	WE43 kanülierte Schraube unbeschichtet
3	ResorbX Pin	9	ZX00 CMF-Schraube unbeschichtet
4	WE43 kanülierte Schraube unbeschichtet	10	Kanülierte Titanschraube
5	ZX00 CMF-Schraube beschichtet	11	WE43 kanülierte Schraube beschichtet
6	WE43 kanülierte Schraube beschichtet	12	ZX00 CMF-Schraube beschichtet

Die Lokalisation der Implantate erfolgte randomisiert, sodass interindividuelle Effekte zwischen den Tieren und Effekte einer inhomogenen Knochendicke (Abb. 5) minimiert wurden.

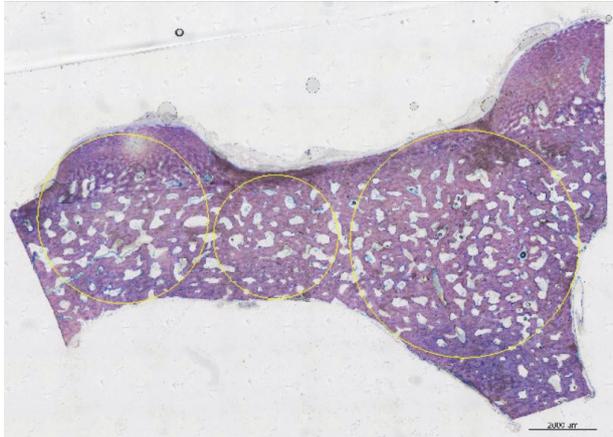


Abb. 5 Inhomogene Knochendicke des Os frontale

Der Durchmesser des linken gelben Kreises beträgt circa 5 mm, der des mittleren Kreises circa 3,6 mm, der des rechten Kreises circa 6,6 mm. Rechts unten im Bild befindet sich der Maßstab.

Das Periost, die Faszie und das Subkutangewebe wurden mit resorbierbaren Nahtmaterial adaptiert (Vicryl, Ethicon, Norderstedt, Deutschland) und die Haut mit nichtresorbierbaren Fäden verschlossen (Prolene, Ethicon, Norderstedt, Deutschland).

Nach der Operation erhielten die Tiere intramuskulär 0,1 mg/kg KGW Buprenophin (Buprenovet, Bayer, Leverkusen, Deutschland) gegen postoperative Schmerzen. Die aseptische Operation dauerte insgesamt circa 60 Minuten pro Tier. Die Operationstage sowie die Euthanasietage und die daraus resultierende Implantationszeit der Schrauben wurden erfasst (Tabelle 2).

Tabelle 2 Tabelle über die Implantationsdauer mit den Daten der Versuchstiere

Die Tabelle enthält die tierspezifische Identifikationsnummer, die Versuchsdauer als Standzeit und den Operations- sowie den Euthanasietermin.

Tier	Standzeit	OP	Euthanasie
1.3	6 Monate	15.11.2016	16.05.2017
1.4	6 Monate	15.11.2016	16.05.2017
1.5	6 Monate	17.11.2016	16.05.2017
1.7	6 Monate	27.03.2017	26.09.2017
3.1	6 Monate	22.03.2017	26.09.2017
2.7	6 Monate	27.03.2017	29.09.2017

1.6	12 Monate	17.11.2016	30.11.2017
2.1	12 Monate	21.11.2016	30.11.2017
2.2	12 Monate	23.11.2016	30.11.2017
2.3	12 Monate	22.11.2016	30.11.2017
2.5	12 Monate	28.11.2016	30.11.2017
3.4	12 Monate	22.03.2017	26.03.2018
1.1	18 Monate	14.11.2016	22.05.2018
2.4	18 Monate	28.11.2016	22.05.2018
3.7	18 Monate	21.08.2017	13.02.2019
3.3	18 Monate	20.03.2017	19.09.2018
3.5	18 Monate	20.03.2017	19.09.2018
3.8	18 Monate	21.08.2017	13.02.2019

3.1.5 Postoperatives Regime

Die Tiere wurden zehn Tage separat gehalten und dann die Fäden gezogen. Bis einschließlich sechs Tage nach der Operation erhielten die Tiere oral die Antibiose Amoxicillin/Clavulansäure 10 mg/kg KGW nach jeweils zwölf Stunden (Synulox, Pfizer, Berlin, Deutschland) sowie sieben Tage das Schmerzmittel 4 mg/kg KGW Carprofen (Rimadyl, Zoetis, Berlin, Deutschland) als Kautablette.

Erfahrene Tierpfleger führten über den ganzen Versuchszeitraum tägliche Begutachtungen mit Kontrollen der Wunden durch und beurteilten den klinischen Zustand. Postoperative Komplikationen wurden erfasst und behandelt (Tabelle 3).

Tabelle 3 Postoperative Komplikationen und Behandlung

In der Tabelle sind die postoperativen Komplikationen der Os frontale-Operation des jeweiligen Tiers sowie die Behandlung aufgelistet.

Tier	Komplikationen und Therapie
1.3	Keine Komplikationen
1.4	Keine Komplikationen
1.5	Keine Komplikationen
1.7	Keine Komplikationen
3.1	Keine Komplikationen
2.7	Keine Komplikationen
1.6	Nahtdehiszenz und Wundheilungsstörung, Behandlung mit systemischer Antibiose (10 mg/kg KGW Amoxicillin/Clavulansäure (Synulox, Zoetis, Berlin, Deutschland)), Schmerzmittel (4 mg/kg KGW Carprofen (Rimadyl, Zoetis, Berlin, Deutschland)) und lokale Wundbehandlung mit Acridinlösung, danach komplikationsloser Verlauf

2.1	Wundheilungsstörung, Wundrevision der Kopfnah 8 Tage postoperativ mit Drainage, Behandlung mit systemischer Antibiose (10 mg/kg KGW Amoxicillin/Clavulansäure (Synulox, Zoetis, Berlin, Deutschland)), Schmerzmittel (4 mg/kg KGW Carprofen (Rimadyl, Zoetis, Berlin, Deutschland)) und lokale Wundbehandlung mit Acridinlösung, danach komplikationsloser Verlauf
2.2	Keine Komplikationen
2.3	Wundheilungsstörung, Behandlung mit systemischer Antibiose (10 mg/kg KGW Amoxicillin/Clavulansäure (Synulox, Zoetis, Berlin, Deutschland)) und lokale Wundbehandlung mit Acridinlösung, danach komplikationsloser Verlauf
2.5	Wundheilungsstörung, Behandlung mit systemischer Antibiose (10 mg/kg KGW Amoxicillin/Clavulansäure (Synulox, Zoetis, Berlin, Deutschland)) und lokale Wundbehandlung mit Acridinlösung, danach komplikationsloser Verlauf
3.4	Keine Komplikationen
1.1	Keine Komplikationen
2.4	Wundheilungsstörung, Behandlung mit systemischer Antibiose (10 mg/kg KGW Amoxicillin/Clavulansäure (Synulox, Zoetis, Berlin, Deutschland)), Schmerzmittel (4 mg/kg KGW Carprofen (Rimadyl, Zoetis, Berlin, Deutschland)) und lokale Wundbehandlung mit Acridinlösung, danach komplikationsloser Verlauf
3.7	Keine Komplikationen
3.3	Keine Komplikationen
3.5	Keine Komplikationen
3.8	Keine Komplikationen

3.1.6 Euthanasie

Nach 6, 12 und 18 Monaten wurden die Tiere der jeweiligen Gruppe euthanasiert. Dafür wurden die Tiere intramuskulär mit 2 mg/kg KGW Xylazin (Xylapan, Vetoquinol, Ismaning, Deutschland) und 20 mg/kg KGW Ketamin (Ketasin, Virbac, Glattbrugg, Schweiz) anästhesiert und ein Venenkatheter in die Ohrvene eingelegt. Über diesen wurden 10 mg/kg KGW Propofol (Rapinovel, Bayer, Leverkusen, Deutschland) zur Narkosevertiefung verabreicht und schließlich 10 ml T61 (T61, Intervet, Haar, Deutschland) oder 60 mg/kg KGW Pentobarbital (Release, Wirtschaftsgenossenschaft deutscher Tierärzte, Garbsen, Deutschland) zur Euthanasie injiziert.

3.1.7 Entnahme der Knochenproben

Nach dem Euthanasieren wurde die Kopfhaut abpräpariert und das *Os frontale* mit einer Knochensäge herausgetrennt (Abb. 6). Um die dislozierten und teilweise resorbierten Implantate wiederzufinden, wurde für die Orientierung teilweise die Innenseite der Schädelkalotte genutzt (Abb. 7). Anschließend wurden die Implantate mit ausreichend Sicherheitsabstand zum Implantat aus der Schädelkalotte mit einer Knochenstanze von 19,9 mm Durchmesser herausgestanzt (Abb. 8).

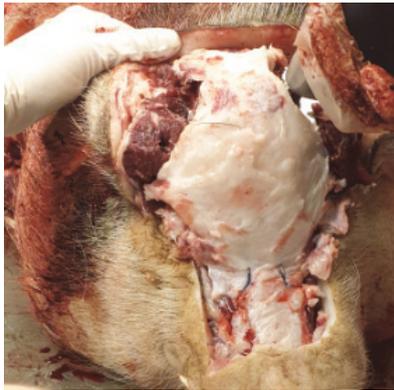


Abb. 6 Heraustrennen des Os frontale

Die Abbildung zeigt das Heraustrennen des Os frontale mit einer oszillierenden Säge.

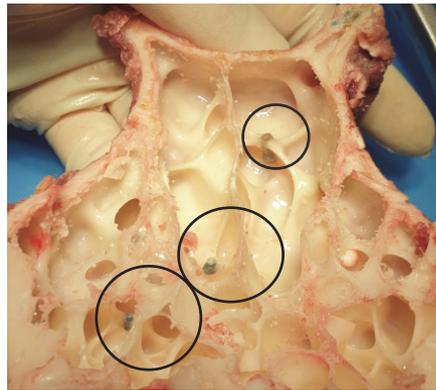


Abb. 7 Innenansicht des herausgetrennten Os frontale

Die Abbildung zeigt den herausgesägten Bereich des Os frontale mit Sicht auf die Innenseite. Innerhalb der Markierungen sind die Implantate zu erkennen.



Abb. 8 Entnommene Probe mit der Knochenstanze

In der Mitte der Probe ist ein Teil einer Schraube erkennbar.

Die herausgesägten Proben wurden mit einer Beschriftung des jeweiligen Implantats in eine Mullkompresse gewickelt und verknotet und anschließend in einem Gefäß gesammelt, das mit einer Fixierlösung gefüllt war, die aus 10%iger Formaldehydlösung (Merck, Darmstadt, Deutschland) bestand. Die Beschriftung enthielt die jeweilige Versuchsdauer (aufgeschrieben als 6M, 12M und 18M), die tierspezifische Identifikationsnummer sowie das Implantat (CMFU für die unbeschichteten und CMFB für beschichtete CMF-Schrauben) und die Schraubenummer (1 oder 2 für gleiche Implantate).

3.1.8 Radiologische Auswertung

3.1.8.1 Erstellung der Micro-CTs

Während die Proben in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert wurden, erfolgten die Aufnahmen der Micro-CT-Scans. Um Artefakte durch Bewegungen des Micro-CTs zu vermeiden, wurden die Proben in weitere Kompressen eingewickelt und so stabil in Falcon-Tubes fixiert, welche mit dem entsprechenden Alkohol aufgefüllt waren.

Nach Aufnahme des Scoutview, welcher einen Überblick über die Proben im Falcon-Tube zeigte, wurden die Scanbereiche für das Micro-CT gesetzt, wobei jeder gesetzte Scanbereich eine einzelne Probe enthielt. Die Aufnahme der Micro-CTs erfolgte mit den

Einstellungen Voxelgröße von 19 μm , 70 kVp, 114 A (VivaCT40, Scanco Medical AG, Brüttisellen, Schweiz).

3.1.8.2 Vorbereitung für die Analyse der Micro-CTs

Um die Scans mit dem Programm Fiji mit der ImageJ Version 1.52t zu bearbeiten und zu analysieren, wurden die Bilddateien zum Format DCM konvertiert. Für die Analysen nicht benötigte Bereiche wurden abgeschnitten, um die einzelnen Datengrößen möglichst gering zu halten.

Im Anschluss erfolgte der Import der Dateien in Fiji und die Kalibrierung mit einem Plugin nach mgHA/ccm (Milligramm Hydroxylapatit pro Kubikzentimeter). Die korrekte Kalibrierung wurde mit einem Kalibrationsphantom des Institutes mit bekannten Dichten und somit den dafür bekannten unterschiedlichen Grauwerten ermittelt.

3.1.8.2.1 Erstellung der VOI zur Analyse des Residualvolumens

Um das verbliebene Implantatmaterial analysieren zu können, wurde eine standardisierte VOI (volume of interest) für die Schrauben erstellt. Diese Standard-VOI entspricht dem dreidimensionalen Schraubenumriss und wurde hausintern aus einem nativen Implantat erstellt und als Zip-File gespeichert (Abb. 9). Das Volumen der Standard-VOI dient als Referenz für das Totalvolumen der Schraube. Gegenüber diesem wurde das verbleibende Schraubenmaterial der Implantate in der Analyse gestellt (SV/TV).

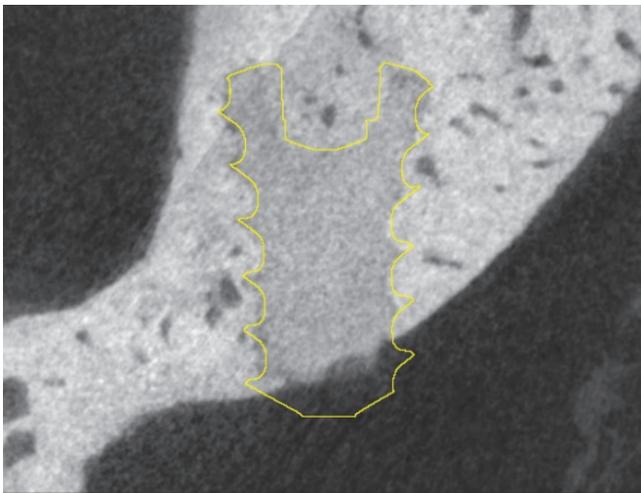


Abb. 9 Micro-CT-Scan einer Probe im Längsquerschnitt

Die Abbildung zeigt den noch vorhandenen Teil einer Schraube im Querschnitt ausgerichtet parallel zur Y-Achse, umrandet von einer schematischen zweidimensionalen Darstellung der Standard-VOI (gelbe Markierung).

Die Ausrichtung der Standard-VOI ist parallel zur Z-Achse definiert mit der an der Schraubenspitze gelegenen Kerbe rechts oben (Abb. 10, 11 und 12).

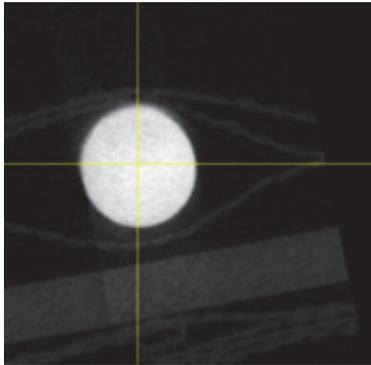


Abb. 10 Micro-CT-Scan einer nativen Schraube in Ausrichtung parallel zur Z-Achse

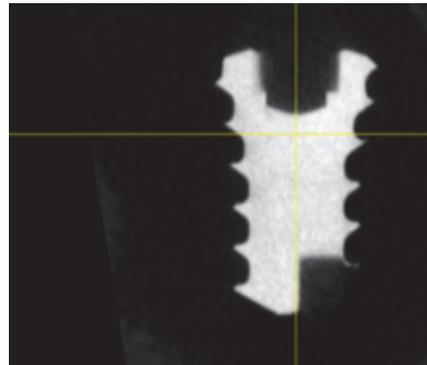


Abb. 11 Micro-CT-Scan einer nativen Schraube in Ausrichtung parallel zur Y-Achse

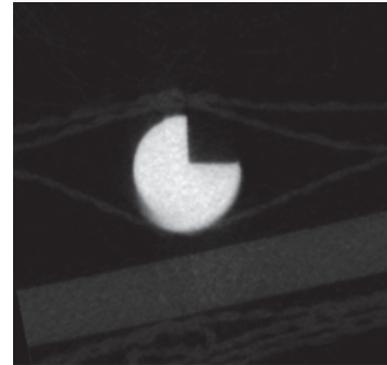


Abb. 12 Micro-CT-Scan im unteren Bereich einer nativen Schraube in Ausrichtung parallel zur Z-Achse

Die an der Schraubenspitze befindliche Kerbe ist rechts oben.

Damit die Standard-VOI für jede Schraube gleich gelegt werden konnte, mussten alle Schrauben gleich ausgerichtet werden. Das heißt, sie wurden entsprechend der Standard-VOI mit dem Schraubenkopf Richtung Nullpunkt und der Schraubenspitze parallel zur Z-Achse des Scans ausgerichtet. Dabei diente die Kerbe am Schraubenende immer als Orientierung für die Drehung der Schraube (Abb. 13, 14 und 15). Die Speicherung der Scans erfolgte grundsätzlich im Tiff-Format.

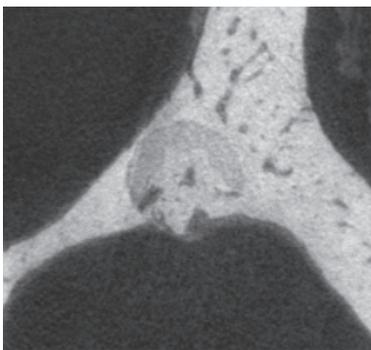


Abb. 13 Micro-CT-Scan einer beschichteten Schraube nach 12 Monaten Versuchszeit, Ausrichtung parallel zur Z-Achse im Bereich des Schraubenkopfes mit TORX (Schraubenmitnahmeprofil, auch Innensechsrund genannt)

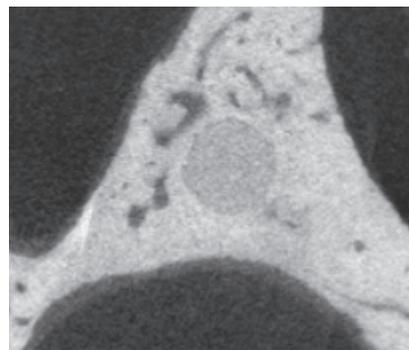


Abb. 14 Micro-CT-Scan einer beschichteten Schraube nach 12 Monaten Versuchszeit, Ausrichtung parallel zur Z-Achse im mittleren Bereich der Schraube

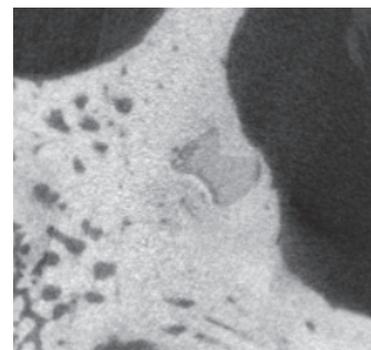


Abb. 15 Micro-CT-Scan einer beschichteten Schraube nach 12 Monaten Versuchszeit, Ausrichtung parallel zur Z-Achse im Bereich der Schraubenspitze mit Kerbe rechtsseitig oben

Die Standard-VOI wurde dann genau auf die Schraube des jeweiligen Scans gelegt und als RoiSet1x abgespeichert (Abb. 16, 17 und 18).

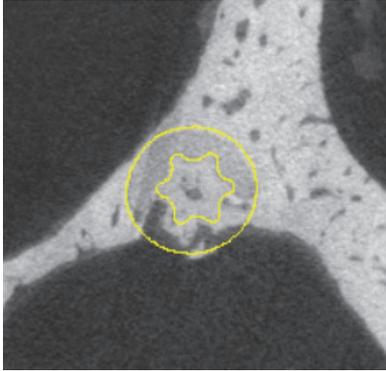


Abb. 16 Micro-CT-Scan einer Probe nach 12 Monaten Versuchszeit, Standard-VOI im Bereich des Schraubenkopfes

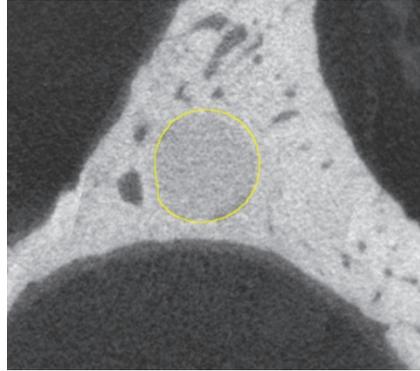


Abb. 17 Micro-CT-Scan einer Probe nach 12 Monaten Versuchszeit, Standard-VOI im mittleren Teil der Schraube

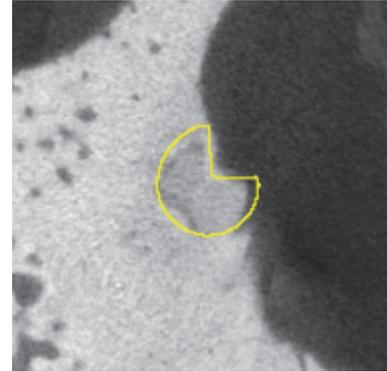


Abb. 18 Micro-CT-Scan einer Probe nach 12 Monaten Versuchszeit, Standard-VOI im Bereich der Schraubenspitze mit befindlicher Kerbe rechtsseitig oben

3.1.8.2 Erstellen der VOIs zur Analyse des umliegenden Knochens

Zur Untersuchung der Reaktion des Knochens auf die Degradation wurde ein Auswertungsbereich zwischen dem ursprünglichen Schraubenumriss und einem 0,5 mm vergrößerten Umriss gewählt, da hier die größte Reaktion des Knochens auf das degradierende Material zu erwarten war und um ausschließlich Veränderungen in Nähe des Implantats zu erfassen. Die Festlegung des zweiten Auswertungsbereichs erfolgte nach der Erstuntersuchung der Micro-CT-Scans sowie der histomorphometrischen Proben auf den Bereich zwischen ursprünglicher Implantatgrenze und 1,5 mm Vergrößerung, da bis dorthin Veränderungen in der Knochenstruktur festzustellen waren (Abb. 19 und 20), und der Bereich somit Rückschlüsse auf das Gesamtverhalten des Knochens hinsichtlich der Degradation vermuten lässt.

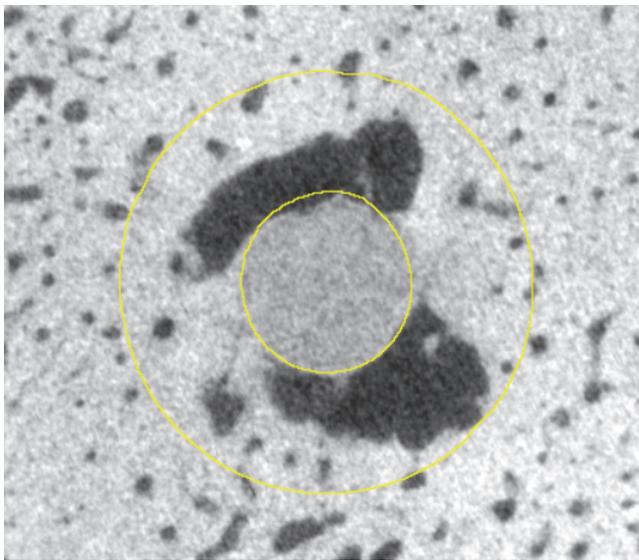


Abb. 19 Knochenveränderungen im Micro-CT-Scan bis 1,5 mm um das ursprüngliche Implantat

Die Abbildung zeigt einen Micro-CT-Scan einer unbeschichteten Probe nach 6 Monaten Versuchszeit (6M 3.1 CMFU1). Die Auffälligkeiten im Knochen gehen bis zum äußeren gelben Ring in 1,5 mm Entfernung zur ursprünglichen Implantatgrenze (innerer gelber Ring).

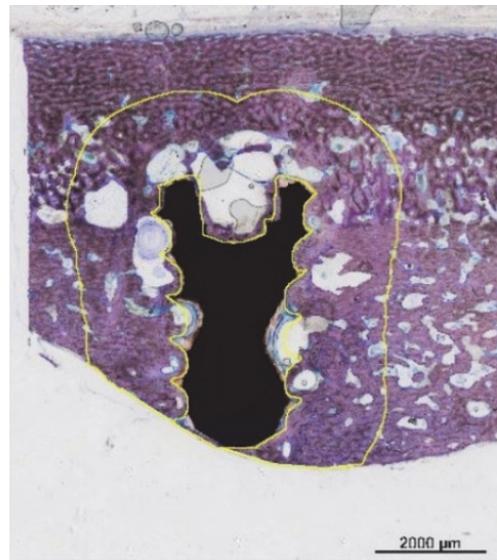


Abb. 20 Knochenveränderungen im histologischen Bild bis circa 1,5 mm um das ursprüngliche Implantat

Das histomorphometrische Bild einer beschichteten Probe nach 6 Monaten Versuchszeit (6M 3.1 CMFB2) zeigt, dass Veränderungen im Knochen bis zur äußeren gelben Markierung in 1,5 mm Entfernung der ursprünglichen Implantatgrenze (innere gelbe Markierung) sichtbar sind.

Für die radiologische Analyse des umliegenden Knochens wurde der VOI „RoiSet1x“, die den ursprünglichen Schraubenumriss zeigt, ein vergrößerter Umriss von 0,5 mm und 1,5 mm hinzugefügt. Da ein Großteil der Schrauben disloziert war und die erstellten Auswertungsbereiche Teile des *Sinus frontalis* einschlossen (Abb. 21 und 22), wurden die Auswertungsbereiche mithilfe eines Makros und, sofern es notwendig war, anschließend manuell individuell angepasst.

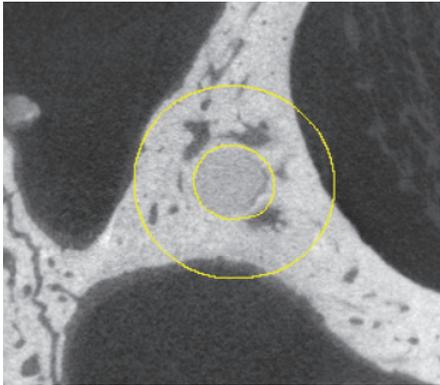


Abb. 21 VOI zur Auswertung des umliegenden Knochens ohne Berücksichtigung des *Sinus frontalis*

Der Micro-CT-Scan einer Probe mit Ausrichtung parallel zur Z-Achse zeigt den mittleren Teil der Schraube. Der Auswertungsbereich 1,5 mm befindet sich zwischen der inneren und äußeren gelben Markierung und schließt Bereiche des *Sinus frontalis* mit ein.

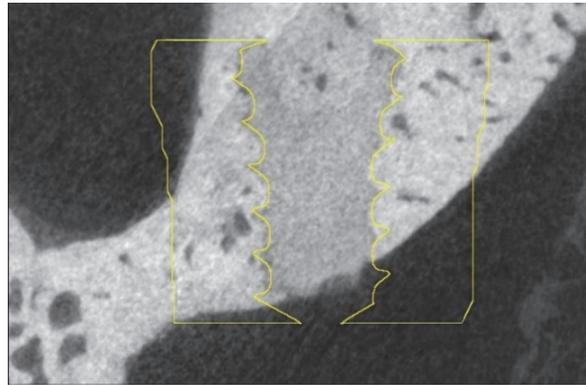


Abb. 22 Schematische Darstellung der VOI zur Auswertung des umliegenden Knochens ohne Berücksichtigung des *Sinus frontalis* im Längsquerschnitt

Micro-CT-Scan einer Probe mit Ausrichtung parallel zur Y-Achse. Schematische Darstellung des Auswertungsbereichs vom äußeren Rand des Implantats (Implantat in der Mitte im Bild als Umriss erkennbar) bis 1,5 mm umgebend, als zweidimensionales Bild, schließt Teile des *Sinus frontalis* in den Auswertungsbereich mit ein.

Die fertigen VOIs „Roi-TT-0,5-V“ (Abb. 23 und 24) und „Roi-TT-1,5-V“ (Abb. 25 und 26) entsprechen dem Totalvolumen der 0,5- bzw. 1,5-mm-Umgebung des Implantats, dem das Volumen des mineralisierten Knochens innerhalb dieses Bereichs in der Analyse gegenübergestellt wurde (BV/TV 0,5 und BV/TV 1,5).

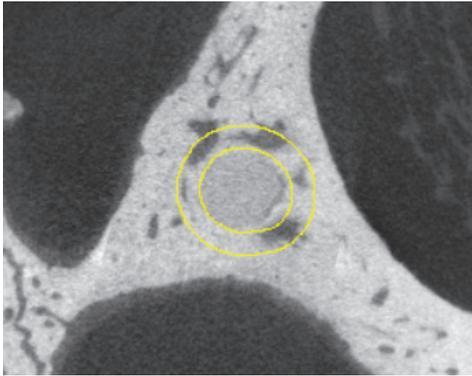


Abb. 23 VOI zur Auswertung des mineralisierten Knochenanteils bis 0,5 mm zur ursprünglichen Implantatgrenze

Der Micro-CT-Scan zeigt den mittleren Teil der Schraube in Ausrichtung parallel zur Z-Achse mit dem Auswertungsbereich der fertigen VOI „Roi-TT-0,5-V“ innerhalb der gelben Markierungen nach der Anpassung.

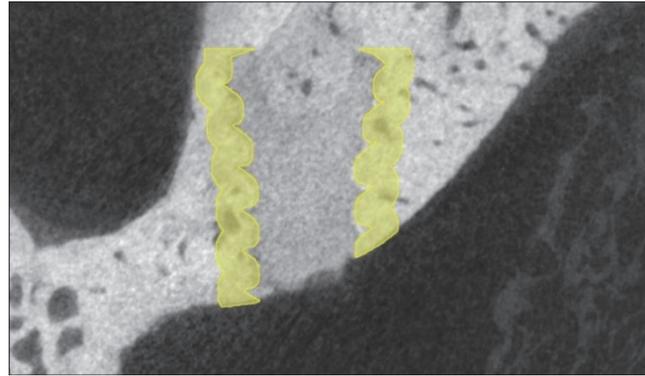


Abb. 24 Schematische Darstellung der VOI zur Auswertung des mineralisierten Knochenanteils bis 0,5 mm zur ursprünglichen Implantatgrenze im Längsquerschnitt

Der Micro-CT-Scan in Ausrichtung parallel zur Y-Achse zeigt eine schematische Darstellung des Auswertungsbereichs der fertigen VOI „Roi-TT-0,5-V“. Als gelber Bereich ist der äußere Rand des Implantats bis 0,5 mm Entfernung nach der Anpassung im zweidimensionalen Bild dargestellt.

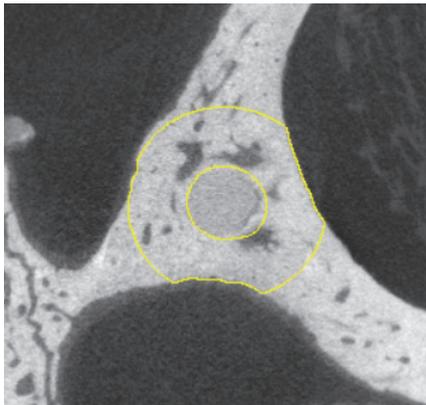


Abb. 25 VOI zur Auswertung des mineralisierten Knochenanteils bis 1,5 mm zur ursprünglichen Implantatgrenze

Der Micro-CT-Scan zeigt den mittleren Teil einer Schraube in Ausrichtung parallel zur Z-Achse mit dem Auswertungsbereich der fertigen VOI „Roi-TT-1,5-V“ innerhalb der gelben Markierungen nach der Anpassung.

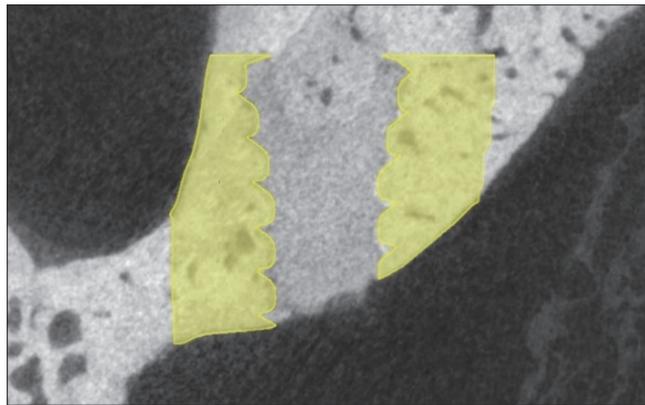


Abb. 26 Schematische Darstellung der VOI zur Auswertung des mineralisierten Knochenanteils bis 1,5 mm zur ursprünglichen Implantatgrenze im Längsquerschnitt

Der Micro-CT-Scan einer Schraube in Ausrichtung parallel zur Y-Achse zeigt eine schematische Darstellung des Auswertungsbereichs der fertigen VOI „Roi-TT-1,5-V“. Als gelber Bereich ist der äußere Rand des Implantats bis 1,5 mm Entfernung nach der Anpassung im zweidimensionalen Bild dargestellt.

3.1.8.2.3 Ermittlung der Thresholds für die Analyse der Micro-CT-Scans

Die Analyse der Micro-CTs erfolgte mit einem institutseigenen ImageJ-Makro. Micro-CT-Bilder stellen durch unterschiedliche Grauwerte unterschiedliche Dichten von Materialien dar. Somit war es notwendig, die Thresholds, also die Grenzwerte der Grauwerte, zu ermitteln, bei denen sich die verschiedenen Materialien voneinander separieren.

Für die Untersuchung des Residualvolumens wurden diejenigen Thresholds für die Grauwerte ermittelt, bei denen sich Luft von Schraube sowie Schraube von Knochen unterschied. Anhand des Grauwertbereichs für die Dichte der Schraube konnte dann bei der Analyse der noch nicht resorbierte Anteil der Schraube innerhalb des ursprünglichen Schraubenumrisses berechnet werden.

Der „untere“ Threshold stellt den Grenzwert für die Separation von Luft zu Schraube und Knochen dar, da die Dichten der beiden Materialien ähnlich sind. Dieser „untere“ Threshold wurde für jede 6-Monatsprobe einerseits mit der Histogrammfunktion für die Grauwerte des ganzen Scans und andererseits in Bereichen des Scans, in welchen sich sowohl Luft als auch Schrauben- und Knochenmaterial befanden, sowie mit der Thresholdfunktion ermittelt. Anschließend wurde ein Gesamtmittelwert aller 6-Monatsproben gebildet, welcher als Referenz für alle Scans benutzt wurde (Tabelle 4).

Der gemittelte Threshold, bei dem sich Luft von Schraube und Knochen separierte, ergab

435 mgHA/ccm. Zur Bestimmung des „oberen“ Threshold, dem Grenzwert, bei dem sich Schraube von Knochen unterscheidet, wurde aus den maximalen Grauwerten der Scans beider nativen Schrauben an sechs gleichen Stellen der VOI RoiSet1x der Mittelwert erstellt. Die Werte und der Mittelwert wurden auf eine ganze Zahl gerundet (Tabelle 5). Der ermittelte Wert wurde anhand der Thresholdfunktion überprüft und stellte den Schwellenwert dar, bei dem sich Schraube von Knochen unterschied. Der Wert lag bei 860 mgHA/ccm.

Tabelle 4 Threshold Luft-Schraube/ Knochen

Die ermittelten „unteren“ Thresholdwerte jeder 6-Monatsprobe, gerundet auf ganze Zahlen, sowie deren Mittelwert gerundet auf eine ganze Zahl.

6-Monats- probe	Threshold Luft -Schraube/Knochen
2.7-CMFB1	420
1.7-CMFB1	450
3.1-CMFB1	390
3.1-CMFB2	450
1.7-CMFB2	450
2.7-CMFB2	445
1.4-CMFB2	350
1.5-CMFB1	430
1.5-CMFB2	400
1.4-CMFB1	380
1.3-CMFB2	390
2.7-CMFU1	420
3.1-CMFU1	470
1.7-CMFU1	420
3.1-CMFU2	500
1.7-CMFU2	460
2.7-CMFU2	470
1.4-CMFU2	450
1.5-CMFU1	450
1.5-CMFU2	445
1.3-CMFU2	530
1.4-CMFU1	400
1.3-CMFU1	445
Mittelwert	435

Tabelle 5 Threshold Schraube-Knochen

Die ermittelten maximalen Grauwerte beider nativen Schrauben an sechs gleichen Stellen der VOI RoiSet1x, auf ganze Zahlen gerundet, sowie der daraus gebildete Mittelwert, auf eine ganze Zahl gerundet, ergab nach Überprüfung den Thresholdwert für die Separation von Implantatmaterial und Knochen.

	CMFB	CMFU
Roi1x an Stelle 50	871	872
Roi1x an Stelle 100	876	867
Roi1x an Stelle 128	867	857
Roi1x an Stelle 150	864	864
Roi1x an Stelle 200	853	890
Roi1x an Stelle 250	834	808
Mittelwert	860	

Der Bereich zwischen dem „unteren“ und dem „oberen“ Threshold ist in Grauwerten ausgedrückt von 435 bis 860 mgHA/ccm und stellt die Dichte des Implantatmaterials dar. Die Quantifizierung des Residualvolumenanteils der Schrauben konnte dann innerhalb der RoiSet1x, welche den Umriss der ursprünglichen Schraube darstellt und als Referenzvolumen galt, mit diesen Einstellungen erfolgen (Abb. 27 und 28).

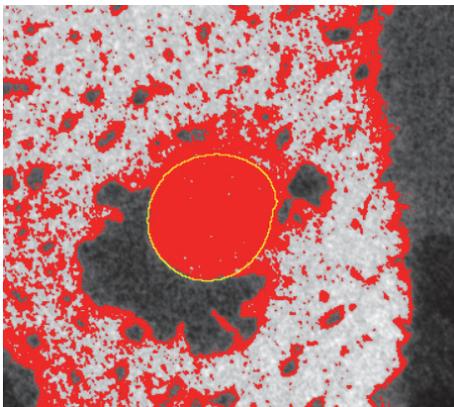


Abb. 27 Kontrolle des ermittelten Thresholdbereichs für die Quantifizierung der Schraube im mittleren Bereich der Schraube im Micro-CT-Scan

Rot angefärbt sind die Grauwerte, welche dem Implantatmaterial entsprechen. Dieses wurde innerhalb der RoiSet1x quantifiziert, welche als gelbe Abgrenzung dargestellt ist.

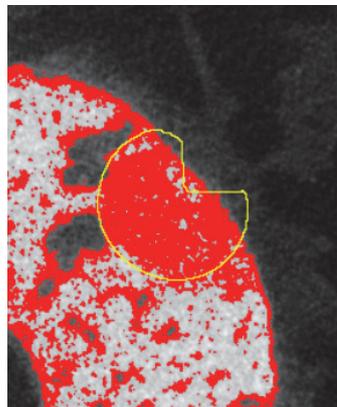


Abb. 28 Kontrolle des ermittelten Thresholdbereichs für die Quantifizierung der Schraube im unteren Bereich der Schraube im Micro-CT-Scan

Rot angefärbt sind die Grauwerte, welche dem Implantatmaterial entsprechen. Dieses wurde innerhalb der RoiSet1x quantifiziert, welche als gelbe Abgrenzung dargestellt ist.

Innerhalb der Proben stellt mineralisierter Knochen das Material mit der höchsten Dichte und somit höchsten Grauwerten dar. Daher wurde für die Quantifizierung des mineralisierten Knochens als „oberer“ Thresholdwert der höchste Grauwert des jeweiligen Scans angenommen. Somit konnte der Volumenanteil an mineralisierten Knochen innerhalb des jeweiligen Auswertungsbereichs Roi-TT-0,5-V und Roi-TT-1,5-V vom „unteren“ Threshold bis zum höchsten Grauwert der jeweiligen Probe erfasst werden (Abb. 29 und 30).

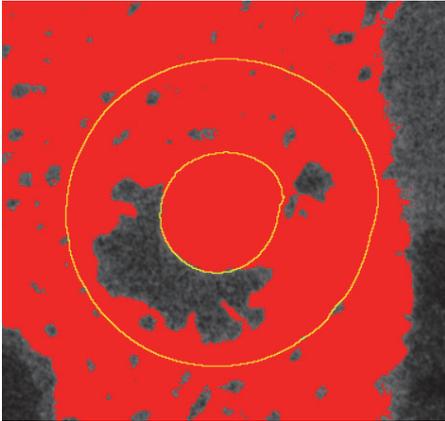


Abb. 29 Kontrolle des ermittelten Thresholdbereichs für die Quantifizierung von mineralisierten Knochen im Micro-CT-Scan im mittleren Bereich der Schraube

Rot angefärbt sind die Grauwerte, welche dem mineralisierten Knochen entsprechen. Der Bereich zwischen innerer und äußerer gelber Markierung entspricht dem Auswertungsbereich Roi-TT-1,5-V, in welchem der Volumenanteil an mineralisiertem Knochen berechnet wurde.

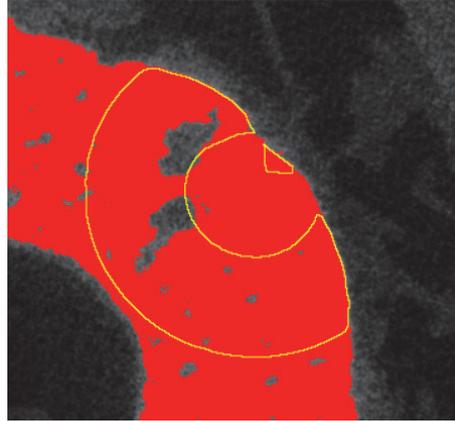


Abb. 30 Kontrolle des ermittelten Thresholdbereichs für die Quantifizierung von mineralisierten Knochen im Micro-CT-Scan im unteren Bereich der Schraube

Rot angefärbt sind die Grauwerte, welche dem mineralisierten Knochen entsprechen. Der Bereich zwischen innerer und äußerer gelber Markierung entspricht dem Auswertungsbereich Roi-TT-1,5-V, in welchem der Volumenanteil an mineralisiertem Knochen berechnet wurde.

Um einheitliche farbliche 3D-Rekonstruktionen abbilden zu können, wurde eine Ober- und Untergrenze der dargestellten Grauwerte festgelegt (-200 bis 1800 mgHA/ccm), welchen dann Farben zugeordnet wurden.

3.1.8.2.4 Radiologische Referenzmessungen

Beide nativen Schrauben wurden ohne vorherige Implantation in ein Versuchstier, im Micro-CT gescannt. Die Scans wurden wie beschrieben bearbeitet und ebenfalls die VOI RoiSet1x zur Bestimmung des verbliebenen Schraubenanteils für die Scans erstellt. Die Analyse des Residualvolumens zeigt eine Abweichung von 100% (Tabelle 6) und erklärt sich durch den gemittelten Thresholdwert und Scanartefakte sowie durch Ungenauigkeiten des Auswertungsbereichs, bedingt durch die raue Oberfläche der Schraube.

Tabelle 6 Quantifizierung des Residualvolumens der beiden nativen Schrauben

Das Residualvolumen wurde als Anteil noch nicht resorbierten Implantatmaterials im Auswertungsbereich berechnet ($SV/TV = \text{Screw volume}/\text{Total volume}$).

Probe	SV/TV [%]
CMFBnativ	94,5
CMFUativ	91,0

Ebenso wurden für 6 entnommene Nativproben ohne Implantatmaterial jeweils die Auswertungsbereiche Roi-TT-0,5-V und Roi-TT-1,5-V erstellt und mit dem ermittelten Thresholdbereich für mineralisierten Knochen analysiert. Der Volumenanteil mineralisierten Knochens innerhalb des Auswertungsbereichs bezogen auf das Gesamtvolumen des jeweiligen Auswertungsbereichs wurde erfasst (Tabelle 7).

Tabelle 7 Ergebnis der Analyse des Knochenanteils von 6 Nativproben in beiden Auswertungsbereichen

Die Tabelle enthält das Ergebnis der Analyse des Knochenanteils von 6 Nativproben in beiden Auswertungsbereichen. Der Volumenanteil des mineralisierten Knochens (BV) ist innerhalb des jeweiligen Auswertungsbereichs bezogen auf das Gesamtvolumen (TV) des jeweiligen Auswertungsbereichs, inklusive des Mittelwertes der Ergebnisse gerundet auf 2 Nachkommastellen, angegeben ($BV/TV = \text{Bone volume}/\text{Total volume}$).

	BV/TV [%] Roi-TT-0,5-V	BV/TV [%] Roi-TT-1,5-V
18M-1.1-nativ_2639	95,93	95,85
18M-3.7-nativ_2674	91,29	91,17
18M-3.8-nativ_2679	98,04	97,52
18M-3.7-nativ_2685	82,7	82,63
18M-3.8-nativ_2696	76,72	78,54
12M-3.4-nativ_5195	96,14	95,67
Mittelwert	90,14	90,23

3.1.8.2.5 Darstellung der VOIs als 3D-Projektion

Neben der Berechnung des Residualvolumens und der Berechnung des Volumenanteils an mineralisiertem Knochen in den jeweiligen Auswertungsbereichen jeder Probe wurden 3D-Rekonstruktionen für die unterschiedlichen Grauwerte des Micro-CTs innerhalb des Thresholdbereichs erstellt. Den Grauwerten wurden Farben zugeordnet, wobei sich das Magnesiumimplantat vorwiegend aus Blautönen zusammensetzt und der mineralisierte Knochen vorwiegend aus Grüntönen. Dabei sieht man im Vergleich der dreidimensionalen Darstellungen des Residualvolumens eine intakte native Schraube und bei einer nach zwölf Monaten entnommenen Probe Substanzverluste (Abb. 31).

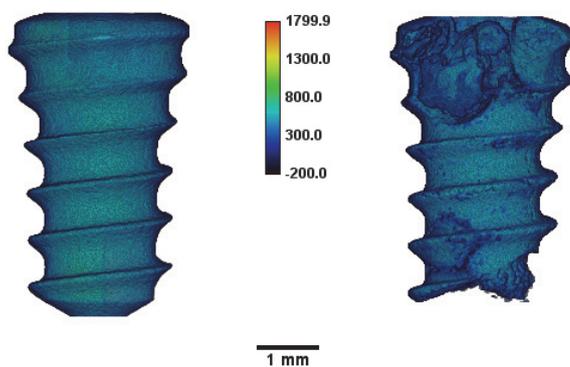


Abb. 31 3D-Rekonstruktionen des Implantatmaterials innerhalb der VOI RoiSet1x

Links ist ein Nativimplantat, rechts eine nach 12 Monaten entnommene beschichtete Probe. In der Mitte ist unten ein Maßstab in Millimeter und oben die Farbskala, welche die Grauwerte in mgHA/ccm des Micro-CTs in ein anderes Farbschema überträgt.

Im Vergleich der Analyse des mineralisierten Knochens zur Nativprobe sieht man sowohl in der VOI Roi-TT-0,5-V als auch in der Roi-TT-1,5-V eine homogene Verteilung des mineralisierten Knochens und einen hypothetischen Hohlraum eines Implantats. Bei der 3D-Darstellung des mineralisierten Knochens um eine unbeschichtete Schraube zeigen sich in beiden VOIs deutliche Hohlräume und Unebenheiten, ausgehend von der ursprünglichen Implantatgrenze (Abb. 32 und 33).

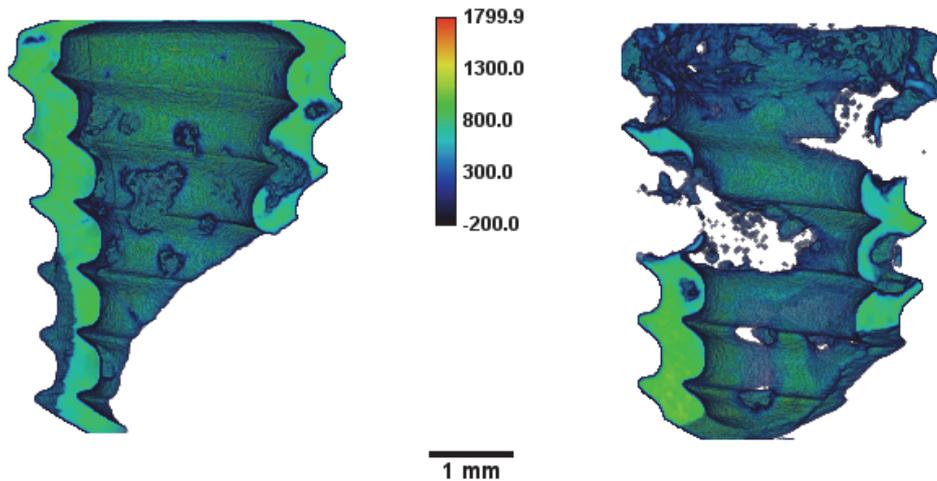


Abb. 32 3D-Rekonstruktionen des mineralisierten Knochens innerhalb der VOIs Roi-TT-0,5-V als Querschnitt

Die Abbildung zeigt die 3D-Rekonstruktion des mineralisierten Knochens innerhalb der VOIs Roi-TT-0,5-V als Querschnitt. Links ist eine Nativprobe, rechts der mineralisierte Knochen um eine nach 6 Monaten entnommene unbeschichtete Probe. In der Mitte unten ist ein Maßstab in Millimeter und oben die Farbskala, welche die Grauwerte des Micro-CTs in ein Farbschema überträgt.

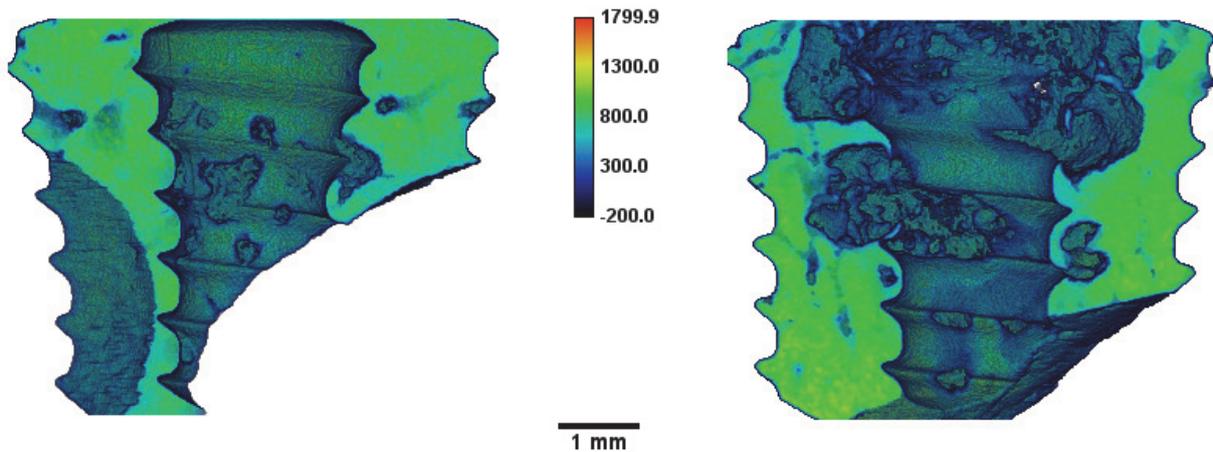


Abb. 33 3D-Rekonstruktionen des mineralisierten Knochens innerhalb der VOIs Roi-TT-1,5-V als Querschnitt

Die Abbildung zeigt die 3D-Rekonstruktion des mineralisierten Knochens innerhalb der VOIs Roi-TT-1,5-V als Querschnitt. Links ist eine Nativprobe, rechts der mineralisierte Knochen um ein nach 6 Monaten entnommenes unbeschichtetes Implantat. In der Mitte unten ist ein Maßstab in Millimeter und oben die Farbskala, welche die Grauwerte des Micro-CTs in ein Farbschema überträgt.

3.1.9 Histomorphometrische Untersuchung

3.1.9.1 Vorbereitung der Proben

Nachdem die Micro-CT-Scans erstellt waren, wurde je eine Seite der runden Knochenstanze mit einer Schleifmaschine (MetaServ™ 250, Buehler, Lake Bluff) plan geschliffen, um bei der späteren Einbettung ein Kippen der Präparate zu vermeiden. Zum Kühlen und Feuchthalten wurde dabei Ethanol verwendet.

3.1.9.2 Fixierung, Entwässerung und Entfettung

Damit die Medien während der einzelnen Schritte der Fixierung, Entwässerung und Entfettung die Proben vollständig infiltrierten, wurden diese währenddessen auf einem Schüttler gelagert (Laboshake, C. Gerhardt, Königswinter, Deutschland).

Nach der Entnahme der Proben verblieben diese zur Fixierung für sieben Tage in einer 10%igen Formaldehydlösung und wurden anschließend für circa eine Stunde unter fließendes Leitungswasser gestellt, um die Fixierlösung zu entfernen. Danach begann mit einer aufsteigenden Alkoholreihe die manuelle Entwässerung (Tabelle 8). Dabei wurde ausgehend von 100%igem Ethanol (Ethanol, absolut vergällt, Herbeta Arzneimittel, Berlin, Deutschland) die jeweilige Verdünnung händisch hergestellt.

Tabelle 8 Entwässerungsschema der Proben

Die Entwässerung der Proben erfolgte mit einer aufsteigenden Alkoholreihe nach dem in der Tabelle dargestellten Schema.

Medium	Verbleib im Medium
70% Ethanol	7 Tage
80% Ethanol	7 Tage
96% Ethanol	2 x 7 Tage
100% Ethanol	3 x 7 Tage

Nach jedem Wechsel des jeweiligen Mediums wurde für zehn Minuten mittels eines Exsikkators (Exakt, Norderstedt, Deutschland) bei circa 400 mbar ein Vakuum erzeugt und aufrechterhalten, um potentielle Luftblasen zu entfernen.

Die 24-stündige Lagerung in Xylol (Xylene, J.T. Baker, Deventer, Niederlande) diente nach der Entwässerung zur Entfettung der Proben und zur Verdrängung des Alkohols. Das Intermedium Xylol kann sich im Gegensatz zum Alkohol im folgenden Schritt mit dem Einbettungsmedium vermischen.

3.1.9.3 Präinfiltration, Infiltration und Einbettung

Als Basis für alle folgenden Lösungen der Präinfiltration, Infiltration und Einbettung diente die entstabilisierte Basislösung. Diese wurde hergestellt, indem die Technovit-Basislösung (Technovit 9100 Neu Basislösung I, Kulzer, Hanau, Deutschland) durch eine Chromatographiesäule laufen gelassen wurde, welche mit Baumwollwatte gestopft und mit 50 g Aluminiumoxid (Merck, Darmstadt, Deutschland) gefüllt war.

Um eine homogene Präinfiltrationslösung herzustellen, wurden auf einem Magnetrührer pro 400 ml Basislösung je 2 g Härter 1 (Technovit 9100 Härter 1, Kulzer, Hanau, Deutschland) mit einem Rührfisch 30 Minuten vermischt. Um Luftblasen im Medium und an den Proben zu eliminieren, welche die homogene Infiltration von der Lösung behindern und somit die vollständige Einbettung der Proben behindern würde, wurde erneut mit dem Exsikkator ein 10-minütiges Vakuum bei circa 400 mbar erzeugt. Danach verblieben die Proben für fünf Tage bei 4 °C im Medium.

Zum Herstellen der Infiltrationslösung wurden in einem Erlenmeyerkolben mit Hilfe eines Rührfisches 400 ml Basislösung und 40 g PMMA-Pulver (Technovit 9100 Pulver, Kulzer, Hanau, Deutschland) vermischt und anschließend mit Basislösung auf 500 ml aufgefüllt. Die Rührdauer auf dem Magnetrührer, bis das PMMA-Pulver vollständig in Lösung gegangen war und das Medium klar wurde, betrug zwei Stunden. Anschließend wurden 2 g Härter 1 hinzugegeben und die Lösung erneut 20 Minuten verrührt. Nachdem die Proben mit der Infiltrationslösung bedeckt waren, wurde erneut der Exsikkator, wie in den vorherigen Bearbeitungsschritten, verwendet. Die Proben verblieben für sieben Tage bei 4 °C in der Infiltrationslösung. Die Schritte der Infiltration wurden dann ein zweites Mal identisch wiederholt und die Proben nochmals für sieben Tage bei 4 °C im Medium aufbewahrt. Um 500 ml Stammlösung A herzustellen, wurde mit Hilfe des Magnetrührers in einem Erlenmeyerkolben 350 ml Basislösung mit 80 g PMMA-Pulver vermischt und das fehlende Volumen mit Basislösung aufgefüllt. Nach circa zwei Stunden wurde das Gemisch klar und das PMMA-Pulver war vollständig aufgelöst. Als letztes wurden 3 g Härter 1 hinzugegeben und weitere 20 Minuten vermischt. Die Stammlösung B wurde aus 44 ml Basislösung und 4 ml Härter 2 (Technovit 9100 Härter 2, Kulzer) in einem Erlenmeyerkolben mit Hilfe eines Rührfisches und 2 ml Regler (Technovit 9100 Regler, Kulzer, Hanau, Deutschland) verrührt. Aus vorsichtiger Mischung von Stammlösungen A und B im Verhältnis 9:1 wurde in einem Messzylinder das Polymerisationsgemisch hergestellt.

Die Einbettformen wurden mit beschrifteten Zetteln zur Probenidentifikation präpariert. Anschließend wurden die Proben aus der Infiltrationslösung in die Form gegeben und mit der plan angeschliffenen Kante nach unten ausgerichtet und mit dem Polymerisationsgemisch aufgefüllt (Abb. 34). Nach zehn Minuten bei 400 mbar im Exsikkator wurden mit Hilfe einer Pipette Luftblasen, welche sich den Proben anlagerten, entfernt. Dann wurden die

Einbettformen mit einem Deckel verschlossen und für 48 Stunden zum Aushärten bei $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ in einen Kühlschrank gegeben. Die fertigen Blöcke konnten dann aus den Formen einfach herausgelöst werden.

Die eingebetteten entnommenen Knochenstanzen wurden zu Gewebeschliffen, welche die Implantate im Längsquerschnitt mit dem umliegenden Gewebe zeigten, bearbeitet. Diese wurden anschließend gefärbt und digitalisiert. Mithilfe einer Software konnte dann das noch verbliebene Schraubenmaterial sowie die Flächenanteile an mineralisierten Knochen um die Implantate berechnet werden.

Dafür war es zunächst notwendig, die korrekte Schliffebene der Implantate aus den Blöcken zu erstellen. Zur Orientierung für den Anschliff der Proben erwies es sich als Vorteil, dass sich die darin befindlichen Implantate dunkler darstellten als der umliegende Knochen (Abb. 35). Unter Sichtkontrolle wurden die Blöcke dann bis kurz vor den Längsquerschnitt des Implantats mit einer Präzisionsschleifmaschine (Präzisions-Mikro-Schleifsystem Exakt 400 CS, Exakt) angeschliffen. Da die Blöcke eine bestimmte Größe für die Einspanneinrichtung am Mikrotom besitzen mussten, wurden die Seiten rechteckig zueinander geschliffen und wenn nötig die Blöcke mit der Aufblockmasse (Technovit 3040, Kulzer, Hanau, Deutschland) angepasst. Mit dem Hartschnittmikrotom (Leica RM 2255, Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland) konnte der exakte Längsquerschnitt der Implantate gewonnen werden (Abb. 36), ohne gröbere Schleifspuren auf den Proben zu haben. Wenn es notwendig war, konnte zudem mit der Feineinstellung die angeschliffene Ebene korrigiert werden. Die entstandene Schnittebene der Blöcke wurde für die Herstellung der Schliffe genutzt.



Abb. 34 Knochenprobe im Einbettmedium

Die bearbeitete Knochenstanze mit beschriftetem Zettel zur Identifikation der Probe in der Einbettform im Polymerisationsgemisch.



Abb. 35 Fertig ausgehärtete Probe

Der fertige PMMA-Block, darin die Knochenprobe und das darin befindliche Implantat als dunklerer Bereich erkennbar.

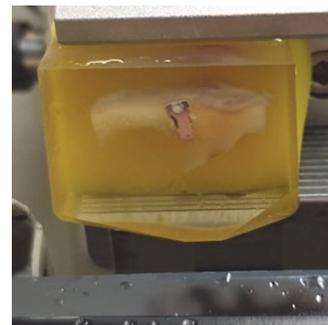


Abb. 36 Im Hartschnittmikrotom eingespannter Block

Zeigt die eingespannte Probe mit dem Längsquerschnitt des Implantats und dem umliegenden Gewebe.

3.1.9.4 Herstellung der Schliffe

Die Blöcke wurden dann mittels Trenn-Dünnschliff-Technik zu circa 100 µm dicken Schliffen bearbeitet. Dafür wurde die Rückseite der Blöcke parallel zur Schnittfläche mit der Präzisionsschleifmaschine (Präzisions-Mikro-Schleifsystem, Exakt) geschliffen (Schleifpapier 220er Körnung, Schleifdauer nach Bedarf) und mit doppelseitigem Klebeband auf einem Plexiglasobjektträger fixiert. Die Dicke des somit entstandenen Block-Klebeband-Objektträger-Verbundes sowie ein weiterer Objektträger wurden mit einer Mikrometerschraube gemessen und notiert.

Vor dem Aufkleben der Schnittfläche auf den zweiten Objektträger wurden diese mit Petroleumbenzin (Suprasolv, Merck, Darmstadt, Deutschland) gereinigt und dann der Präzisionskleber (Präzisionskleber, Kulzer, Hanau, Deutschland) auf die Schnittfläche aufgetragen. Das Zusammenfügen und die Aushärtung erfolgte in der Präzisionsklebepresse unter UV-Licht (Präzisionsklebepresse Exakt 310 CP, Exakt) für acht Minuten und resultierte in einem fertigen Objektträger-Block-Objektträger-Verbund (Abb. 37).

Die Dicke des so entstandenen „Sandwich“ (Objektträger-Block-Objektträger) wurde anschließend wieder vermessen. Mit den vorherigen Messungen des Block-Klebeband-Objektträger-Verbundes und des einzelnen Objektträgers wurde die Dicke der Klebeschicht berechnet. Dies war für die folgenden Schritte notwendig, um eine reine Schliffdicke am Ende der Bearbeitung für alle Proben mit einheitlich 100 µm zu erreichen.

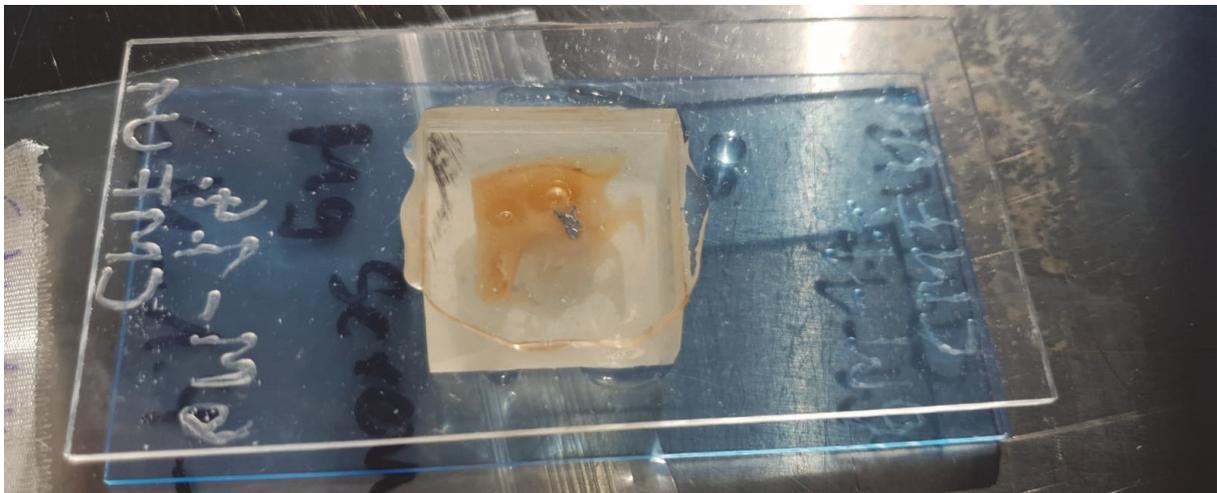


Abb. 37 Fertig geklebtes „Sandwich“

Die Implantatschnittfläche ist mit Präzisionskleber an den oberen Objektträger geklebt und die Rückseite des Blocks ist mit doppelseitigem Klebeband an den unteren Objektträger geklebt.

Eine circa 300 µm dicke Scheibe wurde mit der Bandsäge (Diamant Bandsäge, Exakt 310 CP, Exakt) abgesägt (Abb. 38). Die so entstandenen Schliffe wurden erneut mit der Präzisionsschleifmaschine (Schleifpapier 1200 Körnung) bis auf 100 µm Präparatdicke heruntergeschliffen und anschließend mit Schleifpapier 2500er Körnung für fünf Minuten und danach mit Schleifpapier 4000er Körnung für fünf Minuten poliert.

Für die Unterscheidung der unterschiedlichen Gewebearten und zur Berechnung von deren Flächenanteilen nach der Digitalisierung mussten die Schlitze gefärbt werden. Die Oberfläche der Schlitze wurde für eine Minute mit 1%iger Ameisensäure (Suprapur, Merck, Darmstadt, Deutschland) angeätzt (Abb. 39), damit die Farbstoffe im nächsten Schritt besser in das Gewebe infiltrieren konnten. Anschließend wurden die Schlitze fünf Minuten unter fließendem Leitungswasser abgespült.



Abb. 38 Die Bandsäge beim Absägen

Die Bandsäge schneidet den Objektträger, welcher den Implantatanschnitt enthält, vom übrigen Block mit circa 300 µm Dicke ab.

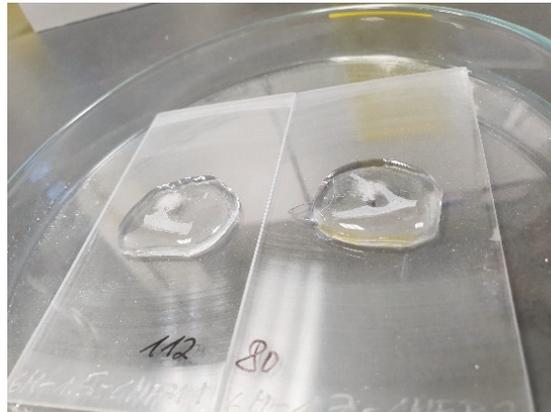


Abb. 39 Anätzen der Schlitze mit 1%iger Ameisensäure für eine Minute

Die Färbung nach Giemsa (Giemsa's Azur-Eosin-Methylenblaulösung, Merck, Darmstadt, Deutschland) erfolgte manuell (Abb. 40) in einer schematischen Reihenfolge (Tabelle 9). Im Anschluss wurden auf die Präparate dünn Vitrocloud (Firma Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland) aufgebracht und ein Deckglas zum Schutz aufgelegt.

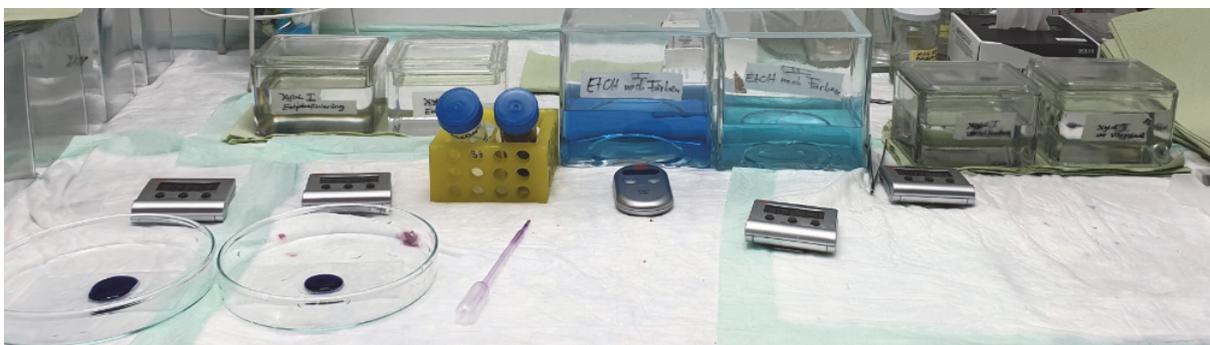


Abb. 40 Arbeitsplatz für die Färbung der Schlitze

Tabelle 9 Färbeschema der Schlicfe

Die Schlicfe wurden nach dem in der Tabelle angegebenen Schema gefärbt.

Wässern unter fließendem Leitungswasser	5 Minuten
Spülung mit destilliertem Wasser	2 Minuten
Färbung in 3%iger Giemsalösung (Giemsas Azur-Eosin-Methylenblaulösung, Merck, auf 3%ige Konzentration händisch herunterverdünnt)	15 Minuten
Spülung mit 100% Ethanol	1 Minute
Färbung in 3%iger Giemsalösung	20 Minuten
Spülung mit 100% Ethanol	1 x 1 Minute und 1x 30 Sekunden
Waschen in Xylol	2x 30 Sekunden

3.1.9.5 Histomorphometrische Analyse

3.1.9.5.1 Vorbereitungen für die Analyse

Die gefärbten Schlicfe wurden mit der Software AxioVision (5er-Okular, mit Kondensor, AxioCam MRc5, AxioVision 4.8.2 Carl Zeiss, Jena, Deutschland) als Mosaikbild digitalisiert. Anschließend wurde das Bild auf Fehler überprüft, gegebenenfalls korrigiert, gesticht und ein Maßstab eingezeichnet. Jedes so entstandene Bild wurde mit dem Programm Fiji mit der ImageJ Version 1.52t gedreht, so dass die Ausrichtung der Schraube senkrecht war und der Schraubenkopf nach oben zeigte. Die Abspeicherung erfolgte im JPEG-Format.

3.1.9.5.1.1 Erstellung der ROI zur Quantifizierung des Knochenanteils

Um anhand der digitalisierten Schlicfe das Residualvolumen der Schrauben sowie den Anteil an mineralisierten Knochen um das Implantat untersuchen zu können, wurde zunächst eine Standard-ROI (ROI = region of interest) hausintern erstellt. Der Umriss einer Schlicfe einer nativen Schraube im Querschnitt (Abb. 41) diente als Vorlage für die Standard-ROI (Abb. 42)



Abb. 41

Abb. 41 Native Schraube im Querschnitt

Eine native Schraube im Querschnitt diente als Vorlage für die Standard-ROI. Rechts unten befindet sich der Maßstab.

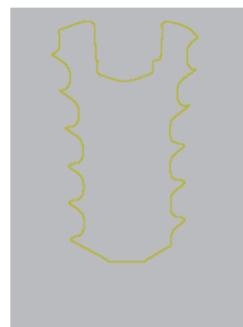


Abb. 42

Abb. 42 Standard-ROI

Die gelbe Markierung als Standard-ROI dargestellt zeigt den Umriss einer nativen Schraube im Querschnitt.

Über ein hauseigenes Makro zur histologischen Auswertung konnte dann die Standard-ROI nach automatischer Größenanpassung durch den Maßstab im Original oder, je nach Schnittebene in gespiegelter Version, auf den ursprünglichen Umriss des jeweiligen Implantats gelegt werden. Orientierung für die ursprünglichen Umrisse der teilresorbierten Schrauben boten vor allem der Schraubenkopf sowie gut sichtbare Bereiche des Gewindes, welche sich deutlich vom übrigen Gewebe unterschieden. Die Standard-ROI wurde dann automatisch unter CMFU.roi gespeichert.

Der Flächenanteil an mineralisierten Knochen wurde im Abstand bis 0,5 mm und im Abstand bis 1,5 mm von der ursprünglichen Implantatgrenze untersucht. Dafür erstellte das Makro, nachdem die Standard-ROI platziert war, 3 Bereiche um die ursprüngliche Implantatgrenze. Die Bereiche erfassten jeweils die Fläche zwischen Implantatgrenze und 0,5 mm Umgebung, zwischen 0,5 mm und 1 mm Umgebung und zwischen 1,0 mm und 1,5 mm Umgebung (Abb. 43). Bereiche, die den *Sinus frontalis* miteinschlossen, wurden manuell korrigiert und aus dem Auswertungsbereich herausgenommen (Abb. 44).

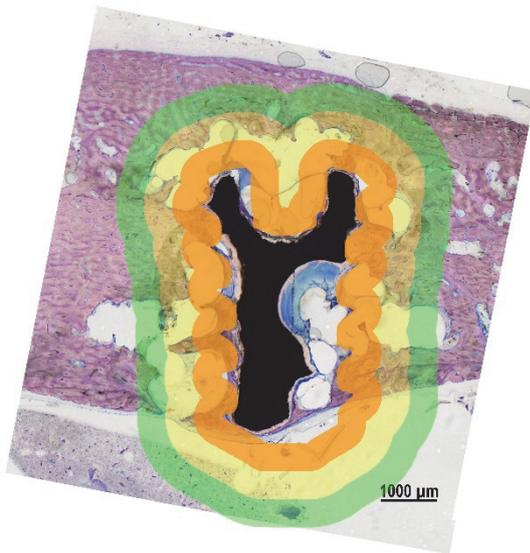


Abb. 43 Histologische Auswertungsbereiche vor der Korrektur

Die Abbildung zeigt die histologischen Auswertungsbereiche vor der Korrektur. Alle 3 farbigen Auswertungsbereiche schließen den Sinus frontalis mit ein. Der orangene Bereich erfasst die Umgebung zwischen der ursprünglichen Implantatgrenze bis 0,5 mm, der gelbe Auswertungsbereich die Umgebung zwischen 0,5 mm bis 1,0 mm und der grüne Auswertungsbereich die Umgebung von 1,0 mm bis 1,5 mm. Rechts unten befindet sich der Maßstab.

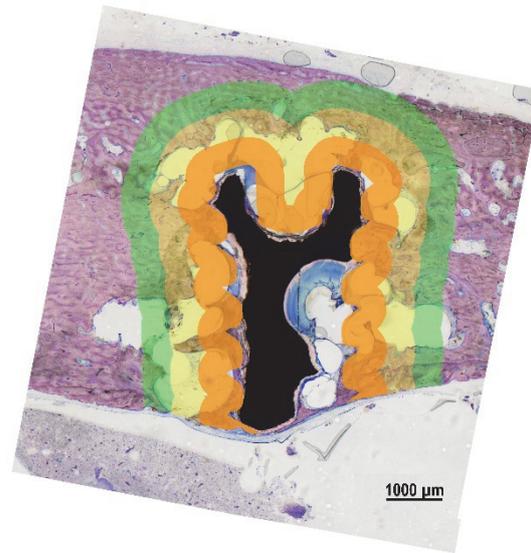


Abb. 44 Histologische Auswertungsbereiche nach der Korrektur

Die Abbildung zeigt die histologischen Auswertungsbereiche nach der Korrektur. Der Sinus frontalis ist nicht mehr innerhalb der Auswertungsbereiche. Der orangene Bereich erfasst die Umgebung zwischen der ursprünglichen Implantatgrenze bis 0,5 mm, der gelbe Auswertungsbereich die Umgebung zwischen 0,5 mm bis 1,0 mm und der grüne Auswertungsbereich die Umgebung von 1,0 mm bis 1,5 mm. Rechts unten befindet sich der Maßstab.

Die korrigierten ROIs (ROI_ROI_0.5, ROI_ROI_1.0, ROI_ROI_1.5) wurden anschließend automatisch gespeichert. Mit einem von Mario Thiele selbst programmierten Makro konnten im nächsten Schritt die bearbeiteten Bilder mit Fiji geöffnet und histomorphometrisch in den entsprechenden ROIs ausgewertet werden.

3.1.9.5.1.2 Erstellung der ROI zur Ermittlung der Residualfläche

Zur Bestimmung der Residualfläche der Implantate wurde noch eine zusätzliche ROI (ROI_CMFU.roi) hinzugefügt, welche die gut sichtbaren schwarzen Flächen des noch nicht resorbierten Implantats erfasste.

Entsprechend der Färbung wurde jedes zu bestimmende Gewebe oder Material in absteigender Priorisierung durch Legen einer Maske, welche durch die Einstellung der Farbe, der Sättigung sowie der Helligkeit, erfasst.

3.1.9.5.1.3 Erfassung der unterschiedlichen Gewebe

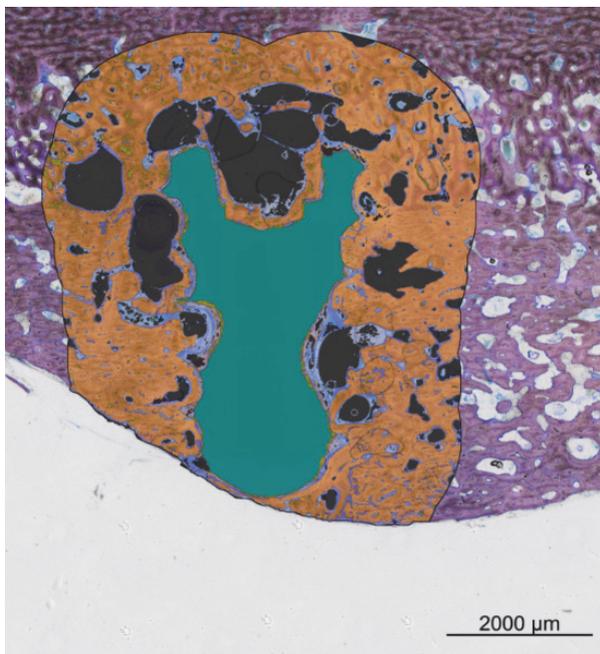


Abb. 45 Histomorphometrisch erfasste Gewebe innerhalb der ROIs in verschiedenen Farben

Die Abbildung zeigt die histomorphometrisch erfassten Gewebe innerhalb der ROIs in verschiedenen Farben. Graue Flächen entsprechen den Leerflächen, orange Flächen entsprechen dem mineralisierten Knochen, die grüne Fläche dem Schraubenmaterial, ocker entspricht dem Korrosionsmaterial und blaue Flächen dem Bindegewebe.

Aufgrund der absteigenden Priorisierung der von den erfassten Geweben gelegten Masken in der Reihenfolge: Leerfläche (Void-Area), mineralisierter Knochen (mdB), Schraube (Sc), Korrosionsmaterial (Mt) und Bindegewebe (CoT), konnten keine Doppelmessungen unterschiedlicher Gewebe an der gleichen Stelle passieren. Bei Bedarf, wenn Strukturen falsch erfasst wurden, erfolgte eine manuelle Nachkorrektur. Jede Maske wurde mittels einer Denoisefunktion nachbearbeitet, um einzelstehende Pixel auszuschließen, was zu einer Reduktion von Artefakten führte. Die verschiedenen Strukturen konnten so in verschiedenen Farben dargestellt werden (Abb. 45). Die Fläche der ROIs sowie die entsprechenden Flächen der Masken innerhalb der jeweiligen ROIs wurden in mm² ausgegeben.

3.1.9.5.2 Ermittlung des Referenzwertes für die Berechnung

Zur Ermittlung des Referenzwertes für die Berechnung der Residualfläche wurde die Standard-ROI auf den Schliff der nativen Schraube gelegt und ebenfalls analysiert. Die dabei ermittelte Schraubengesamtfläche betrug 8,6765 mm², welche für die Berechnung der Residualfläche als Totalfläche (TA = total area) zu Grunde gelegt wurde.

Die Berechnung des noch nicht resorbierten Anteils der Implantate (SA/TA) konnte dann mit der in der ROI_CMFU.roi erfassten Schraubenfläche (SA = screw area) gegenüber der ermittelten nativen Schraubenfläche (TA) berechnet werden.

Für die Berechnung des Anteils an mineralisierten Knochen zwischen Implantatgrenze und 0,5 mm-Umgebung (BA/TA 0,5) wurde die Fläche des erfassten Knochens innerhalb dieser ROI (mdBA) durch die Gesamtfläche dieser ROI (TA 0,5) dividiert. Die Berechnung des Anteils an mineralisierten Knochen zwischen der Implantatgrenze und 1,5 mm-Umgebung (BA/TA 1,5) erfolgte nach dem gleichen Schema. Wobei zunächst die Gesamtflächen des mineralisierten Knochens innerhalb der 3 ROIs addiert (BA) und dann durch die Gesamtfläche der 3 ROIs (TA) dividiert wurden.

3.1.9.5.3 Referenzmessung von Nativproben

Ebenso wurden für 6 entnommene Nativproben ohne Implantatmaterial durch den beschriebenen Prozess Schliffe erstellt, gefärbt und digitalisiert. Bei allen nativen Proben wurden ebenfalls die ROIs zur Untersuchung des Anteils an mineralisierten Knochen angelegt und analysiert (Tabelle 10).

Tabelle 10 Ergebnis des Flächenanteils an mineralisierten Knochen in den Auswertungsbereichen BA/TA 0,5 und BA/TA 1,5 von 6 Nativproben

Die Tabelle enthält die Ergebnisse des Flächenanteils an mineralisierten Knochen in den Auswertungsbereichen zwischen ursprünglicher Implantatgrenze und 0,5 mm Umgebung (BA/TA 0,5) sowie ursprünglicher Implantatgrenze und 1,5 mm Umgebung (BA/TA 1,5) auf 2 Nachkommastellen gerundet. Der Gesamtmittelwert wurde ebenfalls auf 2 Nachkommastellen gerundet.

Probe	BA/TA 0,5	BA/TA 1,5
6M_1.7_nativ1	84,58%	84,01%
6M_3.1_nativ2	84,15%	86,19%
12M_3.4_nativ1	75,03%	78,16%
12M_nativ1	83,64%	83,49%
18M_3.8_nativ1	88,20%	89,48%
6M_3.1_nativ1	68,62%	72,66%
Mittelwert	80,70%	82,33%

3.2 Ausschluss von Proben

Es wurden je zwei unbeschichtete und zwei beschichtete ZX00-Schrauben randomisiert in das *Os frontale* von insgesamt 18 Minipigs eingebracht. Die Tiere wurden in Gruppen zu je sechs Schweinen nach 6, 12 und 18 Monaten euthanasiert und Proben entnommen. Damit ergibt sich eine theoretische Anzahl von 72 unbeschichteten und beschichteten Implantaten. Bei der Entnahme der Proben konnten aufgrund der Dislokation der Schrauben in den Kopfknochen insgesamt fünf Implantate nicht wiedergefunden werden. Ein Scan einer entnommenen Probe wurde durch einen Serverabsturz gelöscht (6M-1.3-CMFB1), des Weiteren wurden drei Proben (6M-1.4-CMFU2; 12M-2.3-CMFU1; 18M-3.3-CMFB2) von der Analyse des Micro-CTs ausgeschlossen, da sie fast vollständig in den *Sinus frontalis* disloziert und nicht mehr von *Os frontale* umgeben waren. Radiologisch wurden somit 63 Proben ausgewertet (Tabelle 11).

Tabelle 11 Entnommene Proben und davon auswertbare Proben im Micro-CT

Die Tabelle zeigt die entnommenen und davon auswertbaren Proben im Micro-CT. Links sind die in den Micro-CT-Scans der Knochenstanzen gefundenen Implantate erfasst, wobei ein 6-Monate Scan einer Probe durch einen Serverabsturz gelöscht wurde. Rechts sind die im Micro-CT auswertbaren Proben aufgelistet. Bei den mit Sternchen markierten Proben musste jeweils eine Probe ausgeschlossen werden, da sie zu stark in den Sinus frontalis disloziert und nicht mehr von Os frontale umgeben war.

Entnommene Proben			Davon auswertbare Proben		
Implantationszeit	CMFU	CMFB	Implantationszeit	CMFU	CMFB
6 Monate	12	11	6 Monate	11*	11
12 Monate	10	12	12 Monate	9*	12
18 Monate	9	12	18 Monate	9	11*

Nach dem Micro-CT-Scan und der Weiterverarbeitung für die Histologie wurden insgesamt 5 Proben von der Analyse der histologischen Untersuchung ausgeschlossen. Darunter befanden sich auch die 3 Proben, welche bereits für die radiologische Auswertung ausgeschlossen wurden (6M-1.4-CMFU2; 12M-2.3-CMFU1; 18M-3.3-CMFB2) sowie zwei Proben, die beim Verarbeitungsprozess durch einen falschen Anschliff beschädigt wurden (6M-1.7-CMFU1; 6M-1.7-CMFB2). Histologisch wurden somit 62 Proben ausgewertet (Tabelle 12).

Die von den Auswertungen ausgeschlossenen Proben sind als histologische Proben in Tabelle 13 dargestellt.

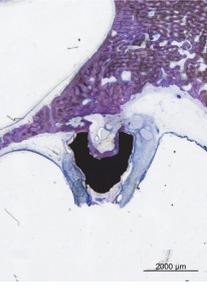
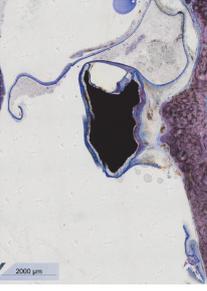
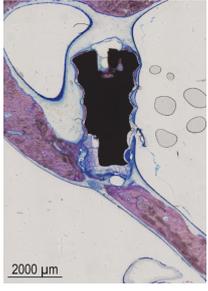
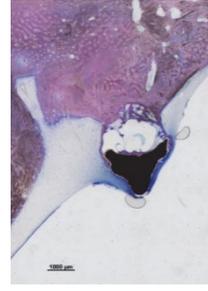
Tabelle 12 Entnommene Proben und davon auswertbare Proben in der Histomorphometrie

Darstellung der Gesamtanzahl an entnommenen histologischen Proben mit Implantat sowie der davon auswertbaren Proben. Links sind die in den Knochenstanzen gefundenen Implantate erfasst, rechts sind die histomorphometrisch auswertbaren Proben aufgelistet. Bei den mit Sternchen markierten Proben musste jeweils eine Probe ausgeschlossen werden, da sie zu stark in den Sinus frontalis disloziert und nicht mehr von Os frontale umgeben waren oder sie beim Verarbeitungsprozess beschädigt wurden.

Entnommene Proben			Davon auswertbare Proben		
Implantationszeit	CMFU	CMFB	Implantationszeit	CMFU	CMFB
6 Monate	12	12	6 Monate	10*	11*
12 Monate	10	12	12 Monate	9*	12
18 Monate	9	12	18 Monate	9	11*

Tabelle 13 Histomorphometrische Bilder der ausgeschlossenen Proben

Die Tabelle zeigt die von der histologischen und teilweise von der radiologischen Untersuchung ausgeschlossenen Proben. Oben die Kennzeichnung der jeweiligen Probe, darunter ein Bild nach histologischer Bearbeitung.

6M-1.4-CMFU2	6M-1.7-CMFU1	6M-1.7-CMFB2	12M-2.3-CMFU1	18M-3.3-CMFB2
				

3.3 Statistik

Zur graphischen Darstellung der gemessenen Parameter wurden jittered dot plots mit dem Programm NCSS v10 (www.ncss.com) erstellt.

Durch die geringe Stichprobengröße besaß der Kolmogorov-Smirnov-Test auf Normalverteilung nicht genügend Aussagekraft, um gegebenenfalls vorhandene Abweichungen von der Normalverteilung zuverlässig zu identifizieren. Es wurde daher nach Rücksprache mit dem beratenden Statistiker des Instituts für Veterinär-Epidemiologie und Biometrie der Freien Universität Berlin auf Basis anderer Studien sowie der randomisierten Verteilung der Schrauben innerhalb des *Os frontale* die Normalverteilung der Messwerte angenommen.

Die Prüfung auf statistische Unterschiede der Parameter zwischen der unbeschichteten und beschichteten Schraube wurde separat pro Durchgang (nach 6, 12 und 18 Monaten Versuchszeit) mittels eines generalisierten hierarchischen linearen Modells mit dem Programm STATA MP v15 (www.stata.com) berechnet. Die Berechnung erfolgte mit den jeweiligen Zielgrößen als abhängige Variable unter Einbeziehung von Wiederholungsmessungen (Abhängigkeiten) von Schrauben innerhalb von Tieren.

Die Prüfung auf statistische Unterschiede der jeweiligen Schraube zwischen den Durchgängen 6M und 18M mit Korrektur für die Doppelmessungen je Schraube und Tier erfolgte für jeden Parameter ebenfalls mit STATA MP v15.

Als statistisch signifikant wurden p -Werte $< 0,05$ betrachtet.

Die akquirierten Textdateien der statistischen Untersuchung zeigen für jeden Parameter die Modellvorhersage (predicted mean) der beschichteten Schraube sowie die vorhergesagte (predicted) Differenz der beschichteten Schraube zur unbeschichteten Schraube. Der vorhergesagte Mittelwert jedes Parameters bei den beschichteten Schrauben sowie die vorhergesagte mittlere Differenz wurden auf zwei Nachkommastellen gerundet und damit der vorhergesagte Mittelwert des Parameters bei den unbeschichteten Schrauben berechnet.

4 Ergebnisteil

4.1 Untersuchung der Implantatresorption

4.1.1 Vergleich des Residualvolumens (SV/TV)

Zur Untersuchung der Schraubenresorption nach verschiedenen langen Implantationszeiten wurde als Vergleichsgröße ein ursprünglicher Schraubenumriss definiert, welcher dem ursprünglichen Schraubenvolumen entspricht (total volume = TV). Nach Explantation der Proben wurde dann im Micro-CT das Residualvolumen, welches noch innerhalb des ursprünglichen Schraubenumrisses gefunden wurde (screw volume = SV), basierend auf der Dichte des Materials quantifiziert. Der Parameter SV/TV gibt somit den prozentualen Anteil der noch nicht resorbierten Schraube an. Die Differenz der SV/TV-Werte beider Schrauben zeigt den Einfluss der PEO-Oberflächenbeschichtung auf die Degradation der Schraube.

Die radiologische Auswertung in Abb. 46 zeigt im Vergleich der Mittelwerte des Parameters SV/TV zwischen unbeschichtetem und beschichtetem Implantat zu jedem Zeitpunkt einen deutlich höheren Anteil an unresorbiertem Schraubenmaterial bei den beschichteten Implantaten.

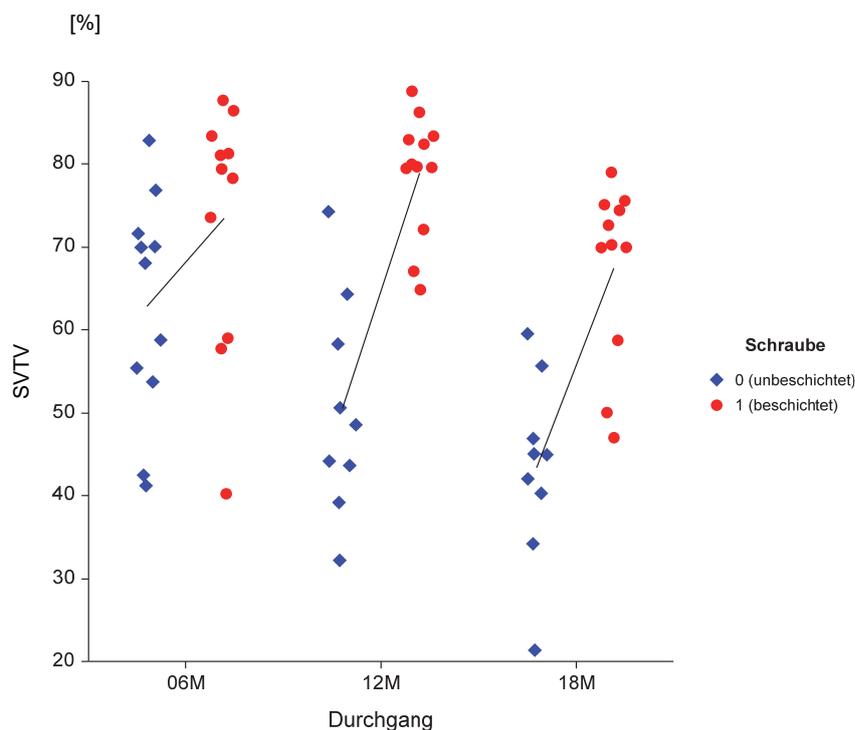


Abb. 46 Jiggered dot plot für den Parameter SV/TV

Die Abbildung zeigt den jittered dot plot für den Parameter SV/TV, welcher auf der Y-Achse den prozentualen Anteil des noch vorhandenen Schraubenvolumens angibt und auf der X-Achse den Durchgang nach der Länge der Implantationszeit getrennt nach Schraubentyp als Legenden-Variable (unbeschichtete Schrauben blau, beschichtete Schrauben rot). Darüber hinaus ist die Mittelwertverbindungsline zwischen den beiden Schraubentypen zu jedem Untersuchungszeitpunkt dargestellt.

Die statistische Modellvorhersage (Tabelle 14) bestätigt die Beobachtungen, da sich nach 6 Monaten Implantationszeit ein mittleres verbleibendes Implantatmaterial der unbeschichteten Schrauben von 63,13% ergibt, demgegenüber 73,14% bei den beschichteten Implantaten und somit bei diesen 10,01% weniger Resorption stattfindet ($p = 0,051$). Nach 12 Monaten Implantationszeit ist das mittlere Residualvolumen der Schrauben mit PEO-Oberflächenmodifikation mit 78,90% um 27,51% ($p < 0,001$) höher als bei den unbeschichteten Schrauben (51,39%). Der signifikante Unterschied im Degradationsverhalten bleibt auch nach 18 Monaten bestehen, ist insgesamt aber geringer. Das verbleibende Schraubenmaterial der unbeschichteten Implantate liegt im Mittel mit 43,48% gegenüber den beschichteten Implantaten (67,60%) um 24,12% niedriger ($p < 0,001$).

Tabelle 14 Modellvorhersage für das Residualvolumen (SV/TV)

Die Tabelle zeigt das Ergebnis des generalisierten hierarchischen linearen Modells mit dem Parameter SV/TV als abhängige Variable, unter Einbeziehung von Wiederholungsmessungen (Abhängigkeiten) von Schrauben innerhalb von Tieren. Sie zeigt zu jedem Untersuchungszeitpunkt die Modellvorhersage des Parameters SV/TV für das unbeschichtete Implantat und das beschichtete Implantat sowie den dazugehörigen p-Wert der Differenz.

Implantationszeit	Residualvolumen SV/TV		p-Wert
	Unbeschichtetes Implantat	Beschichtetes Implantat	
6 Monate	63,13%	73,14%	0,051
12 Monate	51,39%	78,90%	<0,001
18 Monate	43,48%	67,60%	<0,001

Die reduzierte Korrosion durch die PEO-Oberflächenmodifikation lässt sich auch in der 3D-Darstellung des Residualvolumens erkennen (Abb. 47). So zeigen sich beim unbeschichteten Implantat deutliche Substanzverluste in verschiedenen Bereichen des Implantats, wohingegen beim beschichteten Implantat gleichmäßige und deutlich kleinere Degradationsstellen über das gesamte Schraubenvolumen dargestellt sind.

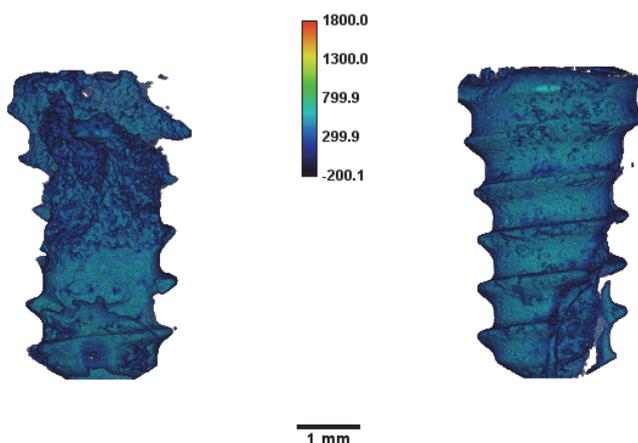


Abb. 47 3D-Darstellung des noch nicht resorbierten Implantatmaterials nach 18 Monaten

Die Abbildung zeigt in der 3D-Darstellung das noch nicht resorbierte Implantatmaterial nach 18 Monaten. Unten ist der Maßstab, oben das Farbschema angegeben, in das die der Dichte des Materials entsprechenden Grauwerte des Micro-CTs übertragen wurden. Links ist eine unbeschichtete Probe (SV/TV 46,90%), rechts eine beschichtete Probe (SV/TV 69,97%) dargestellt.

Abb. 47

4.1.2 Vergleich der Residualfläche (SA/TA)

In der histologischen Untersuchung wurde die Fläche des verbleibenden Schraubenmaterials (screw area = SA) anhand von Schlifften, welche die restliche Schraube im Querschnitt mit umliegendem Gewebe zeigten, zweidimensional erfasst. Den Referenzwert für die Gesamtschraubenfläche bildete die innerhalb des ursprünglichen Schraubenumrisses erfasste Schraubenfläche einer unresorbierten Schraube im Querschnitt (total area = TA). Der Parameter SA/TA zeigt somit den noch nicht resorbierten Flächenanteil des Implantatmaterials. Die Differenz des Parameters zwischen dem unbeschichteten und beschichteten Implantat zeigt den Einfluss der Oberflächenmodifikation auf die Degradation. Es zeigen sich in der histologischen Auswertung die gleichen Tendenzen wie bei der radiologischen Auswertung. So liegt der Mittelwert der verbleibenden Schraubenfläche der beschichteten Implantate zu jedem Untersuchungszeitpunkt höher als für das unbeschichtete Implantat. Allerdings ist der graphische Unterschied (Abb. 48) nur nach 12 Monaten Implantationszeit sehr ausgeprägt zu beobachten.

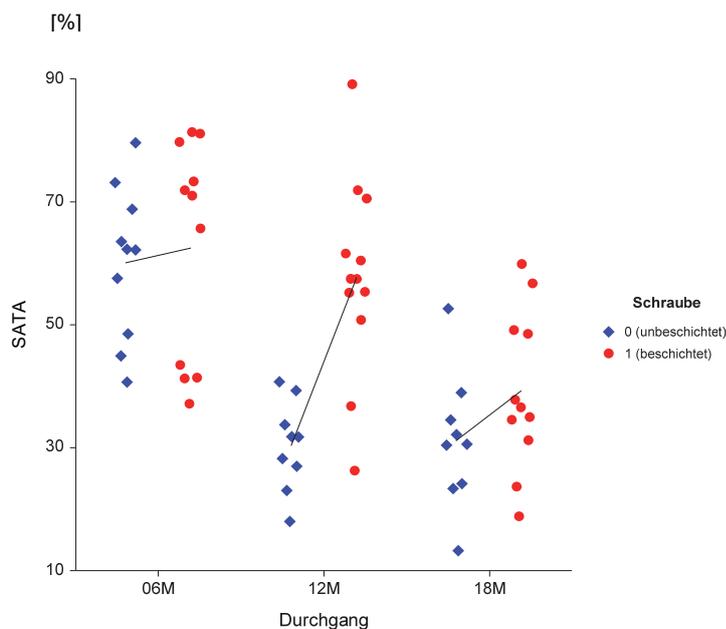


Abb. 48 Jiggered dot plot für den Parameter SA/TA

Die Abbildung zeigt den jittered dot plot für den Parameter SA/TA, welcher auf der Y-Achse den prozentualen Anteil der noch vorhandenen Schraubenfläche angibt und auf der X-Achse den Durchgang nach der Länge der Implantationszeit getrennt nach Schraubentyp als Legenden-Variable (unbeschichtete Schrauben blau, beschichtete Schrauben rot). Darüber hinaus ist die Mittelwertverbindungsline zwischen den beiden Schraubentypen zu jedem Untersuchungszeitpunkt dargestellt.

Dies bestätigt das Ergebnis des generalisierten hierarchischen Modells für den Parameter SA/TA (Tabelle 15). Es besteht nach 6 Monaten nur ein geringer Unterschied in der verbleibenden Fläche im Mittel in Höhe von 2,30% ($p = 0,726$) zwischen unbeschichtetem (59,56%) und beschichtetem (61,86%) Implantat. Nach 12 Monaten Implantationszeit ist der

Unterschied jedoch signifikant ($p < 0,001$; Differenz = 24,19%). Von der unbeschichteten Schraube ist im Mittel nur noch 33,56% übrig, wohingegen die beschichtete Schraube im Durchschnitt noch zu 57,75% erhalten ist. Beim letzten Untersuchungszeitpunkt ist der Unterschied in der Residualfläche wieder etwas geringer ($p = 0,115$; Differenz = 8,16%). Die beschichtete Schraube ist im Mittel mit verbleibenden 39,27% weniger resorbiert als die unbeschichtete Schraube (31,11%). Die Ergebnisse der zweidimensionalen histologischen Untersuchung stützen somit die Ergebnisse der dreidimensionalen radiologischen Untersuchung und deuten auf eine Verlangsamung der Degradation durch die Oberflächenmodifikation hin.

Tabelle 15 Modellvorhersage für die Residualflächen (SA/TA)

Die Tabelle enthält das Ergebnis des generalisierten hierarchischen linearen Modells mit dem Parameter SA/TA als abhängige Variable, unter Einbeziehung von Wiederholungsmessungen (Abhängigkeiten) von Schrauben innerhalb von Tieren. Sie zeigt zu jedem Untersuchungszeitpunkt die Modellvorhersage des Parameters SA/TA für das unbeschichtete Implantat und das beschichtete Implantat sowie den dazugehörigen p-Wert der Differenz.

Implantationszeit	Residualfläche SA/TA		p-Wert
	Unbeschichtetes Implantat	Beschichtetes Implantat	
6 Monate	59,56%	61,86%	0,726
12 Monate	33,56%	57,75%	<0,001
18 Monate	31,11%	39,27%	0,115

Im Vergleich der unbeschichteten und beschichteten Implantate anhand von zwei histologischen Schliffen erkennt man deutlich den fortgeschrittenen Flächenverlust bereits nach 12 Monaten. Während bei dem unbeschichteten Implantat (Abb. 49) lediglich schematisch der Kopf und der Schraubenkörper erkennbar sind, lässt sich beim beschichteten Implantat (Abb. 50) noch deutlich der Kopf und das Gewinde innerhalb der schwarz dargestellten Residualfläche erkennen.

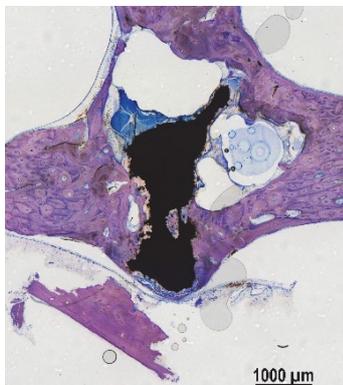


Abb. 49 Histologisch aufgearbeitetes unbeschichtetes Implantat (SA/TA 33,75%) zum Untersuchungszeitpunkt nach 12 Monaten

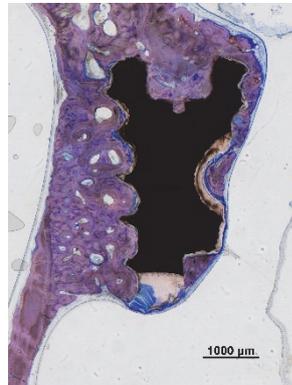


Abb. 50 Histologisch aufgearbeitetes beschichtetes Implantat (SA/TA 57,46%) zum Untersuchungszeitpunkt nach 12 Monaten

4.1.3 Untersuchung des Residualvolumens (SV/TV) der Implantate zwischen den Untersuchungszeitpunkten

Da in der radiologischen Untersuchung die Quantifizierung des Residualvolumens dreidimensional erfolgte, wurde sie ausgewählt, um den Unterschied des noch nicht resorbierten Volumenanteils jedes Schraubentyps (unbeschichtet oder beschichtet) über den Gesamtuntersuchungszeitraum zu quantifizieren. Die Differenz von SV/TV eines Schraubentyps zwischen der kürzesten Implantationszeit nach 6 Monaten und der längsten nach 18 Monaten zeigt, wie gut die PEO-Oberflächenmodifikation die beschichtete Schraube vor Degradation geschützt hat. In Abb. 51 sind die ermittelten SV/TV-Werte als dot plot zum jeweiligen Untersuchungszeitpunkt mit Verbindungslinie der Mittelwerte nach dem jeweiligen Entnahmezeitpunkt dargestellt. Dabei ist ein deutlich größerer Unterschied zwischen dem Mittelwert nach 6 und nach 18 Monaten bei der unbeschichteten Schraube erkennbar als bei der beschichteten.

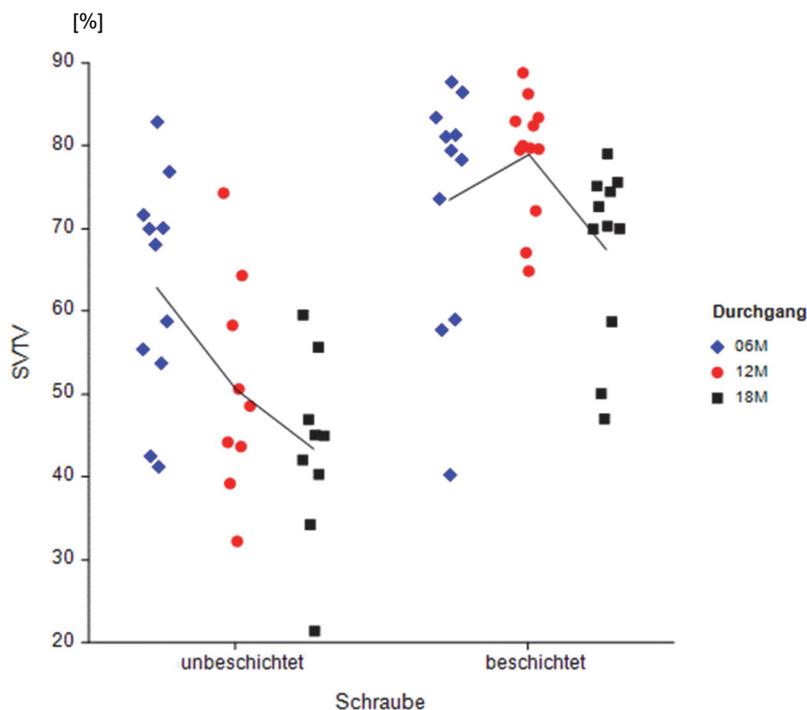


Abb. 51 Jiggered dot plot für den Parameter SV/TV zwischen den Untersuchungszeitpunkten der jeweiligen Schraube

Die Abbildung zeigt den jiggered dot plot für den Parameter SV/TV, welcher auf der Y-Achse den prozentualen Volumenanteil der noch vorhandenen Schraube und auf der X-Achse den Schraubentyp (unbeschichtet und beschichtet) zu jedem Untersuchungszeitpunkt (Durchgang) angibt. Darüber hinaus sind die Mittelwertverbindungen zwischen den Durchgängen der jeweiligen Schraube dargestellt.

Die statistische Untersuchung der Differenz des Residualvolumens zwischen den Untersuchungszeitpunkten (Tabelle 16) bestätigt das Ergebnis der radiologischen und histologischen Untersuchung zu den einzelnen Untersuchungszeitpunkten. Die Modellvorhersage zeigt, dass der Mittelwert des Schraubenvolumens beim unbeschichteten

Implantat signifikant von 63,06% nach 6 Monaten auf 42,61% nach 18 Monaten Implantationszeit sinkt ($p = 0,001$; Differenz = 20,45%). Die beschichteten Implantate weisen lediglich eine mittlere Differenz von 5,95% ($p = 0,25$) auf, sodass im Mittel nach 18 Monaten noch 67,74% des beschichteten Implantats gegenüber 73,69% nach 6 Monaten Implantationszeit vorhanden sind.

Tabelle 16 Modellvorhersage für das Residualvolumen zwischen den Untersuchungszeitpunkten nach 6 und 18 Monaten

In der Tabelle ist das Ergebnis des generalisierten hierarchischen linearen Modells mit dem Parameter SV/TV als abhängige Variable, unter Einbeziehung von Wiederholungsmessungen (Abhängigkeiten) von Schrauben innerhalb von Tieren dargestellt. Sie zeigt die Modellvorhersagen des Parameters SV/TV zwischen den Untersuchungszeitpunkten nach 6 und 18 Monaten für das jeweilige Implantat sowie dem dazugehörigen p-Wert der Differenz.

	Residualvolumen SV/TV		p-Wert
	6 Monate	18 Monate	
Unbeschichtetes Implantat	63,06%	42,61%	<0,001
Beschichtetes Implantat	73,69%	67,74%	0,25

4.2 Untersuchung des dem Implantat anliegenden Knochens

Zur Untersuchung der Reaktion des Knochens auf die Degradation der Implantate wurden sowohl in der radiologischen als auch in der histologischen Untersuchung zwei Bereiche um die ursprüngliche Implantatgrenze gewählt und bezüglich ihres Knochenanteils untersucht. Da bei der Degradation von magnesiumbasierten Implantaten Gase entstehen, welche zu Hohlräumen im Knochen führen können, wurde der Knochenanteil der unbeschichteten gegenüber den beschichteten Schrauben verglichen. Als kleinerer Untersuchungsbereich wurde die Umgebung von 0,5 mm um das ursprüngliche Implantat gewählt, da hier die größte Reaktion auf die Degradation erwartet wurde. Im Bereich bis 1,5 mm um das ursprüngliche Implantat konnten in vielen Proben noch Veränderungen im Knochen beobachtet werden, die als Gesamtreaktion des Knochens auf die Degradation angenommen wurden (siehe Kapitel 3.1.8.2.2).

4.2.1 Vergleich des Volumenanteils an mineralisiertem Knochen (BV/TV) in 2 Regionen um das Implantat zu jedem Untersuchungszeitpunkt

In der dreidimensionalen radiologischen Untersuchung wurden die Auswertungsbereiche zwischen ursprünglicher Implantatgrenze und 0,5 mm bzw. 1,5 mm Abstand festgelegt. Die Umgebung des *Sinus frontalis* wurde innerhalb der Auswertungsbereiche nicht erfasst. Die jeweiligen Auswertungsbereiche jeder Probe entsprechen dem Gesamtvolumen des jeweiligen Parameters (total volume = TV), in welchem das Volumen an mineralisiertem Knochen, basierend auf dessen Dichte, quantifiziert wurde (bone volume = BV). Der Parameter BV/TV (BV/TV 0,5 und BV/TV 1,5) zeigt den Volumenanteil an mineralisiertem Knochen um das Implantat und ermöglicht Rückschlüsse, ob die Gasfreisetzung während der Degradation zu Veränderungen im Knochen geführt hat.

4.2.1.1 Vergleich des Volumenanteils an mineralisiertem Knochen (BV/TV) zwischen ursprünglicher Implantatgrenze und 0,5 mm Abstand

Die Ergebnisse der radiologischen Auswertung (Abb. 52) zeigen, dass große Unterschiede der Volumenanteile mineralisierten Knochens zwischen ursprünglicher Implantatgrenze und 0,5 mm Abstand erst nach 18 Monaten bestehen. Der Mittelwert des Parameters aus 6 analysierten Nativproben ergab einen Volumenanteil von 90,14%. Die Mittelwerte der untersuchten Proben blieben zu jedem Zeitpunkt unter diesem Wert. Die Volumenanteile um die beschichteten Schrauben nähern sich im Mittel allerdings nach 18 Monaten Implantationszeit dieser Nativreferenz an, wohingegen der Mittelwert der unbeschichteten Schrauben deutlich niedriger ist.

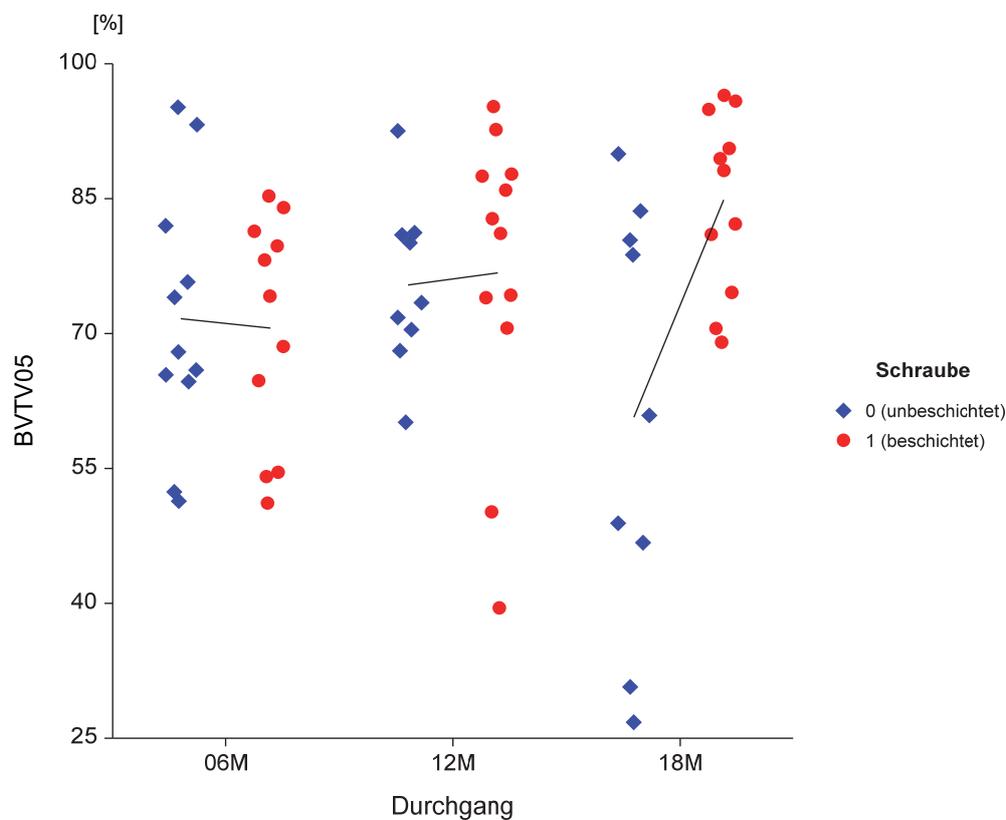


Abb. 52 Jittered dot plot für den Parameter BV/TV 0,5

Die Abbildung zeigt den jittered dot plot für den Parameter BV/TV 0,5, welcher auf der Y-Achse den prozentualen Volumenanteil an mineralisiertem Knochen zwischen ursprünglicher Implantatgrenze und 0,5 mm Abstand innerhalb des Auswertungsbereichs angibt und auf der X-Achse den Durchgang mit der Länge der Implantationszeit getrennt nach Schraubentyp als Legenden-Variable (unbeschichtete Schrauben blau, beschichtete Schrauben rot). Darüber hinaus ist die Mittelwertverbindungsline zwischen den beiden Schraubentypen zu jedem Untersuchungszeitpunkt dargestellt.

Die Ergebnisse der Modellvorhersage (Tabelle 17) bestätigen, dass die mittlere Differenz der Volumenanteile zwischen ursprünglicher Implantatgrenze und 0,5 mm Abstand nach 6 Monaten Implantationszeit lediglich 0,67% ($p = 0,825$; BV/TV unbeschichtetes Implantat = 71,39%; BV/TV beschichtetes Implantat = 72,06%) und nach 12 Monaten $p = 0,78$;

BV/TV unbeschichtetes Implantat = 75,36%; BV/TV beschichtetes Implantat = 76,79%) beträgt. Ein signifikanter Unterschied ($p < 0,001$; Differenz = 25,23%) besteht nach 18 Monaten. Der Mittelwert des Volumenanteils an mineralisiertem Knochen innerhalb der Auswertungsbereiche beträgt bei den beschichteten Implantaten zum letzten Untersuchungszeitpunkt 85,73%, bei den unbeschichteten 60,50%.

Tabelle 17 Modellvorhersage für den Parameter BV/TV 0,5

Die Tabelle enthält das Ergebnis des generalisierten hierarchischen linearen Modells mit dem Parameter BV/TV 0,5 als abhängige Variable, unter Einbeziehung von Wiederholungsmessungen (Abhängigkeiten) von Schrauben innerhalb von Tieren. Sie zeigt zu jedem Untersuchungszeitpunkt die Modellvorhersage des Parameters BV/TV 0,5 für das unbeschichtete Implantat und das beschichtete Implantat sowie den dazugehörigen p-Wert der Differenz.

Implantationszeit	Volumenanteil mineralisierten Knochens BV/TV 0,5 mm		p-Wert
	Unbeschichtetes Implantat	Beschichtetes Implantat	
6 Monate	71,39%	72,06%	0,825
12 Monate	75,36%	76,79%	0,78
18 Monate	60,50%	85,73%	<0,001

Die exemplarische 3D-Darstellung (Abb. 53) zeigt deutlich, dass durch die verlangsamte Degradation beim beschichteten Implantat der Knochen direkt an den ursprünglichen Implantatgrenzen deutlich homogener, also weniger von Unebenheiten sowie von Gas-Lakunen durchzogen ist.

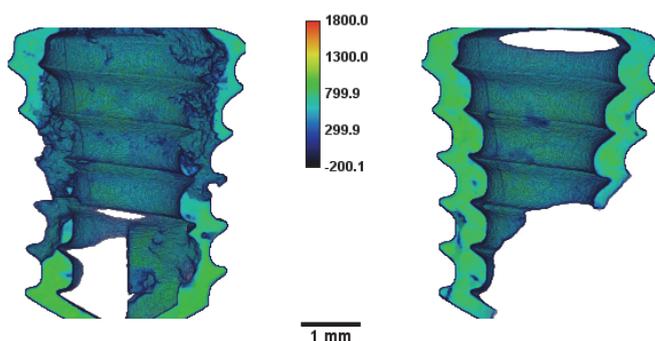


Abb. 53 3D-Darstellung des Knochens im Abstand von 0,5 mm

Die Abbildung zeigt die 3D-Darstellung des Knochens im Abstand von 0,5 mm um das Implantat im Querschnitt innerhalb des jeweiligen Auswertungsbereichs nach 18 Monaten Implantationszeit. In der Mitte unten ist der Maßstab, oben das Farbschema angegeben, in das die der Dichte des Materials entsprechenden Grauwerte des Micro-CTs übertragen wurden. Links ist ein unbeschichtetes Implantat (BV/TV 0,5 48,91%), rechts ein beschichtetes Implantat (BV/TV 0,5 96,48%) abgebildet.

4.2.1.2 Vergleich des Volumenanteils an mineralisiertem Knochen (BV/TV) zwischen ursprünglicher Implantatgrenze und 1,5 mm Abstand

Die Untersuchung von ursprünglicher Implantatgrenze bis 1,5 mm Abstand zeigt die gleichen Tendenzen wie in der vorherigen Untersuchung. So bleibt der Mittelwert des Volumenanteils an mineralisiertem Knochen nach 6 und 12 Monaten beim unbeschichteten und beschichteten Implantat annähernd gleich (Abb. 54). Nach 18 Monaten Implantationszeit zeigt sich jedoch ein deutlicher Unterschied, da der Mittelwert des Volumenanteils an mineralisiertem Knochen um die beschichteten Schrauben höher ist. Der Mittelwert des Parameters BV/TV 1,5 aus 6 analysierten Nativproben ergab einen Volumenanteil von 90,23% mineralisierter Knochen. Der Mittelwert des Knochenanteils um die beschichteten Schrauben nähert sich diesem Wert nach 18 Monaten Implantationszeit wieder deutlich an.

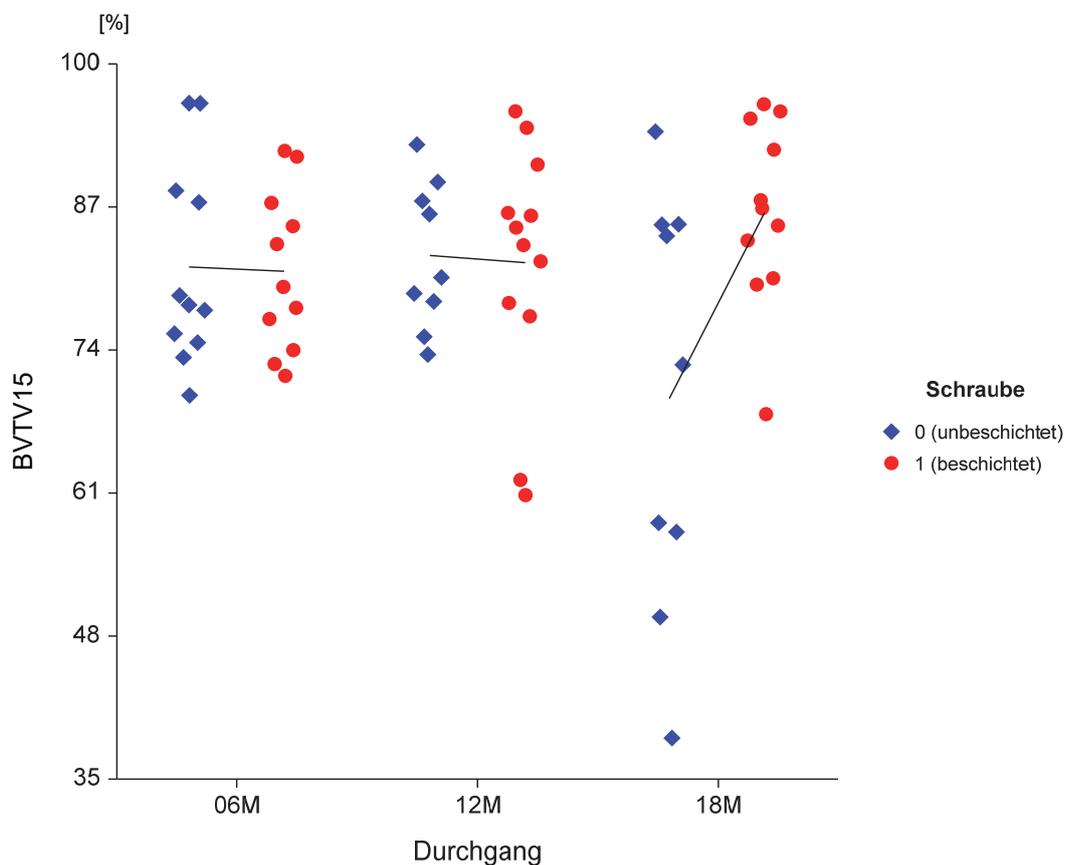


Abb. 54 Jiggered dot plot für den Parameter BV/TV 1,5

Die Abbildung zeigt den jittered dot plot für den Parameter BV/TV 1,5, welcher auf der Y-Achse den prozentualen Volumenanteil an mineralisiertem Knochen zwischen ursprünglicher Implantatgrenze und 1,5 mm Abstand innerhalb des Auswertungsbereichs angibt und auf der X-Achse den Durchgang mit der Länge der Implantationszeit getrennt nach dem Schraubentyp als Legenden-Variablen (unbeschichtete Schrauben blau, beschichtete Schrauben rot). Darüber hinaus wird die Mittelwertverbindungsline zwischen den beiden Schraubentypen zu jedem Untersuchungszeitpunkt dargestellt.

Die statistische Modellvorhersage (Tabelle 18) bestätigt diese Beobachtung, da der mittlere Unterschied der Volumenanteile an mineralisiertem Knochen nach 6 Monaten Implantationszeit lediglich 0,60% ($p = 0,823$; BV/TV unbeschichtetes Implantat = 81,37%; BV/TV beschichtetes Implantat = 81,97%) und nach 12 Monaten nur 0,72% ($p = 0,806$; BV/TV unbeschichtetes Implantat = 82,59%; BV/TV beschichtetes Implantat = 81,87%) beträgt. Ein signifikanter Unterschied in der Untersuchung zeigt sich nach 18 Monaten Implantationszeit ($p < 0,001$; Differenz = 17,87%). Hier ergibt der mittlere Volumenanteil an mineralisiertem Knochen innerhalb der Auswertungsbereiche bei den beschichteten Implantaten 86,97%, wohingegen dieser bei den unbeschichteten 69,10% beträgt.

Tabelle 18 Modellvorhersage für den Parameter BV/TV 1,5

Die Tabelle enthält das Ergebnis des generalisierten hierarchischen linearen Modells mit dem Parameter BV/TV 1,5 als abhängige Variable, unter Einbeziehung von Wiederholungsmessungen (Abhängigkeiten) von Schrauben innerhalb von Tieren. Sie zeigt zu jedem Untersuchungszeitpunkt die Modellvorhersage des Parameters BV/TV 1,5 für das unbeschichtete und das beschichtete Implantat sowie den dazugehörigen p -Wert der Differenz.

Implantationszeit	Volumenanteil mineralisierten Knochens BV/TV 1,5 mm		p -Wert
	Unbeschichtetes Implantat	Beschichtetes Implantat	
6 Monate	81,37%	81,97%	0,823
12 Monate	82,59%	81,87%	0,806
18 Monate	69,10%	86,97%	<0,001

Deutlich wird dies vor allem in der exemplarischen 3D-Darstellung des mineralisierten Knochens innerhalb der Auswertungsbereiche. So erkennt man um die ursprüngliche Implantatgrenze beim unbeschichteten Implantat deutliche Lakunen und Leerbereiche sowie, dass nur noch im unteren Bereich der Schraube Knochen angrenzt und die Leerräume bis zu

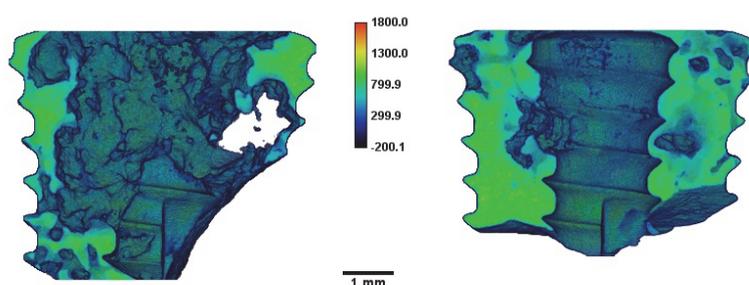


Abb. 55 3D-Darstellung des Knochens im Abstand von 1,5 mm

Die Abbildung zeigt die 3D-Darstellung des Knochens im Abstand von 1,5 mm um das Implantat im Querschnitt innerhalb des jeweiligen Auswertungsbereichs nach 18 Monaten Implantationszeit. In der Mitte unten ist der Maßstab, oben das Farbschema angegeben, in das die der Dichte des Materials entsprechenden Grauwerte des Micro-CTs übertragen wurden. Links ist ein unbeschichtetes Implantat (BV/TV 1,5 49,72%), rechts ist ein beschichtetes (BV/TV 1,5 80,51%) dargestellt.

1,5 mm zur Außengrenze des Auswertungsbereichs reichen (Abb. 55). Dagegen erkennt man die ursprüngliche Grenze des beschichteten Implantats sehr gut und der umliegende Knochen zeigt eine größtenteils homogene Struktur. Es sind dort keine größeren Leerräume erkennbar.

4.2.2 Vergleich des Flächenanteils an mineralisiertem Knochen (BA/TA) in 2 Regionen um das Implantat zu jedem Untersuchungszeitpunkt

In der histomorphometrischen Untersuchung wurden die Flächenanteile an mineralisiertem Knochen um die ursprünglichen Implantatgrenzen anhand eines Schliffes, welcher das verbliebene Implantat im Querschnitt mit dem umliegenden Gewebe zeigt, quantifiziert. Mit dieser zweidimensionalen Untersuchung konnten die Gewebe besser voneinander differenziert und die Auswirkungen der Degradation auf den umliegenden Knochen bis 0,5 mm und bis 1,5 mm von der ursprünglichen Implantatgrenze untersucht werden. Die beiden Auswertungsbereiche schließen den *Sinus frontalis* nicht mit ein und bilden die Gesamtfläche des jeweiligen Auswertungsbereichs (total area = TA). Der Quotient (BA/TA) aus der Fläche des mineralisierten Knochens (bone area = BA) innerhalb des jeweiligen Auswertungsbereichs (BA 0,5 und BA 1,5) und seiner Gesamtfläche (TA) zeigt an, ob die Gasfreisetzung den umliegenden Knochen verändert hat.

4.2.2.1 Vergleich des Flächenanteils an mineralisiertem Knochen (BA/TA 0,5) zwischen ursprünglicher Implantatgrenze und 0,5 mm Abstand

Das Ergebnis der histologischen Untersuchung (Abb. 56) bestätigt das Ergebnis der radiologischen Untersuchung. So bleibt der Mittelwert des Flächenanteils an mineralisiertem Knochen nach 6 und 12 Monaten beim unbeschichteten und beschichteten Implantat annähernd gleich (Abb. 56). Nach 18 Monaten zeigt sich auch hier, wie in der radiologischen Untersuchung, der größte Unterschied.

So ist nach dieser Implantationszeit der Mittelwert des Knochenanteils um die beschichteten Implantate höher, liegt aber dennoch deutlich unter dem Mittelwert des Parameters aus 6 analysierten Nativproben, welcher einen Flächenanteil von 80,70% an mineralisiertem Knochen ergab.

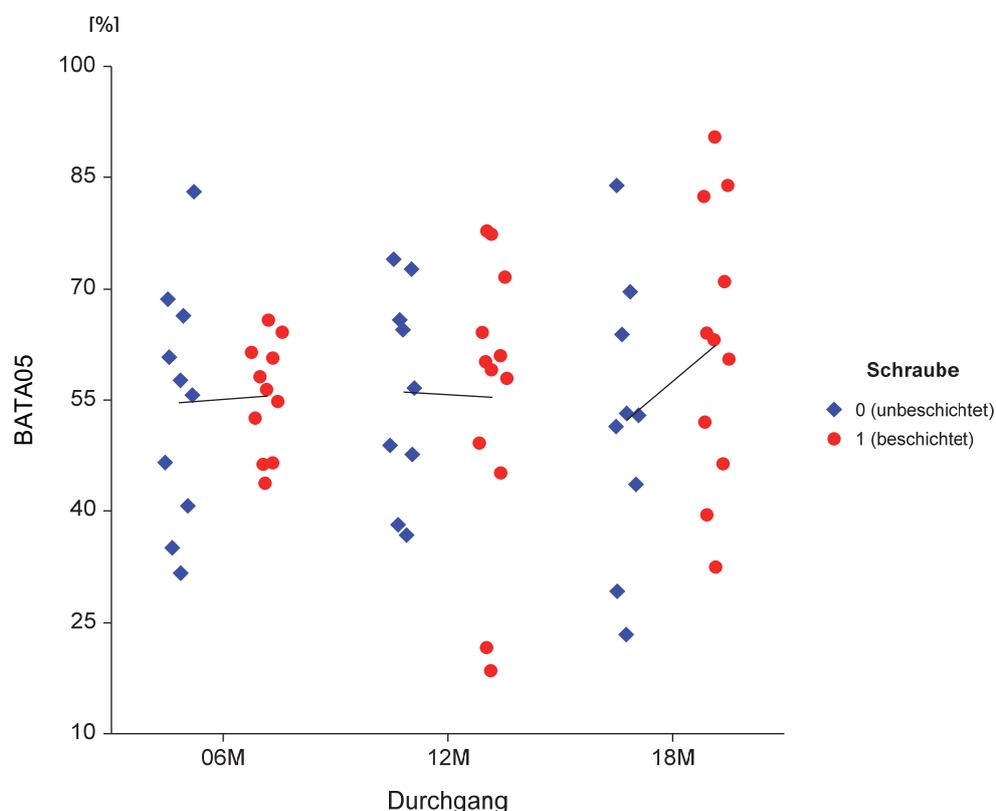


Abb. 56 Jiggered dot plot für den Parameter BA/TA 0,5

Die Abbildung zeigt den jiggered dot plot für den Parameter BA/TA 0,5, welcher auf der Y-Achse den prozentualen Flächenanteil an mineralisiertem Knochen zwischen ursprünglicher Implantatgrenze und 0,5 mm Abstand innerhalb des Auswertungsbereichs angibt und auf der X-Achse den Durchgang mit der Länge der Implantationszeit getrennt nach Schraubentyp als Legenden-Variable (unbeschichtete Schrauben blau, beschichtete Schrauben rot). Darüber hinaus wird die Mittelwertverbindungsline zwischen den beiden Schraubentypen zu jedem Untersuchungszeitpunkt dargestellt.

Das Ergebnis des generalisierten hierarchischen Modells (Tabelle 19) bestätigt diese Beobachtungen. So beträgt der Unterschied des Knochenanteils im Auswertungsbereich im Mittel nach 6 Monaten 0,89% ($p = 0,823$; BA/TA unbeschichtetes Implantat = 54,70%; BA/TA

beschichtetes Implantat = 55,59%) und nach 12 Monaten 2,37% ($p = 0,607$; BA/TA unbeschichtetes Implantat = 57,66%; BA/TA beschichtetes Implantat = 55,29%). Die größte mittlere Differenz besteht nach 18 Monaten. Dabei liegen zwischen der ursprünglichen Implantatgrenze und 0,5 mm Abstand im Auswertungsbereich 52,40% Flächenanteil an mineralisiertem Knochen bei den unbeschichteten Implantaten vor, bei den beschichteten dagegen 62,36% ($p = 0,217$; Differenz = 9,96%).

Tabelle 19 Modellvorhersage für den Parameter BA/TA 0,5

Die Tabelle enthält das Ergebnis des generalisierten hierarchischen linearen Modells mit dem Parameter BA/TA 0,5 als abhängige Variable, unter Einbeziehung von Wiederholungsmessungen (Abhängigkeiten) von Schrauben innerhalb von Tieren. Sie zeigt zu jedem Untersuchungszeitpunkt die Modellvorhersage des Parameters BA/TA 0,5 für das unbeschichtete und das beschichtete Implantat sowie den dazugehörigen p-Wert der Differenz.

Implantationszeit	Flächenanteil mineralisierten Knochens BA/TA 0,5 mm		p-Wert
	Unbeschichtetes Implantat	Beschichtetes Implantat	
	6 Monate	54,70%	
12 Monate	57,66%	55,29%	0,607
18 Monate	52,40%	62,36%	0,217

Das Ergebnis lässt sich auch optisch durch die Schlicke sehr gut veranschaulichen (Abb. 57). Die Umgebung der restlichen unbeschichteten Schraube ist vor allem von Leerfläche und Hohlräumen umgeben, wohingegen die noch vorhandene beschichtete Schraube weitestgehend von mineralisiertem Knochen umgeben ist.

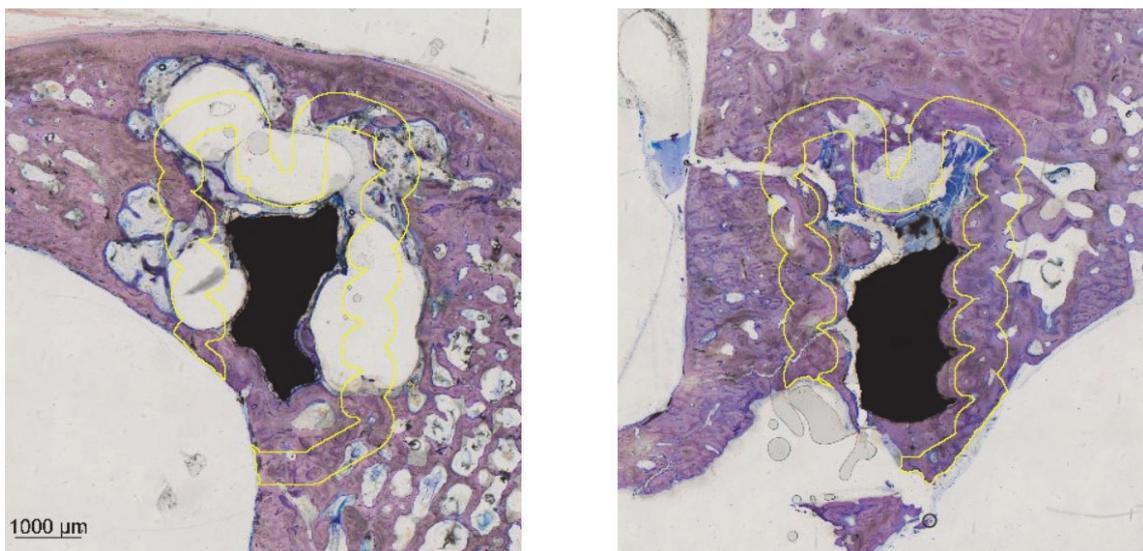


Abb. 57 Histologisch aufbereitete Proben nach 18 Monaten Implantationszeit

Die Abbildung zeigt histologisch aufbereitete Proben nach 18 Monaten Implantationszeit. Links ist ein unbeschichtetes Implantat, rechts ein beschichtetes dargestellt. Der Bereich zwischen innerer und äußerer gelber Markierung gibt den Auswertungsbereich der jeweiligen Probe an, in welchem die Fläche des mineralisierten Knochens quantifiziert wurde. Links ist das Ergebnis der Analyse 23,37% BA/TA 0,5, rechts 70,97% BA/TA 0,5.

4.2.2.2 Vergleich des Flächenanteils an mineralisiertem Knochen (BA/TA 1,5) zwischen ursprünglicher Implantatgrenze und 1,5 mm Abstand

Die Untersuchung des Flächenanteils an mineralisiertem Knochen zwischen ursprünglicher Implantatgrenze und 1,5 mm Abstand ergab im Wesentlichen das gleiche Ergebnis wie die vorherige Untersuchung mit dem Abstand 0,5 mm. So sind die Mittelwerte des Parameters der unbeschichteten und beschichteten Proben nach 6 und 12 Monaten Implantationszeit ähnlich. Erst nach 18 Monaten liegt der Mittelwert der beschichteten Implantate deutlich höher (Abb. 58) und nähert sich dem Mittelwert (82,33%) von 6 analysierten Nativproben nur an.

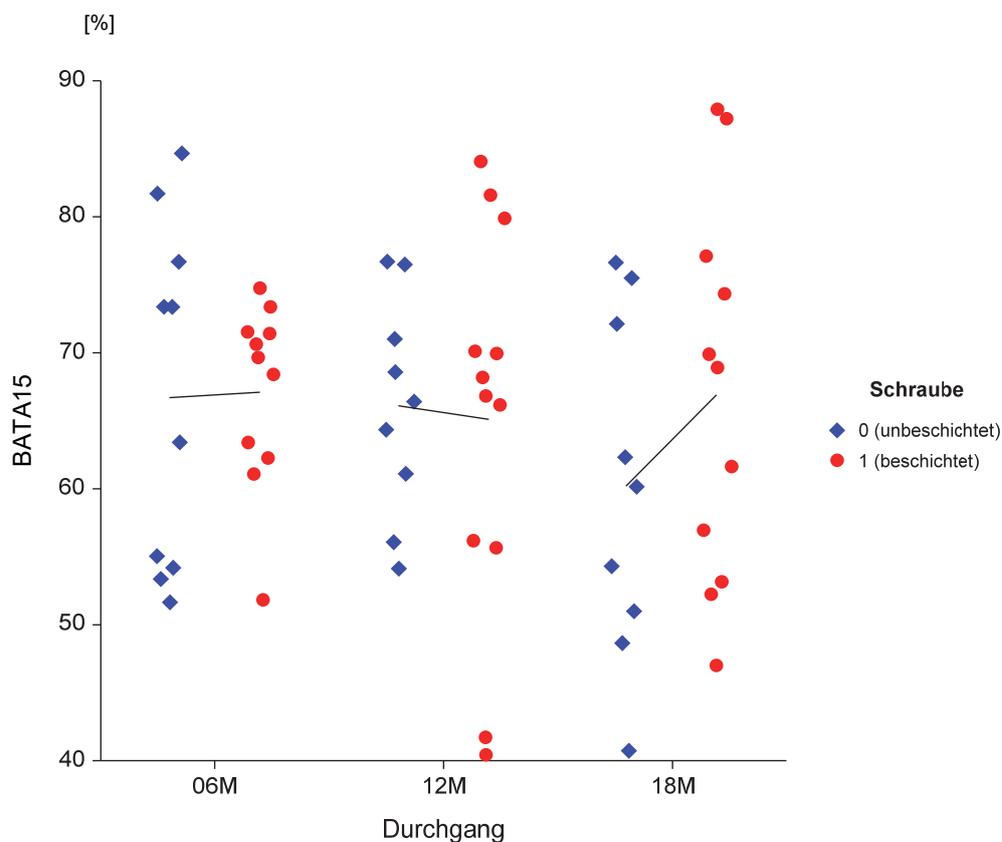


Abb. 58 Jittered dot plot für den Parameter BA/TA 1,5

Die Abbildung zeigt den jittered dot plot für den Parameter BA/TA 1,5, welcher auf der Y-Achse den prozentualen Flächenanteil an mineralisiertem Knochen zwischen ursprünglicher Implantatgrenze und 1,5 mm Abstand innerhalb des Auswertungsbereichs angibt und auf der X-Achse den Durchgang mit der Länge der Implantationszeit getrennt nach dem Schraubentyp als Legenden-Variable (unbeschichtete Schrauben blau, beschichtete Schrauben rot). Darüber hinaus wird die Mittelwertverbindungsline zwischen den beiden Schraubentypen zu jedem Untersuchungszeitpunkt dargestellt.

In der Modellvorhersage (Tabelle 20) für diese histologische Untersuchung nach 6 Monaten Implantationszeit beträgt der mittlere Flächenanteil an mineralisiertem Knochen um das unbeschichtete Implantat 66,90%. Um das beschichtete Implantat weist dieser mit 67,37% lediglich 0,47% ($p = 0,887$) mehr auf. Nach 12 Monaten ist der mittlere Unterschied von 1,85% Flächenanteil an mineralisiertem Knochen im Auswertungsbereich ebenfalls sehr

gering ($p = 0,539$; BA/TA unbeschichtetes Implantat = 66,91%; BA/TA beschichtetes Implantat = 65,06%). Nach 18 Monaten besteht die gleiche Tendenz wie in der vorherigen Untersuchung und bestätigt die Ergebnisse der radiologischen Untersuchung. Der mittlere Unterschied der Flächenanteile an mineralisiertem Knochen ist dann am höchsten und beträgt 6,30% ($p = 0,24$; BA/TA unbeschichtetes Implantat = 60,58%; BA/TA beschichtetes Implantat = 66,88%).

Tabelle 20 Modellvorhersage für den Parameter BA/TA 1,5

Die Tabelle enthält das Ergebnis des generalisierten hierarchischen linearen Modells mit dem Parameter BA/TA 1,5 als abhängige Variable, unter Einbeziehung von Wiederholungsmessungen (Abhängigkeiten) von Schrauben innerhalb von Tieren. Sie zeigt zu jedem Untersuchungszeitpunkt die Modellvorhersage des Parameters BA/TA 1,5 für das unbeschichtete und das beschichtete Implantat sowie den dazugehörigen p -Wert der Differenz.

Implantationszeit	Flächenanteil mineralisierten Knochens		p -Wert
	BA/TA 1,5 mm		
	Unbeschichtetes Implantat	Beschichtetes Implantat	
6 Monate	66,90%	67,37%	0,887
12 Monate	66,91%	65,06%	0,539
18 Monate	60,58%	66,88%	0,24

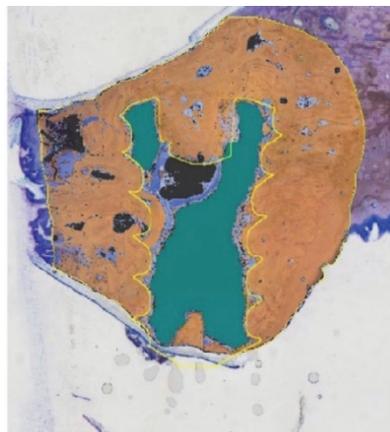
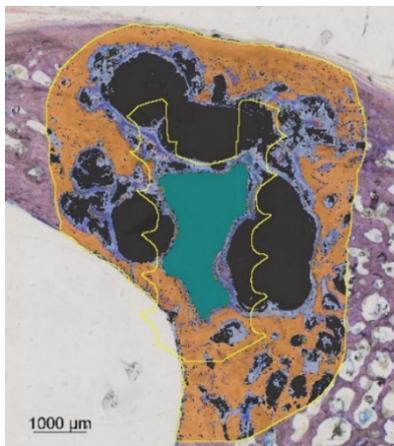


Abb. 59 Zwei Schiffe nach der histomorphometrischen Analyse

Die Abbildung zeigt Schiffe nach der histomorphometrischen Analyse. Links ist ein unbeschichtetes Implantat abgebildet, rechts ein beschichtetes Implantat, beide nach 18 Monaten Implantationszeit. Der Auswertungsbereich des Parameters BA/TA 1,5 liegt zwischen innerer gelber Markierung, welche die ursprüngliche Implantatgrenze zeigt, und äußerer gelber Markierung mit 1,5 mm Abstand. Innerhalb des Auswertungsbereichs wurden die verschiedenen Gewebe quantifiziert. Noch nicht resorbiertes Implantatmaterial ist grün, Leerräume sind grau, Degradationsmaterial ist ocker und mineralisierter Knochen ist orange dargestellt. Links beträgt das Ergebnis des Anteils an mineralisiertem Knochen im jeweiligen Gesamtauswertungsbereich um das unbeschichtete Implantat 40,73%, um das beschichtete Implantat rechts 87,9%. Der Maßstab befindet sich in der linken unteren Ecke.

Die in Abb. 59 exemplarisch dargestellten analysierten Schiffe zeigen, dass um das unbeschichtete Implantat deutlich mehr Leerräume existieren und weniger mineralisierter Knochen festzustellen ist als um das beschichtete Implantat. Um das PEO-oberflächenbeschichtete Implantat zeigt sich bis auf einige kleine Leerräume eine homogene Verteilung an mineralisiertem Knochen um das Implantat.

4.2.3 Untersuchung des Volumenanteils an mineralisiertem Knochen (BV/TV) in 2 Regionen um das Implantat zwischen den Untersuchungszeitpunkten

4.2.3.1 Vergleich des Volumenanteils an mineralisiertem Knochen (BV/TV 0,5) zwischen den Entnahmezeitpunkten nach 6 Monaten und 18 Monaten für beide Schrauben

Die Untersuchung der unbeschichteten und der beschichteten Schrauben (Abb. 60) zwischen den Untersuchungszeitpunkten zeigt den Einfluss der reduzierten Korrosionsgeschwindigkeit auf den umliegenden Knochen. Beim unbeschichteten Implantat liegt der Mittelwert des Parameters BV/TV 0,5 nach 6 Monaten leicht niedriger als nach 12 Monaten und ist nach 18 Monaten deutlich niedriger als nach 6 Monaten Implantationszeit. Bei den beschichteten Proben ist dagegen eine Erhöhung des Mittelwerts des Volumenanteils an mineralisiertem Knochen von Entnahmezeitpunkt zu Entnahmezeitpunkt zu beobachten.

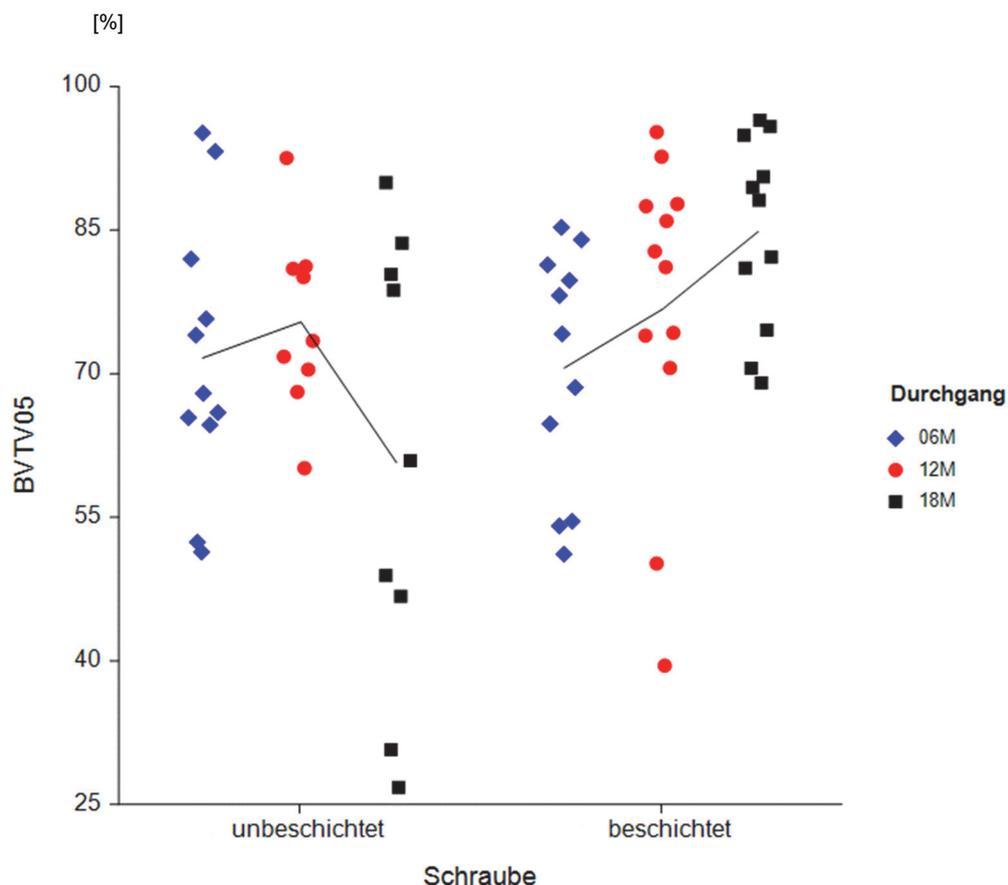


Abb. 60 Jiggered dot plot für den Parameter BV/TV 0,5 zwischen den Untersuchungszeitpunkten der jeweiligen Schraube

Die Abbildung zeigt den jiggered dot plot für den Parameter BV/TV 0,5, welcher auf der Y-Achse den prozentualen Volumenanteil an mineralisiertem Knochen innerhalb des Auswertungsbereichs darstellt und auf der X-Achse den Schraubentyp (unbeschichtet und beschichtet) zu jedem Untersuchungszeitpunkt (Durchgang) als Legenden-Variable inklusive Mittelwertverbindungslinien zwischen den Durchgängen der jeweiligen Schraube.

Die statistische Modellberechnung (Tabelle 21) zwischen der ersten Entnahme nach 6 Monaten Implantationszeit und der letzten Entnahme nach 18 Monaten Implantationszeit zeigt, dass der Volumenanteil an mineralisiertem Knochen um das beschichtete Implantat im Mittel nach 18 Monaten mit 85,01% signifikant höher ist ($p = 0,035$; Differenz = 13,99%) als nach 6 Monaten mit 71,02%, wohingegen der mittlere Anteil beim unbeschichteten Implantat nach 6 Monaten 71,72% beträgt und nach 18 Monaten mit 59,24% ($p = 0,141$; Differenz = 12,48%) niedriger ist.

Tabelle 21 Modellvorhersage für den Parameter BV/TV 0,5 zwischen den Untersuchungszeitpunkten nach 6 und 18 Monaten

In der Tabelle ist das Ergebnis des generalisierten hierarchischen linearen Modells mit dem Parameter BV/TV 0,5 als abhängige Variable, unter Einbeziehung von Wiederholungsmessungen (Abhängigkeiten) von Schrauben innerhalb von Tieren dargestellt. Sie zeigt die Modellvorhersagen des Parameters BV/TV 0,5 zwischen den Untersuchungszeitpunkten nach 6 und 18 Monaten für das jeweilige Implantat sowie den dazugehörigen p-Wert der Differenz.

	Volumenanteil mineralisierten Knochens BV/TV 0,5 mm		p-Wert
	6 Monate	18 Monate	
Unbeschichtetes Implantat	71,72%	59,24%	0,141
Beschichtetes Implantat	71,02%	85,01%	0,035

4.2.3.2 Vergleich des Volumenanteils an mineralisiertem Knochen (BV/TV 1,5) zwischen den Entnahmezeitpunkten nach 6 Monaten und 18 Monaten für beide Schrauben

Beim Vergleich des Parameters BV/TV 1,5 zwischen den Entnahmezeitpunkten der Schrauben nach 6 und 18 Monaten (Abb. 61) zeigt sich wie bei dem Parameter BV/TV 0,5 für die unbeschichteten Implantate ein niedrigerer Mittelwert beim letzten Entnahmezeitpunkt als bei den vorherigen. Dementgegen zeigt sich bei den beschichteten Implantaten die gleiche Tendenz wie bei der vorherigen Untersuchung. Der Mittelwert steigt mit der Länge der Implantationszeit an.

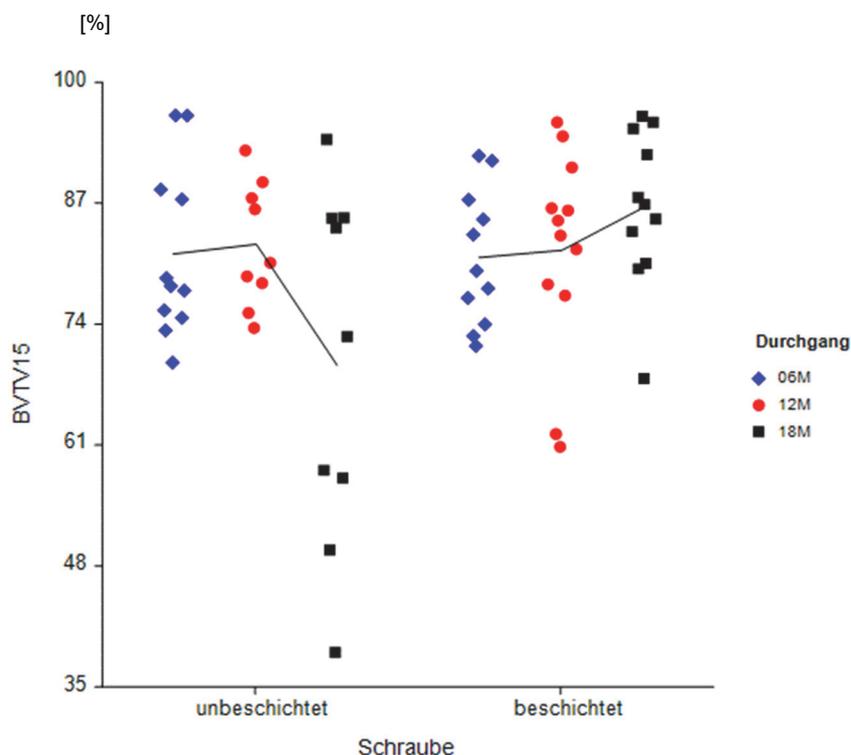


Abb. 61 Jittered dot plot für den Parameter BV/TV 1,5 zwischen den Untersuchungszeitpunkten der jeweiligen Schraube

Die Abbildung zeigt den jittered dot plot für den Parameter BV/TV 1,5, welcher auf der Y-Achse den prozentualen Volumenanteil an mineralisiertem Knochen innerhalb des Auswertungsbereichs darstellt und auf der X-Achse den Schraubentyp (unbeschichtet und beschichtet) zu jedem Untersuchungszeitpunkt (Durchgang) als Legenden-Variable inklusive Mittelwertverbindungslinien zwischen den Durchgängen der jeweiligen Schraube.

In der statistischen Modellvorhersage (Tabelle 22) ist der mittlere Unterschied des Volumenanteils an mineralisiertem Knochen beim unbeschichteten Implantat zwischen 6 und 18 Monaten Versuchszeit signifikant ($p = 0,034$). Nach 6 Monaten beträgt der mittlere Volumenanteil 81,75%, zum späteren Entnahmezeitpunkt ist er 13,66% niedriger und beträgt dann 68,09%. Der Volumenanteil an mineralisiertem Knochen zwischen ursprünglicher Implantatgrenze und 1,5 mm Abstand ist hingegen beim beschichteten Implantat zur

längsten untersuchten Implantationszeit um 4,91% ($p = 0,262$) höher als nach 6 Monaten (81,55%) und liegt bei 86,46%

Tabelle 22 Modellvorhersage für den Parameter BV/TV 1,5 zwischen den Untersuchungszeitpunkten nach 6 und 18 Monaten

In der Tabelle ist das Ergebnis des generalisierten hierarchischen linearen Modells mit dem Parameter BV/TV 1,5 als abhängige Variable, unter Einbeziehung von Wiederholungsmessungen (Abhängigkeiten) von Schrauben innerhalb von Tieren dargestellt. Sie zeigt die Modellvorhersagen des Parameters BV/TV 1,5 zwischen den Untersuchungszeitpunkten nach 6 und 18 Monaten für das jeweilige Implantat sowie den dazugehörigen p-Wert der Differenz.

	Volumenanteil mineralisierten Knochens BV/TV 1,5 mm		p-Wert
	6 Monate	18 Monate	
Unbeschichtetes Implantat	81,75%	68,09%	0,034
Beschichtetes Implantat	81,55%	86,46%	0,262

5 Diskussion

Der größte Vorteil von Osteosynthesystemen auf Magnesiumbasis besteht wohl in der Resorbierbarkeit des Materials, wodurch auf eine zweite Operation zur Materialentfernung verzichtet werden kann. Auch die mechanischen und osteostimulativen Eigenschaften sowie die Biokompatibilität können sich gegenüber anderen Materialien als Vorteil erweisen. Die bisherigen Limitationen, welche sich durch zu schnelle Degradation und damit einhergehende Gasfreisetzung zeigten, können durch Legieren und Beschichtung der Oberfläche verbessert werden.

Um neue Erkenntnisse über die PEO-Oberflächenmodifikation von Magnesiumimplantaten *in vivo* zu gewinnen und die Verwendbarkeit der Implantate für den routinemäßigen Einsatz beim Menschen weiter zu evaluieren, hatte die vorliegende Dissertation zum Ziel, ZX00-Magnesiumimplantate mit und ohne PEO-Oberflächenmodifikation über den Versuchszeitraum von 6, 12 und 18 Monaten im Großtier zu untersuchen.

Durch Tierversuche können wichtige Erkenntnisse über das Verhalten von resorbierbaren Implantaten *in vivo* für den unbedenklichen Einsatz beim Menschen gewonnen werden. Die bisherigen Erkenntnisse deuten auf das große Potenzial von Magnesiumlegierungen als Implantationsmaterial hin, welches durch PEO-Oberflächenmodifikation noch weiter verbessert werden könnte. Zentraler Gegenstand dieser Arbeit war der Vergleich des Degradationsverhaltens sowie der Vergleich des Knochenanteils des dem Implantat anliegenden Knochens von PEO-modifizierten gegenüber nichtmodifizierten ZX00-Schrauben durch Micro-CT und histomorphometrische Untersuchung erstmalig über den Versuchszeitraum von 6, 12 und 18 Monaten nach Implantation in das *Os frontale* von Göttinger Minipigs.

5.1 Versuchsdurchführung

Bei der Explantation der Proben aus dem *Os frontale* zeigte sich, dass die Schrauben aller Legierungen, die in die Knochen verbracht wurden, disloziert waren. Die Tiefe der Dislokation der ZX00-Schrauben war nach allen drei Implantationszeiten ähnlich. Somit wird angenommen, dass die stärkste Dislokation innerhalb der ersten 6 Monate stattfand oder die Ursache nur in den äußeren Bereichen der Kortikalis des *Os frontale* liegt.

Im Rahmen einiger Studien in der Pädiatrie wurden in junge Schweine und Lämmer ebenfalls Implantate in das *Os frontale* eingebracht. Im Laufe des Wachstums migrierten diese immer weiter in das *Os frontale* bis in den *Sinus frontalis* (YU et al. 1996, PELTONIEMI et al. 1999, WILTFANG et al. 1999) oder die Nasenhaupthöhle (HÖNIG et al. 1999). Es kam in diesen Studien dadurch zu keinen klinischen Komplikationen (YU et al. 1996,

PELTONIEMI et al. 1999, HÖNIG et al. 1999, WILTFANG et al. 1999). Durch den PIT-Effekt (passive intracranial translocation) können Osteosynthesesysteme auf dem wachsenden Schädeldach durch appositionelles Knochenwachstum und intrakranielle Resorption passiv in den Knochen dislozieren (HÖNIG et al. 1995). Somit sind speziell für den Einsatz in der pädiatrischen Medizin resorbierbare Osteosynthesematerialien von großem Vorteil (WEINGART et al. 2001, PAPAY et al. 1995). Die unbeabsichtigte Migration von Implantaten wird immer wieder in der Humanmedizin als mögliche Komplikation nach kraniofazialer Chirurgie beschrieben (GONZÁLEZ-GARCÍA et al. 2012, LAURETI et al. 2017). Durch Perforation des Epithels mit Zugang zu den Nebenhöhlen kann das Risiko einer Entzündung *post implantationem* ansteigen (BRUNNER 2006). Die verwendeten Magnesium- und Titanimplantate von NAUJOKAT et al. (2017) ragten durch die dünne Knochenschicht des *Os frontale* weit in den *Sinus frontalis* und führten hier zu keiner entzündlichen Reaktion. In der hier vorliegenden Studie konnten ebenfalls keine klinischen Symptome einer Nasennebenhöhlenentzündung sowie histologisch entzündlich veränderte Bereiche um die Implantate festgestellt werden.

Die in der hier vorliegenden Studie verwendeten locking Implantate wurden ohne die dazugehörigen Platten eingesetzt. Neben weiteren mechanischen vorteilhaften Eigenschaften können Mini-Locking-Systeme zu einer höheren Stabilität als herkömmliche Osteosynthesesysteme führen (GUTWALD et al. 2003, LEUNG et al. 2008). Bei diesen locking Implantaten, bestehend aus einer Miniplatte und Schrauben, führt die Verankerung der Schrauben im Knochen und die Verriegelung der Schrauben mit der Platte zu einer Übertragung der Belastungskräfte des Knochens auf die Schraube und von dort auf die Platte (GUTWALD et al. 2003). Dadurch kann ein direkter Druck von der Platte auf den Knochen vermieden werden, wodurch es zu einer geringeren Beeinträchtigung der Knochendurchblutung kommt (ALPERT et al. 2003). Aufgrund des steifen Fixationsprinzips kann durch Verriegelung beim Anziehen der Schraube einer Verformung der Fraktur nach Auflegen der Platte vorgebeugt werden (ALPERT et al. 2003, GUTWALD et al. 2003, LEUNG et al. 2008).

Die durch den Druck anderer Osteosynthesesysteme ausgelöste Minderdurchblutung kann zu einer Resorption des Knochens unmittelbar unter der Platte führen, sodass diese intrakraniell transloziert. Dieser Effekt wird von HÖNIG et al. (1995) als AIT (active intracranial translocation) beschrieben.

Gemäß des in anderen Studie postulierten Gewichts für adulte Göttinger Minipigs (GUTIERREZ et al. 2015, SIMIANER und KÖHN 2010, BOLLEN und ELLEGAARD 1997) kann davon ausgegangen werden, dass die in dieser Studie verwendeten Tiere bereits ausgewachsen waren. In einer anderen Studie mit adulten Göttinger Minipigs wurde auch eine Migration von Schrauben beobachtet, welche ohne Platte eingebracht worden waren

(HEIDEMANN 2001). Vermutlich hat die Dislokation der Implantate verschiedene Ursachen. Zur Untersuchung des Einflusses der PEO-Beschichtung auf Degradation und Reaktion des umliegenden Knochens wurden die winkelstabilen Schrauben ohne Platten in das *Os frontale* eingebracht. Vermutlich fehlt durch den Verzicht auf die Platten die Verankerung in der Kortikalis. Appositionelles Wachstum des Schädelknochens und Umbauprozesse (ENDERLE 1992, KENKRE und BASSETT 2018), auch durch das Vorbohren und Einbringen des Implantats, könnten letztlich zu einer Migration der Schrauben in den Knochen geführt haben. Weil sich hieraus keine nachteiligen Effekte für die Tiere während des Versuchs ergaben und auf eine zweite Operation zur Entfernung der Implantate verzichtet werden kann, könnte sich das Material dennoch als geeignet für die pädiatrische kraniofaziale Chirurgie erweisen. Da die Implantate in der vorliegenden Studie allerdings nur hinsichtlich ihres Degradationsverhaltens und nicht im Frakturmodell untersucht wurden, kann bezüglich einer Frakturheilung keine Aussage getroffen werden. Die Dislokation konnte bei der Untersuchung des umliegenden Knochens berücksichtigt werden, sodass keine Bereiche des *Sinus frontalis* von den Auswertungsbereichen erfasst wurden.

5.2 Untersuchung der Degradation

Die erste zu untersuchende Hypothese bestand aus der Annahme, dass die PEO-Beschichtung die Korrosion der Implantate verzögert und diese somit langsamer resorbiert werden.

Die Ergebnisse zeigen, dass in der Micro-CT-Untersuchung zu jedem Entnahmezeitpunkt der Volumenanteil an nicht resorbiertem Implantationsmaterial (SV/TV) bei den beschichteten Implantaten höher ist als bei den unbeschichteten. Bereits nach 6 Monaten zeigt sich ein deutlicher, wenngleich nicht signifikanter Unterschied. Nach 12 und 18 Monaten ist dieser Unterschied signifikant. Der Vorteil der Micro-CT-Untersuchung liegt darin, dass das komplette Implantat dreidimensional untersucht werden kann. Das Micro-CT stellt in unterschiedlichen Grauwerten die unterschiedlichen Dichten von Materialien dar. Somit kann durch das Festlegen von Thresholdwerten die Dichte für das Implantatmaterial bestimmt werden. Da dieser Grenzwertbereich allerdings als Mittelwert festgelegt wurde, ist davon auszugehen, dass leichte Ungenauigkeiten entstehen können. Vor allem in Grenzbereichen können nicht nur unresorbiertes Implantatmaterial, sondern auch Knochen und Degradationsmaterial miterfasst werden. Dadurch können die gemessenen Parameter etwas höher liegen als in der histologischen Untersuchung. Die Ergebnisse der histologischen Untersuchung, bei der die Gewebe exakt voneinander abgegrenzt werden können, dafür aber nur eine zweidimensionale Auswertung des Querschnitts des Implantats zulassen, zeigen dennoch die gleichen Tendenzen. So ist nach jedem Entnahmezeitpunkt der Flächenanteil (SA/TA) an nicht resorbiertem Implantatmaterial höher bei den

beschichteten Implantaten. Ein signifikanter Unterschied zeigt sich in dieser Untersuchung nach 12 Monaten Implantationszeit.

In der Micro-CT Untersuchung zeigt sich entgegen der Erwartung im Vergleich des residualen Schraubenanteils zwischen 6 und 12 Monaten bei den beschichteten Implantaten keine Abnahme des Gesamtschraubenvolumens. Vermutlich wird zwischen diesen beiden Entnahmezeitpunkten die Degradation durch die PEO-Beschichtung erfolgreich verlangsamt, könnte aber auch auf die geringe Probenanzahl oder auf unbekannte Inhomogenitäten zwischen den Tieren zurückzuführen sein. Sie nimmt auch zum Entnahmezeitpunkt nach 18 Monaten nur wenig weiter ab, sodass der Vergleich des Residualvolumens der beschichteten Implantate nach 6 und 18 Monaten nicht signifikant ist. Bei den unbeschichteten Proben zeigt sich in der Modellvorhersage eine signifikante Abnahme zwischen dem ersten und dem letzten Entnahmezeitpunkt, was eine deutlich schnellere Degradation durch die fehlende Beschichtung vermuten lässt. Andere Studien bestätigten ebenfalls die Verlangsamung der Degradation durch PEO-Beschichtung (SCHALLER et al. 2016a, SCHALLER et al. 2016b, IMWINKELRIED et al. 2013, RENDENBACH et al. 2021).

So kann durch die PEO-Beschichtung bei der Legierung WE43 eine frühzeitige Korrosion verhindert und die Gasfreisetzung im Vergleich zu unbeschichteten Implantaten verzögert werden (SCHALLER et al. 2016a, SCHALLER et al. 2017, SCHALLER et al. 2016b, RENDENBACH et al. 2021). In der Studie von SCHALLER et al. (2016b) wurden Schrauben von ähnlicher Dimension wie in dieser Studie mit Platten verwendet, dabei zeigte sich sowohl nach 12 als auch nach 24 Wochen ein signifikant größeres Residualvolumen der PEO-beschichteten WE43 Implantate.

In einer Studie von RENDENBACH et al. (2021) wurde dieses Ergebnis bestätigt, sodass nach 6 Monaten ein signifikanter Unterschied des Residualvolumens zwischen den PEO-modifizierten und den nichtmodifizierten WE43 Schrauben beschrieben wurde. Jedoch war der Unterschied nach 12 Monaten nicht mehr signifikant (RENDENBACH et al. 2021). Sie schlussfolgern, dass die PEO-Modifikation die Korrosion innerhalb der ersten 6 Monate erfolgreich verlangsamt und danach schneller fortschreitet, weil die PEO-Oberflächenmodifikation nur die Oberfläche des Implantats verändert (RENDENBACH et al. 2021).

IMWINKELRIED et al. (2013) kommen in ihrer Studie zu einem ähnlichen Ergebnis. Sie postulieren, dass sowohl die Umgebung der Implantate die Korrosionsgeschwindigkeit wesentlich beeinflusst als auch die Beschichtung die Implantate nur anfänglich vor schneller Korrosion schützt und sich auf lange Sicht die Degradationsraten von beschichteten und unbeschichteten Implantaten angleichen (IMWINKELRIED et al. 2013).

In einer anderen Arbeitsgruppe wurde eine schnell korrodierende ZX50-Legierung, welche ebenfalls Zink und Calcium enthält, jeweils mit und ohne MAO-Beschichtung untersucht

(FISCHERAUER et al. 2013). Die Beschichtung schützte die Pins besonders in der ersten Woche nach der Implantation, bevor nach 3 Wochen eine stärkere Degradation einsetzte und die beschichteten Pins sogar insgesamt früher komplett resorbiert waren (FISCHERAUER et al. 2013). Nach bereits 16 Wochen konnte kein Implantationsmaterial der MAO-beschichteten als auch der unbeschichteten Pins mehr nachgewiesen werden (FISCHERAUER et al. 2013). Als Ursache für die beschleunigte Korrosion der MAO-beschichteten ZX50-Implantate werden inhomogene lokale Korrosionsnester aufgrund der rauen Oberfläche vermutet (FISCHERAUER et al. 2013). Die Porosität und der schichtartige Aufbau der modifizierten Oberfläche können die Degradation nur zu Beginn verlangsamen (FISCHERAUER et al. 2013). Sobald allerdings Flüssigkeiten durch Mikrorisse und Poren der Beschichtung direkt zum Implantat durchbrechen, kommt es zu lokalen Korrosionsnestern und dort zu einer raschen Korrosion der ZX50-Legierung (FISCHERAUER et al. 2013, AMERSTORFER et al. 2016).

KOPP et al. (2019) postulieren, dass eine PEO-Modifikation bei bioresorbierbaren WE43 Scaffolds die Degradation erfolgreich verlangsamt, allerdings nach circa 21 Tagen die Oberflächenstabilität abnimmt und durch Mikrorisse die Degradation zum Implantatinneren fortschreitet. Interessanterweise zeigen sich in der vorliegenden Studie weder eine beschleunigte Degradation der PEO-modifizierten Implantate wie bei FISCHERAUER et al. (2013), noch ein angleichen der Degradationsraten nach anfänglichen Korrosionsschutzes wie von IMWINKELRIED et al. (2013) erwartet. Auch der Unterschied des Residualvolumens ist vor allem nach 12 und 18 Monaten ausgeprägt und nicht nur nach 6 Monaten wie bei RENDENBACH et al. (2021).

GRÜN et al. (2018b) untersuchten in ihrer Studie Pins der Legierung ZX00 in ähnlicher Mengenzusammensetzung wie in der vorliegenden Studie sowohl im Groß- als auch Kleintiermodell. Die Implantate waren nach 24 Wochen noch zu 80% vorhanden und sie vermuten, dass die Implantate erst nach 2 Jahren vollständig abgebaut wären. In derselben Arbeitsgruppe zeigten HOLWEG et al. (2020b) bei der Verwendung von ZX00-Schrauben in einer klinischen Studie am Menschen schon sehr vielversprechende Ergebnisse für das Implantationsmaterial. Die Schrauben mit einem ähnlichen Durchmesser (Länge 40 mm, Durchmesser 3,5 mm) wie in dieser Studie (Länge 5 mm, Durchmesser 2,3 mm), die für Malleolusfrakturen eingesetzt wurden, waren beim CT-Scan nach einem Jahr noch zu circa 50% erhalten. Dieses Ergebnis stimmt mit dem Ergebnis der Micro-CT-Untersuchung der vorliegenden Studie nach 12 Monaten bei den unbeschichteten Schrauben überein.

Die unbeschichteten WE43 Schrauben (Länge 6 mm, Durchmesser 2 mm) in der Studie von SCHALLER et al. (2016b) waren nach 24 Wochen im Mittel noch zu 43% vorhanden, die unbeschichteten WE43 Schrauben (Länge 11 mm, Durchmesser 2,3mm) von RENDENBACH et al. (2021) nach 6 Monaten durchschnittlich zu 28,8% und nach 12

Monaten zu 17,4%, wohingegen das Residualvolumen der unbeschichteten ZX00-Schrauben in dieser Studie in der statistischen Berechnung nach 6 Monaten im Mittel 63,13% und nach 12 Monaten noch 51,39% beträgt. Da die Legierungszusammensetzung wesentlichen Einfluss auf die Degradationsgeschwindigkeit hat, kann gemutmaßt werden, dass die PEO-Beschichtung nicht nur zu Beginn die ZX00-Implantate vor schneller Degradation schützt, sondern auch die Ausbildung von Rissen und Poren in der PEO-Oberfläche langsamer abläuft und es selbst beim Vordringen von Flüssigkeit zum Implantatinneren lediglich zu einer, wie für die Legierung üblichen, allmählichen Degradation kommt, welche über einen Zeitraum bis zu 18 Monaten beobachtbar ist. Somit können die Ergebnisse bestätigen, dass die PEO-Beschichtung die Degradation erfolgreich verlangsamt und zeigen, dass dieser Effekt bei der in dieser Studie verwendeten Legierung ZX00 über den gesamten Versuchszeitraum, wenn auch erst nach 12 Monaten signifikant, festzustellen ist.

5.3 Untersuchung des Anteils an mineralisiertem Knochen um die Implantate

Die zweite zu untersuchende Hypothese bestand aus der Annahme, dass es durch die PEO-Oberflächenbeschichtung und der daraus resultierenden langsameren Degradation zu einer langsameren Freisetzung von Wasserstoff während des Korrosionsprozesses kommt und dies am Implantat anliegenden Knochen zu weniger Hohlräumen und somit zu einem höheren Knochenvolumen um die Implantate führt.

Der Prozess der Degradation führt bei der Resorption der Implantate zur proportionalen Freisetzung von Wasserstoff (KOPP et al. 2019). Die Geschwindigkeit der Degradation ist neben der Legierung und Oberflächenmodifikation vor allem auch vom Ort der Implantation abhängig (SANCHEZ et al. 2015). So wurde in vergangenen Studien häufig berichtet, dass die Implantatteile, welche den Weichteilgeweben anlagen oder im Markraum waren, schneller resorbiert wurden als die Anteile in der Kortikalis (SONG und ATRENS 1999, SANCHEZ et al. 2015, WITTE et al. 2006, WITTE et al. 2008).

Die Freisetzung von Wasserstoff durch Korrosion der Implantate führte zahlreichen Studien zufolge dazu, dass es zu subkutanen Gasansammlungen kam und sich intraossäre Hohlräume im Knochen um die Implantate bildeten (REIFENRATH et al. 2010, HUEHNERSCHULTE et al. 2012, SCHALLER et al. 2016a, SCHALLER et al. 2017, NAUJOKAT et al. 2017, IMWINKELRIED et al. 2013, DIEKMANN et al. 2016, MEIER und PANZICA 2017, CHAYA et al. 2015b). Für die Einheilung von Osteosyntheseimplantaten ist es erforderlich, dass sich ein dichtes Knochen-Implantat-Interface ausbildet und der implantatnahe Knochen nicht nachteilig verändert wird, um eine ausreichende Stabilität bis zu Frakturkonsolidierung und darüber hinaus bis zum vollständigen Abbau des Implantats zu gewährleisten (ZHENG et al. 2014). Um den umliegenden Knochen zu untersuchen, wurden

Bereiche von der ursprünglichen Implantatgrenze bis 0,5 mm und bis 1,5 mm in der Micro-CT-Untersuchung und der histomorphometrischen Untersuchung gewählt, da bis dorthin Änderungen der Knochenstruktur gegenüber Nativproben sichtbar waren. Subkutane Gasansammlungen wurden entgegen vergangenen Studien bei dieser Studie nicht beobachtet. Allerdings kann durch den dicken Weichteilmantel im Kopfbereich des Minipigs diese Beobachtung schwerer festgestellt werden.

Die Ergebnisse beider Untersuchungsmethoden zeigen für beide Bereiche im Wesentlichen die gleichen Tendenzen. So ist der Anteil an mineralisiertem Knochen um die Implantate nach 6 Monaten und 12 Monaten Implantationszeit bei beiden Implantaten sehr ähnlich. Es besteht für beide Bereiche erst nach 18 Monaten ein signifikanter Unterschied in der Micro-CT-Untersuchung zwischen der unbeschichteten und der beschichteten Schraube. Dieser zeigt, dass der Anteil an mineralisiertem Knochen im Gesamtauswertungsbereich (BV/TV) um die beschichteten Schrauben im Abstand von 0,5 mm und 1,5 mm zur ursprünglichen Implantatgrenze deutlich höher ist.

Im kleineren Auswertungsbereich, der die Entfernung bis 0,5 mm zur ursprünglichen Implantatgrenze erfasst, zeigt sich nach den ersten beiden Entnahmezeitpunkten bei denselben Implantaten ein geringerer Knochenvolumenanteil gegenüber dem Auswertungsbereich bis 1,5 mm. Dies war zu erwarten, da das durch die Degradation frei werdende Gas zunächst den größeren Einfluss auf das Gewebe haben müsste, welches einen geringeren Abstand zur Implantatgrenze hat. Die gleiche Vermutung teilt auch FISCHER (2021) aufgrund der Ergebnisse ihrer Studie. Interessanterweise liegen die Ergebnisse der Modellvorhersage nach 18 Monaten bei den beschichteten Implantaten in den beiden Auswertungsbereichen 0,5 mm und 1,5 mm sehr nahe, während beim unbeschichteten Implantat weiterhin eine größere Differenz besteht. Dies könnte auf eine verbesserte Einheilung und ein verbessertes Knochen-Implantat-Interface des beschichteten Implantats hinweisen, was für eine stabile Verankerung der Implantate zur Frakturheilung wünschenswert ist.

Die Ergebnisse der Micro-CT-Untersuchung zwischen den Zeitpunkten weisen ebenfalls auf einen positiven Einfluss der PEO-Beschichtung auf die Reaktion des Knochens hin. Betrachtet man nur den kleinen implantatnahen Auswertungsbereich, so zeigt sich eine signifikante Zunahme des Anteils an mineralisiertem Knochen bis zum letzten Entnahmezeitpunkt, während dieser am unbeschichteten Implantat abnimmt. Bei dem größeren Auswertungsbereich bis 1,5 mm um die ursprüngliche Implantatgrenze zeigt sich die gleiche Tendenz. Es kommt zu einer signifikanten Abnahme des Anteils an mineralisiertem Knochen um die unbeschichteten Implantate und einer Zunahme des Parameters für die beschichteten Schrauben.

Makroskopisch und auch in der histologischen Untersuchung konnten keine Hinweise auf fibröse Verkapselungen, Infektionen oder entzündliche Reaktionen im Knochen beobachtet werden. Im Gegensatz zu anderen Studien wurde keine Auskleidung der entstandenen Hohlräume mit Binde- oder Fettgewebe beobachtet (NAUJOKAT et al. 2017, SCHALLER et al. 2018, WILLBOLD et al. 2011). Dies lässt eine gute Verträglichkeit sowohl der unbeschichteten als auch der beschichteten Implantate vermuten und könnte möglicherweise auf die antiinflammatorische Wirkung der durch die Korrosion freigesetzten Magnesiumionen zurückzuführen sein (SUN et al. 2020).

Das Ergebnis der Untersuchung des Flächenanteils (BA/TA 0,5) an mineralisiertem Knochen bis 0,5 mm um das ursprüngliche Implantat zeigt die gleichen Tendenzen wie der kleinere Auswertungsbereich der Micro-CT-Untersuchung, wenn auch ohne signifikante Ausprägung. Der größte Unterschied besteht auch mit dieser Untersuchungsmethode erst nach 18 Monaten Implantationszeit und zeigt einen größeren Flächenanteil mineralisierten Knochens um das beschichtete Implantat. Auch in der Untersuchung bis 1,5 mm um die ursprüngliche Implantatgrenze zeigt sich erst nach 18 Monaten ein Unterschied und ein höherer Flächenanteil mineralisierten Knochens um das beschichtete Implantat.

Analog der Micro-CT-Untersuchung der Degradation wurde anhand des gemittelten Wertes für die Dichte des Knochens innerhalb der VOIs der Volumenanteil des mineralisierten Knochens errechnet. Durch die Bildung eines Durchschnittswerts für die Vergleichbarkeit der Ergebnisse kann es zu leichten Ungenauigkeiten während der Erfassung des Gewebes kommen, sodass die ermittelten Werte etwas höher liegen können als in der histomorphometrischen Untersuchung. Dafür ist aber eine dreidimensionale Auswertung möglich. Bei der Histomorphometrie können die Gewebe zwar exakter voneinander unterschieden werden, dafür ist aber nur eine zweidimensionale Auswertung des die Implantate im Querschnitt umgebenden Gewebes möglich. Beide Untersuchungsmethoden haben sich in vergangenen Studien als geeignet erwiesen, um die Fragestellung zu beantworten (WONG et al. 2010, KRAUS et al. 2012, CASTELLANI et al. 2011, SCHALLER et al. 2016a, DIEKMANN et al. 2016, ZHANG et al. 2009, WITTE et al. 2005, SCHALLER et al. 2017, FISCHER 2021). Die Kombination beider Untersuchungsmethoden bietet den Vorteil, die geringen Ungenauigkeiten in der Erfassung der Gewebe im Micro-CT durch die histologische Untersuchung zu bestätigen und gleichzeitig mit der 3D-Auswertung des Micro-CTs mögliche methodische Ungenauigkeiten der histomorphometrischen Untersuchung auszugleichen.

Der statistisch berechnete Durchschnittswert des Knochenvolumens liegt sowohl für die unbeschichteten als auch für die beschichteten Implantate ab dem ersten Entnahmezeitpunkt unter den Mittelwerten aus 6 analysierten Nativproben. Da allerdings keine Leerprobe, im Sinne einer Vorbohrung ohne Implantat oder ein Titanimplantat als

Referenz gesetzt wurde, könnte dieser Effekt neben der Gasfreisetzung während der Degradation auch auf das chirurgische Verfahren zurückzuführen sein. Der Knochenanteil ist bei beiden Implantaten in beiden Untersuchungen nach 6 und 12 Monaten Implantationszeit sehr ähnlich, das Knochenvolumen der beschichteten Schrauben nähert sich nach 18 Monaten in beiden Auswertungsbereichen den beiden Mittelwerten der Nativproben wieder an. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, dass durch die langsamere Degradation der PEO-beschichteten Implantate die Knochenregeneration bis zum Entnahmezeitpunkt nach 18 Monaten fortschreitet und die entstandenen Hohlräume vermindert, was zu einem höheren Anteil des Knochenvolumens im Gesamtauswertungsbereich führt und sich dem Knochenanteil des nativen Knochens annähert. Die PEO-Beschichtung der Implantate könnte somit zu weniger durch die Degradation hervorgerufenen Veränderungen des Knochens führen und vorteilhaft sein.

Bei den unbeschichteten Implantaten könnte im Zeitraum von 12 bis 18 Monaten die schnellere Degradation dazu zu führen, dass mehr Gas frei wird, als im umgebenden Gewebe gebunden und abtransportiert werden kann und es zu einer Zunahme an intraossären Hohlräumen kommt, was sich in einem niedrigeren Knochenanteil zeigt. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie können nicht eindeutig identifizieren, ob die Abnahme der Knochendichte um die unbeschichteten Schrauben zum letzten Entnahmezeitpunkt tatsächlich durch die Freisetzung von Gas bedingt ist, oder ob der beobachtete Effekt auf die geringe Probenzahl oder andere Inhomogenitäten zurückzuführen ist. Es kann somit auch nicht ausgeschlossen werden, dass es auch bei den beschichteten Implantaten im weiteren Korrosionsverlauf zu einer Abnahme des Knochenvolumens kommen könnte.

Eine weitere Erklärung für den Unterschied nach 18 Monaten Implantationszeit könnte die langsamere Freisetzung von Magnesiumionen und die damit einhergehende Bildung von Magnesiumchlorid bei den PEO-beschichteten Implantaten sein. WU et al. (2014) postulieren, dass die Resorptionsfähigkeit von Osteoklasten durch die Konzentration von Magnesiumchlorid beeinflusst werden kann. Demnach kann bis zu einer bestimmten Konzentration die Osteoklastenaktivität verstärkt und ab einer bestimmten Konzentration diese vermindern werden (WU et al. 2014). Bei den unbeschichteten ZX00-Implantaten könnte es über den Zeitraum bis 12 Monate durch die schnellere Degradation und die dadurch erhöhte Freisetzung von Magnesiumionen zu einer vermehrten Bildung von Magnesiumchlorid kommen. Nach einer allmählichen Akkumulation könnte die Konzentration dennoch unterhalb der Schwelle für die Verminderung der Aktivität liegt und es so zu einer Stimulation der Osteoklasten kommen. Dadurch könnte es zur vermehrten Entstehung von Hohlräumen um die unbeschichteten Implantate kommen und dies in einem geringeren Knochenvolumenanteil resultieren. Im Gegensatz dazu könnte bei beschichteten Implantaten die noch langsamere Degradation dazu führen, dass die Osteoklastenfunktion durch eine

niedrigere Magnesiumchloridkonzentration nicht verstärkt wird. Ferner könnte der von JANNING et al. (2010) postulierte osteostimulative Effekt von Magnesiumhydroxid bei den beschichteten Implantaten zum Anstieg des Knochenvolumens führen.

Bisherige Studien beschäftigten sich oftmals mit der Degradation von Osteosynthesematerialien in den ersten 6 Monaten nach der Implantation. Bei der Untersuchung der Magnesiumlegierung WE43 wurde die positive Auswirkung der PEO-Beschichtung ebenfalls in einem höheren Knochenvolumen nach 12 und 24 Wochen bei den beschichteten Implantaten beschrieben (SCHALLER et al. 2016a). Es wurde in diesen Studien auch eine vermehrte Bildung von intraossären Hohlräumen um die unbeschichteten Implantate beobachtet (SCHALLER et al. 2016b, SCHALLER et al. 2017). Dementgegen wurde in der Studie von RENDENBACH et al. (2021) kein Unterschied des Knochenvolumens nach 6 und 12 Monaten um WE43 Implantate mit und ohne PEO-Oberflächenbeschichtung im Bereich der Kortikalis beobachtet. Jedoch wurde signifikant mehr Knochenvolumen um die WE43 Implantate ohne Oberflächenmodifikation im Markraum beschrieben (RENDENBACH et al. 2021). Als Grund hierfür wurde das osteostimulative Potenzial durch Magnesium vermutet (RENDENBACH et al. 2021). Bei der Untersuchung der schnell degradierenden Legierung ZX50 wurde beschrieben, dass die MAO-Beschichtung erfolgreich die initiale Korrosion verzögerte, was zur Anlagerung neuen Knochens an der Oberfläche der Implantate führte (FISCHERAUER et al. 2013). Durch lokale Korrosionsangriffe an den Rissen und Poren der Beschichtung kam es FISCHERAUER et al. (2013) zufolge nach dem anfänglichen Schutz allerdings zu einer beschleunigten Degradation, welche den angelagerten Knochen abplatzen ließ und ein lockeres Bindegewebe zurückblieb. Die Knochenheilung wurde dennoch dadurch nicht beeinträchtigt (FISCHERAUER et al. 2013). Bisherige Untersuchungen der Legierung ZX00 in einer ähnlichen Mengenzusammensetzung zeigten, dass die Bildung von Gas, welches sich im umliegenden Gewebe sammelte, vor allem innerhalb der ersten 12 Wochen stattfand. In den Studien fand allerdings keine genauere Analyse des am Implantat anliegenden Knochens statt (GRÜN et al. 2018b, CLEMENT 2019). In der Studie von HOLWEG et al. (2020a) wurden bei der Verwendung von ZX00-Schrauben im Großtiermodell ebenfalls innerhalb der ersten 12 Wochen nach Implantation röntgendurchlässige Bereiche um die Implantate beobachtet, welche als durch das frei werdende Gas entstandene Hohlräume interpretiert wurden, aber die Frakturkonsolidierung nicht beeinträchtigten.

Die erste klinische Studie am Menschen zu dieser Legierung wurde 2020 veröffentlicht und zeigte vielversprechende klinische Ergebnisse bei der Heilung von Malleolusfrakturen (HOLWEG et al. 2020b). In der Studie mit 20 Patienten zeigten sich bis zur 6. Woche zunehmende röntgendurchlässige Zonen um die Schraube, die bis zur 12. Woche konstant

blieben und zur 24. Woche wieder abnahmen. Bei einer Patientin mit festgestellter Osteoporose wurde eine vermehrte Gasbildung beobachtet, was auf metabolische und immunologische Veränderungen aufgrund der Erkrankung zurückgeführt wird. Die Knochenheilung war bei dieser Patientin dennoch nach 6 Wochen abgeschlossen und nach 52 Wochen zeigte sich eine deutliche Zunahme der Dichte im röntgenstrahlendurchlässigen Bereich innerhalb der sklerotischen Linie. Dies wird als neu gebildete endostale Knochenmasse aufgrund des osteoinduktiven Effekts der Magnesiumschrauben gedeutet (HOLWEG et al. 2020b).

Speziell auch für diesen Fall könnte die PEO-Beschichtung einen wertvollen Vorteil im Therapieverlauf bieten, um der festgestellten vermehrten Gasbildung und der Veränderung im Knochen vorzubeugen und eine stabile Frakturkonsolidierung zu gewährleisten.

Ausgehend von den Ergebnissen der vorliegenden Studie kann vermutet werden, dass die PEO-Beschichtung zu einer verbesserten Knochenreaktion um die ZX00-Implantate führt. Da es keine vergleichbaren Studien zwischen unbeschichteten und PEO-modifizierten ZX00-Implantaten über den Zeitraum von 18 Monaten gibt, kann allerdings nicht endgültig geklärt werden, wieso der Unterschied des Knochenvolumens erst nach dieser Zeitspanne auftritt und ob es bei den beschichteten Schrauben nach einem noch längeren Versuchszeitraum auch zu dem nachteiligen Effekt kommen würde.

Zusammenfassend bildet diese Studie eine wertvolle Grundlage, an welche sich noch weitere Forschung anschließen sollte. Besonders im Hinblick auf den vorteiligen Effekt der verzögerten Gasfreisetzung sollten speziell während der ersten 6 Monate der umgebende Knochen genauer untersucht, Leerproben in der Versuchsplanung berücksichtigt und die Knochenreaktion über einen längeren Versuchszeitraum beobachtet werden.

5.4 Schlussfolgerung und Ausblick

Die erstmalig im Großtierversuch eingesetzten PEO-beschichteten ZX00-Implantate erweisen sich über den Versuchszeitraum von 18 Monaten als vorteilhaft gegenüber den unbeschichteten Schrauben.

Die PEO-modifizierten Implantate wurden über den gesamten Versuchszeitraum, wenn auch erst nach 12 und 18 Monaten signifikant, langsamer resorbiert als die nichtmodifizierten Implantate. Die langsamere Degradation der PEO-modifizierten Schrauben scheint am anliegenden Knochen zu weniger Hohlräumen zu führen als bei den unbeschichteten Implantaten. Ein signifikanter Unterschied zeigte sich hierbei allerdings erst nach 18 Monaten Implantationszeit in der radiologischen dreidimensionalen Untersuchung. Die Frakturheilung sollte zu diesem Zeitpunkt abgeschlossen sein. Trotzdem ist es von immenser Wichtigkeit, dass auch die komplette Degradation der Implantate ohne nachteilige Effekte für den implantatnahen Knochen verläuft. Weshalb sich der Unterschied erst zum

letzten Entnahmezeitpunkt verdeutlicht, lässt sich aufgrund der erhobenen Ergebnisse nicht vollständig erklären. Die Knochenheilung sollte spätestens innerhalb der ersten 6 Monate nach offener Reposition und interner Fixation abgeschlossen sein (GRIFKA 2011). Nach der Frakturheilung ist ein schnellerer Schrauben- und Plattenabbau wünschenswert, damit die vollständige knöchernen Integrität und natürliche Knochensteifigkeit erhalten bleibt, ohne dass Fremdmaterial *in situ* verbleibt (CLAES 1992, WITTE et al. 2011, RENDENBACH et al. 2021). Da in der vorliegenden Studie die ZX00-Schrauben nicht in einem Frakturmodell untersucht wurden, kann bezüglich der Knochenheilung keine Aussage getroffen werden. Allerdings erscheint es im Hinblick auf eine Frakturheilung fraglich, ob die PEO-Beschichtung bei langsam resorbierenden ZX00-Schrauben notwendig ist, da das Implantationsmaterial weit über den notwendigen Zeitraum hinaus bis zur vollständigen Degradation benötigen würde.

Da die ZX00-Legierung allerdings im Gegensatz zu anderen Legierungen keine Seltenen Erden enthält, kann sich das vielversprechende Ergebnis der PEO-beschichteten ZX00-Schrauben in dieser Studie als wichtiger Beitrag für die zukünftige Forschung erweisen. Damit ein routinemäßiger Einsatz bald ermöglicht werden kann, sollte diese Legierung im Frakturmodell untersucht und Untersuchungen des dem Implantat anliegenden Knochens innerhalb der ersten 6 Monate erfolgen, um weitere Erkenntnisse über den Schutz vor Degradation durch die PEO-Beschichtung sowie über die Auswirkungen auf den Knochen-Implantat-Kontakt während der Frakturheilung zu gewinnen. Für zukünftige Studien wäre zusätzlich zu empfehlen, die Osteosynthesysteme als Einheit aus Schrauben und Platten auch für Degradationsversuche und Verträglichkeitstests zu implantieren, um die Dislokation der Schrauben zu vermeiden und die Ergebnisse direkt für das gesamte System zu erhalten. Abschließend kann herausgestellt werden, dass die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit einen weiteren wichtigen Beitrag zur Erschließung des komplexen Themas der Erforschung neuartiger Osteosynthesematerialien auf Magnesiumbasis mit PEO-Oberflächenmodifikation leistet und sich weitere Forschungsarbeiten daran anschließen können.

6 Zusammenfassung

Radiologischer und histomorphometrischer Vergleich von Degradationsverhalten und Osseointegration PEO-oberflächenmodifizierter und nichtoberflächenmodifizierter ZX00-basierter Magnesiumimplantate:

eine *in vivo* Untersuchung nach 6,12 und 18 Monaten im Minipig

Die chirurgische Frakturversorgung mit resorbierbaren Osteosynthesematerialien auf Magnesiumbasis hat sich in der Vergangenheit für manche Indikationen als vorteilhaft gegenüber nichtresorbierbarem Osteosynthesematerial wie Titan oder resorbierbaren Osteosynthesematerialien auf Polymerbasis erwiesen. Die Limitation für den routinemäßigen Einsatz ist das bei der Degradation frei werdende Wasserstoffgas, was in vorangegangenen Studien zu subkutanen und intraossären Gasansammlungen um das Implantat führte. Um einen stabilen Knochen-Implantat-Kontakt während der Frakturheilung zu gewährleisten und im späteren Verlauf der Degradation keine nachteiligen Effekte im Knochen um das Implantat zu erhalten, wurde mittels Legierung und Beschichtung von magnesiumbasierten Implantaten versucht, die Degradation zu verlangsamen. Ziel der Dissertation war es somit, erstmals im Großtierversuch das Degradationsverhalten sowie die Reaktion des umgebenden Knochens auf ZX00-Implantate mit und ohne PEO-Oberflächenmodifikation nach 6, 12 und 18 Monaten Implantationszeit zu untersuchen und gegenüberzustellen. Dafür wurden die Implantate in das *Os frontale* von Minipigs eingebracht und nach der jeweiligen Standzeit nach Explantation der Implantate mit umliegenden Knochen radiologisch und histomorphometrisch analysiert. Das Residualvolumen konnte in der Micro-CT-Untersuchung aufgrund der Dichte des Materials berechnet werden (SV/TV). In der histomorphometrischen Untersuchung wurde ebenfalls der noch nicht resorbierte Anteil an Implantationsmaterial mittels der Fläche des Implantatquerschnitts (SA/TA) berechnet. Die Ergebnisse beider Untersuchungsmethoden zeigen, dass das Residualvolumen der PEO-oberflächenbeschichteten Implantate zu jedem Zeitpunkt höher ist und somit die Beschichtung erfolgreich die Degradation verlangsamt. Signifikante Unterschiede zeigten sich in der radiologischen Auswertung nach 12 und 18 Monaten Implantationszeit ($p < 0,001$), in der histomorphometrischen Untersuchung nach 12 Monaten ($p < 0,001$). Im Vergleich des Residualvolumens (SV/TV) zeigte sich nach 18 Monaten ein signifikant ($p < 0,001$) niedrigerer Wert als nach 6 Monaten bei den unbeschichteten Implantaten. Bei den beschichteten Implantaten war durch die verlangsamte Degradation der Unterschied nicht signifikant ($p = 0,25$).

Durch die verlangsamte Degradation der PEO-Oberflächenbeschichtung und der daraus resultierenden langsameren Freisetzung von Gas sollte die Bildung von Hohlräumen im

Knochen reduziert und somit die Osseointegration verbessert werden. Radiologisch und histomorphometrisch wurden jeweils zwei Bereiche von der ursprünglichen Implantatgrenze bis 0,5 mm und bis 1,5 mm auf den Anteil an mineralisiertem Knochen innerhalb der Auswertungsbereiche (BV/TV in der radiologischen, BA/TA in der histomorphometrischen Untersuchung) untersucht. Die radiologischen Ergebnisse zeigen einen signifikant höheren BV/TV ($p < 0,001$) in beiden Bereichen nach 18 Monaten Implantationszeit bei den PEO-beschichteten Implantaten. Histomorphometrisch ergaben sich die gleichen Tendenzen.

Im Vergleich des Volumenanteils an mineralisiertem Knochen (BV/TV) um die Implantate nach 6 und 18 Monaten Implantationszeit zeigten sich in beiden Untersuchungsbereichen die gleichen Tendenzen. Zwischen ursprünglicher Implantatgrenze und 0,5 mm Umgebung zeigt sich ein signifikant höherer mineralisierter Knochenanteil ($p = 0,035$) nach 18 Monaten beim beschichteten Implantat. Der BV/TV-Anteil nimmt hingegen bei den unbeschichteten Implantaten im Untersuchungsbereich bis 1,5 mm zur ursprünglichen Implantatgrenze im gleichen Untersuchungszeitraum signifikant ab ($p = 0,034$). Weshalb der Unterschied des Knochenvolumens erst zum letzten Untersuchungszeitpunkt auftritt, bleibt unklar. Ausgehend von den Ergebnissen dieser Studie wird vermutet, dass die PEO-Oberflächenbeschichtung im Untersuchungszeitraum bis 18 Monate *post implantationem* die Osseointegration durch verminderte Bildung von Hohlräumen verbessern kann.

7 Summary

Radiological and histomorphometric comparison of degradation behavior and osseointegration of PEO-surface-modified and non-surface-modified ZX00-based magnesium implants:

An in vivo study after 6,12 and 18 months in the Minipig

In the past the surgical treatment of fractures with resorbable magnesium-based osteosynthesis materials has been shown to be advantageous over non-resorbable osteosynthesis materials such as titanium or resorbable polymer-based osteosynthesis materials for some indications. The limitation for routine use is the hydrogen gas released during degradation, which led to subcutaneous and intraosseous gas accumulation around the implant in previous studies. To ensure stable bone-implant contact during fracture healing and to avoid adverse effects in the bone around the implant during the degradation process, alloying and coating of magnesium-based implants was used to try to slow down degradation. The aim of this doctoral thesis was thus to investigate the degradation behavior as well as the reaction of the surrounding bone to ZX00 implants with and without PEO surface modification in a large animal experiment after 6, 12 and 18 months of implantation. For this purpose, the implants were placed in the frontal bone of minipigs and analyzed radiologically and histomorphometrically after the respective standing time. The implants were explanted with the surrounding bone. The residual volume was calculated in the micro-CT examination based on the density of the material (SV/TV). In the histomorphometric examination, the proportion of the remaining implant material was calculated using the area of the implant's cross-section (SA/TA). The results of the radiological and the histomorphometric evaluation show a higher residual volume of PEO surface-coated implants at all time points and prove the successful delay of magnesium corrosion. Significant differences were seen in the radiological evaluation after 12 and 18 months of implantation ($p < 0.001$), and in the histomorphometric examination after 12 months ($p < 0.001$). Comparison of residual volume (SV/TV) showed a significant ($p < 0.001$) lower value after 18 months than after 6 months for the uncoated implants. For the coated implants, due to the slowed degradation, the difference was not significant ($p = 0.25$).

The slowed degradation of the PEO surface coating and the resulting slower release of gas should reduce the formation of gas-associated lacunae and improves osseointegration. Radiologically and histomorphometrically, two areas each from the original implant margin up to 0.5 mm and up to 1.5 mm were examined for the proportion of mineralized bone within the evaluation areas (BV/TV in the radiological, BA/TA in the histomorphometric examination). The radiological results showed a significantly higher BV/TV ($p < 0.001$) in both areas after

18 months of implantation time in the PEO-coated implants. Histomorphometrically, the same trends emerged.

Comparison of the volume fraction of mineralized bone (BV/TV) around the implants after 6 and 18 months showed the same trends in both study areas. Between the original implant border and the 0.5 mm surrounding area, there is a significantly higher mineralized bone proportion ($p = 0.035$) after 18 months for the coated implant. In contrast, the BV/TV proportion decreases significantly in the uncoated implants in the study area up to 1.5 mm from the original implant boundary during the same study period ($p = 0.034$). Why the difference in bone volume density occurs only at the last examination time remains unclear. Based on the results of this study, it is suggested that the PEO surface coating may improve osseointegration by reducing the formation of gas-associated lacunae in the study period up to 18 months post-implantation.

8 Literaturverzeichnis

Aceró J, Calderón J, Salmerón JI, Verdaguer JJ, Concejo C, Somacarrera ML. The behaviour of titanium as a biomaterial: microscopy study of plates and surrounding tissues in facial osteosynthesis. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery* 1999; 27(2):117–23. doi: 10.1016/S1010-5182(99)80025-0.

Agarwal S, Curtin J, Duffy B, Jaiswal S. Biodegradable magnesium alloys for orthopaedic applications: A review on corrosion, biocompatibility and surface modifications. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 2016; 68:948–63. doi: 10.1016/j.msec.2016.06.020.

Ahmad N, Lyles J, Panchal J, Deschamps-Braly J. Outcomes and complications based on experience with resorbable plates in pediatric craniosynostosis patients. *J Craniofac Surg* 2008; 19(3):855–60. doi: 10.1097/SCS.0b013e31816ae358.

Albrektsson T, Johansson C. Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. *Eur Spine J* 2001; 10 Suppl 2:S96-101. doi: 10.1007/s005860100282.

Alpert B, Gutwald R, Schmelzeisen R. New innovations in craniomaxillofacial fixation: the 2.0 lock system. *Keio J Med* 2003; 52(2):120–7. doi: 10.2302/kjm.52.120.

Alpert B, Seligson D. Removal of asymptomatic bone plates used for orthognathic surgery and facial fractures. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 1996; 54(5):618–21. doi: 10.1016/s0278-2391(96)90645-x.

Amerstorfer F, Fischerauer SF, Fischer L, Eichler J, Draxler J, Zitek A et al. Long-term in vivo degradation behavior and near-implant distribution of resorbed elements for magnesium alloys WZ21 and ZX50. *Acta Biomater* 2016; 42:440–50. doi: 10.1016/j.actbio.2016.06.025.

Arnett TR. Extracellular pH regulates bone cell function. *J Nutr* 2008; 138(2):415S-418S. doi: 10.1093/jn/138.2.415S.

Arviana N, Sjamsudin E, Yuza AT. Distribution of maxillofacial fracture treatment using a titanium plate. *Padjadjaran J Dent* 2018; 27(2). doi: 10.24198/pjd.vol27no2.26654.

Asagiri M, Takayanagi H. The molecular understanding of osteoclast differentiation. *Bone* 2007; 40(2):251–64. doi: 10.1016/j.bone.2006.09.023.

Ashammakhi N, Rokkanen P. Absorbable polyglycolide devices in trauma and bone surgery. *Biomaterials* 1997; 18(1):3–9. doi: 10.1016/s0142-9612(96)00107-x.

Bamberger M, Dehm G. Trends in the Development of New Mg Alloys. *Annu. Rev. Mater. Res.* 2008; 38(1):505–33. doi: 10.1146/annurev.matsci.020408.133717.

Banerjee PC, Al-Saadi S, Choudhary L, Harandi SE, Singh R. Magnesium Implants: Prospects and Challenges. *Materials (Basel)* 2019; 12(1). doi: 10.3390/ma12010136.

- Bergsma J. Late degradation tissue response to poly(L-lactide) bone plates and screws. *Biomaterials* 1995; 16(1):25–31. doi: 10.1016/0142-9612(95)91092-d.
- Bi Y, van de Motter RR, Ragab AA, Goldberg VM, Anderson JM, Greenfield EM. Titanium particles stimulate bone resorption by inducing differentiation of murine osteoclasts. *The Journal of bone and joint surgery. American volume* 2001; 83(4):501–8. doi: 10.2106/00004623-200104000-00004.
- Biber R, Pauser J, Geßlein M, Bail HJ. Magnesium-Based Absorbable Metal Screws for Intra-Articular Fracture Fixation. *Case Rep Orthop* 2016; 2016:9673174. doi: 10.1155/2016/9673174.
- Bohlen J, Meyer S, Wiese B, Luthringer-Feyerabend BJC, Willumeit-Römer R, Letzig D. Alloying and Processing Effects on the Microstructure, Mechanical Properties, and Degradation Behavior of Extruded Magnesium Alloys Containing Calcium, Cerium, or Silver. *Materials (Basel)* 2020; 13(2). doi: 10.3390/ma13020391.
- Bollen P, Ellegaard L. The Göttingen minipig in pharmacology and toxicology. *Pharmacol Toxicol* 1997; 80 Suppl 2:3–4. doi: 10.1111/j.1600-0773.1997.tb01980.x.
- Bommas-Ebert U, Teubner P, Voß R. *Kurzlehrbuch Anatomie und Embryologie. 2., aktualisierte und erweiterte Auflage.* Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag; 2006.
- Böstman O, Pihlajamäki H. Clinical biocompatibility of biodegradable orthopaedic implants for internal fixation: a review. *Biomaterials* 2000a; 21(24):2615–21. doi: 10.1016/S0142-9612(00)00129-0.
- Böstman OM, Pihlajamäki HK. Adverse Tissue Reactions to Bioabsorbable Fixation Devices. *Clinical Orthopaedics and Related Research (1976-2007)* 2000b; 371.
- Brunner FX. Aktuelle Gesichtspunkte zur Osteosynthese des Mittelgesichts. *HNO* 2006; 54(12):918–21. doi: 10.1007/s00106-006-1499-z.
- Buckley RE, Moran CG, Apivatthakakul T, Hrsg. *AO Principles of Fracture Management: Vol. 1: Principles, Vol. 2: Specific Fractures.* 3rd ed. NEW YORK: Thieme Medical Publishers Incorporated; 2017.
- Buijs GJ, van der Houwen EB, Stegenga B, Bos RRM, Verkerke GJ. Mechanical Strength and Stiffness of Biodegradable and Titanium Osteofixation Systems. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 2007; 65(11):2148–58. doi: 10.1016/j.joms.2007.04.010.
- Case CP, Langkamer VG, James C, Palmer MR, Kemp AJ, Heap PF et al. Widespread dissemination of metal debris from implants. *J Bone Joint Surg Br* 1994; 76(5):701–12.
- Castellani C, Lindtner RA, Hausbrandt P, Tschegg E, Stanzi-Tschegg SE, Zanoni G et al. Bone-implant interface strength and osseointegration: Biodegradable magnesium alloy

- versus standard titanium control. *Acta Biomater* 2011; 7(1):432–40. doi: 10.1016/j.actbio.2010.08.020.
- Chang Y-L, Stanford CM, Keller JC. Calcium and phosphate supplementation promotes bone cell mineralization: Implications for hydroxyapatite (HA)-enhanced bone formation. *J Biomed Mater Res*. 2000; 52(2):270–8. doi: 10.1002/1097-4636(200011)52:2<270::aid-jbm5>3.0.co;2-1.
- Chaya A, Yoshizawa S, Verdelis K, Myers N, Costello BJ, Chou D-T et al. In vivo study of magnesium plate and screw degradation and bone fracture healing. *Acta Biomater* 2015a; 18:262–9. doi: 10.1016/j.actbio.2015.02.010.
- Chaya A, Yoshizawa S, Verdelis K, Noorani S, Costello BJ, Sfeir C. Fracture healing using degradable magnesium fixation plates and screws. *J Oral Maxillofac Surg* 2015b; 73(2):295–305. doi: 10.1016/j.joms.2014.09.007.
- Chen J, Tan L, Yu X, Etim IP, Ibrahim M, Yang K. Mechanical properties of magnesium alloys for medical application: A review. *J Mech Behav Biomed Mater* 2018; 87:68–79. doi: 10.1016/j.jmbbm.2018.07.022.
- Chen Y, Xu Z, Smith C, Sankar J. Recent advances on the development of magnesium alloys for biodegradable implants. *Acta Biomater* 2014; 10(11):4561–73. doi: 10.1016/j.actbio.2014.07.005.
- Chou D-T, Hong D, Saha P, Ferrero J, Lee B, Tan Z et al. In vitro and in vivo corrosion, cytocompatibility and mechanical properties of biodegradable Mg-Y-Ca-Zr alloys as implant materials. *Acta Biomater* 2013; 9(10):8518–33. doi: 10.1016/j.actbio.2013.06.025.
- Cihova M, Martinelli E, Schmutz P, Myrissa A, Schäublin R, Weinberg AM et al. The role of zinc in the biocorrosion behavior of resorbable Mg-Zn-Ca alloys. *Acta Biomater* 2019; 100:398–414. doi: 10.1016/j.actbio.2019.09.021.
- Claes L, Wolf S, Augat P. Mechanische Einflüsse auf die Callusheilung. *Chirurg* 2000; 71(9):989–94. doi: 10.1007/s001040051172.
- Claes LE. Mechanical characterization of biodegradable implants. *Clinical Materials* 1992; 10(1-2):41–6. doi: 10.1016/0267-6605(92)90083-6.
- Clement BT. Frakturstabilisierung mittels resorbierbaren Magnesium-basierten Schrauben im wachsenden Großtiermodell Frakturstabilisierung mittels resorbierbaren Magnesium-basierten Schrauben im wachsenden Großtiermodell [Diplomarbeit]. Graz: Medizinische Universität Graz; 2019.
- Connolly JF. Common avoidable problems in nonunions. *Clin Orthop Relat Res* 1985; (194):226–35.

- Cox S, Mukherjee DP, Ogden AL, Mayuex RH, Sadasivan KK, Albright JA et al. Distal tibiofibular syndesmosis fixation: a cadaveric, simulated fracture stabilization study comparing bioabsorbable and metallic single screw fixation. *J Foot Ankle Surg* 2005; 44(2):144–51. doi: 10.1053/j.jfas.2005.01.010.
- Darband GB, Aliofkhazraei M, Hamghalam P, Valizade N. Plasma electrolytic oxidation of magnesium and its alloys: Mechanism, properties and applications. *Journal of Magnesium and Alloys* 2017; 5(1):74–132. doi: 10.1016/j.jma.2017.02.004.
- Dardenne M. Zinc and immune function. *Eur J Clin Nutr* 2002; 56 Suppl 3:S20-3. doi: 10.1038/sj.ejcn.1601479.
- Diekmann J, Bauer S, Weizbauer A, Willbold E, Windhagen H, Helmecke P et al. Examination of a biodegradable magnesium screw for the reconstruction of the anterior cruciate ligament: A pilot in vivo study in rabbits. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 2016; 59:1100–9. doi: 10.1016/j.msec.2015.11.037.
- Ding Y, Wen C, Hodgson P, Li Y. Effects of alloying elements on the corrosion behavior and biocompatibility of biodegradable magnesium alloys: a review. *J Mater Chem B* 2014; 2(14):1912–33. doi: 10.1039/c3tb21746a.
- Dorozhkin SV. Calcium orthophosphate-based biocomposites and hybrid biomaterials. *J Mater Sci* 2009; 44(9):2343–87. doi: 10.1007/s10853-008-3124-x.
- Elin RJ. Magnesium metabolism in health and disease. *Disease-a-Month* 1988; 34(4):166–218. doi: 10.1016/0011-5029(88)90013-2.
- Enderle A. Die desmale Knochenheilung. In: Ittel TH, Sieberth H-G, Matthiaß HH, Hrsg. *Aktuelle Aspekte der Osteologie*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 1992. p. 251–8.
- Erinc M, Sillekens WH, Mannens RGTM, Werkhoven RJ. Applicability of existing magnesium alloys as biomedical implant materials. *Magnesium Technology* 2009:209–14.
- Esmaily M, Svensson JE, Fajardo S, Birbilis N, Frankel GS, Virtanen S et al. Fundamentals and advances in magnesium alloy corrosion. *Progress in Materials Science* 2017; 89:92–193. doi: 10.1016/j.pmatsci.2017.04.011.
- Ezechieli M, Diekmann J, Weizbauer A, Becher C, Willbold E, Helmecke P et al. Biodegradation of a magnesium alloy implant in the intercondylar femoral notch showed an appropriate response to the synovial membrane in a rabbit model in vivo. *J Biomater Appl* 2014; 29(2):291–302. doi: 10.1177/0885328214523322.
- Ezechieli M, Ettinger M, König C, Weizbauer A, Helmecke P, Schavan R et al. Biomechanical characteristics of bioabsorbable magnesium-based (MgYREZr-alloy)

- interference screws with different threads. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 2016; 24(12):3976–81. doi: 10.1007/s00167-014-3325-6.
- Farraro KF, Kim KE, Woo SL-Y, Flowers JR, McCullough MB. Revolutionizing orthopaedic biomaterials: The potential of biodegradable and bioresorbable magnesium-based materials for functional tissue engineering. *J Biomech* 2014; 47(9):1979–86. doi: 10.1016/j.jbiomech.2013.12.003.
- Fawcett WJ, Haxby EJ, Male DA. Magnesium: physiology and pharmacology. *Br J Anaesth* 1999; 83(2):302–20. doi: 10.1093/bja/83.2.302.
- Fischer H. 6- und 12-Monats-Ergebnisse des Vergleichs zwischen PEO-oberflächenmodifizierten und WE43-basierten Magnesiumimplantaten ohne Oberflächenmodifikation im Schweinmodell. Berlin: Charité - Universitätsmedizin Berlin; 2021.
- Fischerauer SF, Kraus T, Wu X, Tangl S, Sorantin E, Hänzi AC et al. In vivo degradation performance of micro-arc-oxidized magnesium implants: a micro-CT study in rats. *Acta Biomater* 2013; 9(2):5411–20. doi: 10.1016/j.actbio.2012.09.017.
- Francel TJ, Birely BC, Ringelman PR, Manson PN. The fate of plates and screws after facial fracture reconstruction. *Plast Reconstr Surg* 1992; 90(4):568–73. doi: 10.1097/00006534-199210000-00004.
- Friskén KW, Dandie GW, Lugowski S, Jordan G. A study of titanium release into body organs following the insertion of single threaded screw implants into the mandibles of sheep. *Aust Dent J* 2002; 47(3):214–7. doi: 10.1111/j.1834-7819.2002.tb00331.x.
- Ghali E, Dietzel W, Kainer K-U. General and Localized Corrosion of Magnesium Alloys: A Critical Review. *Journal of Materials Engineering and Performance* 2004; 13(1):7–23. doi: 10.1361/10599490417533.
- Gilardino MS, Chen E, Bartlett SP. Choice of internal rigid fixation materials in the treatment of facial fractures. *Craniofacial Trauma Reconstr* 2009; 2(1):49–60. doi: 10.1055/s-0029-1202591.
- González-García A, González-García J, Diniz-Freitas M, García-García A, Bullón P. Accidental displacement and migration of endosseous implants into adjacent craniofacial structures: a review and update. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2012; 17(5):e769-74. doi: 10.4317/medoral.18032.
- Gray JE, Luan B. Protective coatings on magnesium and its alloys — a critical review. *Journal of Alloys and Compounds* 2002; 336(1-2):88–113. doi: 10.1016/S0925-8388(01)01899-0.

- Grifka J. Orthopädie und Unfallchirurgie. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin / Heidelberg; 2011.
- Grimm MJ. Selection of Materials for Biomedical Applications. In: Kutz M, Hrsg. Handbook of materials selection. New York: Wiley; 2002. p. 1165–94.
- Grosser O. Vorlesungen über Topographische Anatomie: O. Grosser, Vorlesungen über Topographische Anatomie © Springer-Verlag Wien 1950 1950:1–2. doi: 10.1007/978-3-662-24734-1.
- Grün NG, Donohue N, Holweg P, Weinberg A-M. Resorbierbare Implantate in der Unfallchirurgie. J. Miner. Stoffwechs. Muskuloskelet. Erkrank. 2018a; 25(3):82–9. doi: 10.1007/s41970-018-0041-6.
- Grün NG, Holweg P, Tangl S, Eichler J, Berger L, van den Beucken JJJP et al. Comparison of a resorbable magnesium implant in small and large growing-animal models. Acta Biomater 2018b; 78:378–86. doi: 10.1016/j.actbio.2018.07.044.
- Grzesiak JJ, Pierschbacher MD. Shifts in the concentrations of magnesium and calcium in early porcine and rat wound fluids activate the cell migratory response. J Clin Invest 1995; 95(1):227–33. doi: 10.1172/JCI117644.
- Gu XN, Li N, Zhou WR, Zheng YF, Zhao X, Cai QZ et al. Corrosion resistance and surface biocompatibility of a microarc oxidation coating on a Mg-Ca alloy. Acta Biomater 2011; 7(4):1880–9. doi: 10.1016/j.actbio.2010.11.034.
- Gu X-N, Li S-S, Li X-M, Fan Y-B. Magnesium based degradable biomaterials: A review. Front. Mater. Sci. 2014; 8(3):200–18. doi: 10.1007/s11706-014-0253-9.
- Gu X-N, Zheng Y-F. A review on magnesium alloys as biodegradable materials. Front. Mater. Sci. China 2010; 4(2):111–5. doi: 10.1007/s11706-010-0024-1.
- Gutierrez K, Dicks N, Glanzner WG, Agellon LB, Bordignon V. Efficacy of the porcine species in biomedical research. Front Genet 2015; 6:293. doi: 10.3389/fgene.2015.00293.
- Gutwald R, Alpert B, Schmelzeisen R. Principle and stability of locking plates. Keio J Med 2003; 52(1):21–4. doi: 10.2302/kjm.52.21.
- Haase H, Rink L. Zink und Immunsystem. Ernährung & Medizin 2013; 28(04):163–6. doi: 10.1055/s-0033-1361499.
- Hankenson KD, Dishowitz M, Gray C, Schenker M. Angiogenesis in bone regeneration. Injury 2011; 42(6):556–61. doi: 10.1016/j.injury.2011.03.035.
- Hargreaves BA, Worters PW, Pauly KB, Pauly JM, Koch KM, Gold GE. Metal-induced artifacts in MRI. AJR. American journal of roentgenology 2011; 197(3):547–55. doi: 10.2214/AJR.11.7364.

- Hartwig A. Role of magnesium in genomic stability. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 2001; 475(1-2):113–21. doi: 10.1016/S0027-5107(01)00074-4.
- Hastings GW, Ducheyne P, Hrsg. *Macromolecular biomaterials*. Boca Raton, Fla.: CRC Press; 1984. (CRC series in structure-property relationship in biomaterials).
- Hayden Gephart MG, Woodard JI, Arrigo RT, Lorenz HP, Schendel SA, Edwards MSB et al. Using bioabsorbable fixation systems in the treatment of pediatric skull deformities leads to good outcomes and low morbidity. *Childs Nerv Syst* 2013; 29(2):297–301. doi: 10.1007/s00381-012-1938-y.
- Haynes DR, Boyle SJ, Rogers SD, Howie DW, Vernon-Roberts B. Variation in cytokines induced by particles from different prosthetic materials. *Clin Orthop Relat Res* 1998; (352):223–30.
- Heidemann W. *Drill-Free-Schrauben - In-vitro-Tests, In-vivo-Untersuchungen und klinische Anwendungen selbstbohrender und selbstschneidender Osteosyntheseschrauben in der Mund- Kiefer- Gesichtschirurgie* 2001. doi: 10.25673/3048.
- Hernandez Rosa J, Villanueva NL, Sanati-Mehrizy P, Factor SH, Taub PJ. Review of Maxillofacial Hardware Complications and Indications for Salvage. *Craniofacial Trauma Reconstr* 2016; 9(2):134–40. doi: 10.1055/s-0035-1570074.
- Hofstetter J. *Development of high-strength low-alloy (HSLA) magnesium alloys for biomedical application*: ETH Zurich; 2015a.
- Hofstetter J, Becker M, Martinelli E, Weinberg AM, Mingler B, Kilian H et al. High-Strength Low-Alloy (HSLA) Mg–Zn–Ca Alloys with Excellent Biodegradation Performance. *JOM* 2014; 66(4):566–72. doi: 10.1007/s11837-014-0875-5.
- Hofstetter J, Rüedi S, Baumgartner I, Kilian H, Mingler B, Povoden-Karadeniz E et al. Processing and microstructure–property relations of high-strength low-alloy (HSLA) Mg–Zn–Ca alloys. *Acta Materialia* 2015b; 98:423–32. doi: 10.1016/j.actamat.2015.07.021.
- Hohmann M. *Bewegungsapparat Hund*: DOI: 10.1055/b-003-125840 Hohmann, Mima: 2015 *Bewegungsapparat Hund Funktionelle Anatomie, Biomechanik und Pathophysiologie Print* ISBN 9783830494386 · Online ISBN 9783131980014 2015:36–7. doi: 10.1055/b-003-125840.
- Holweg P, Berger L, Cihova M, Donohue N, Clement B, Schwarze U et al. A lean magnesium-zinc-calcium alloy ZX00 used for bone fracture stabilization in a large growing-animal model. *Acta Biomater* 2020a; 113:646–59. doi: 10.1016/j.actbio.2020.06.013.
- Holweg P, Herber V, Ornig M, Hohenberger G, Donohue N, Puchwein P et al. A lean bioabsorbable magnesium-zinc-calcium alloy ZX00 used for operative treatment of medial

- malleolus fractures: early clinical results of a prospective non-randomized first in man study. *Bone Joint Res* 2020b; 9(8):477–83. doi: 10.1302/2046-3758.98.BJR-2020-0017.R2.
- Hong D, Saha P, Chou D-T, Lee B, Collins BE, Tan Z et al. In vitro degradation and cytotoxicity response of Mg-4% Zn-0.5% Zr (ZK40) alloy as a potential biodegradable material. *Acta Biomater* 2013; 9(10):8534–47. doi: 10.1016/j.actbio.2013.07.001.
- Hönig JF, Merten HA, Luhr HG. Passive and active intracranial translocation of osteosynthesis plates in adolescent minipigs. *J Craniofac Surg* 1995; 6(4):292-8; discussion 299-300. doi: 10.1097/00001665-199507000-00006.
- Hönig JF, Schütt R, Merten HA. Tierexperimentelle Untersuchungen zur Stirnhöhlenentwicklung nach kraniofazialer Austauschplastik des *Os frontale* beim Göttinger Miniaturschwein. *Mund Kiefer Gesichtschir* 1999; 3(6):325–30. doi: 10.1007/s100060050165.
- Horch H-H. Traumatologie. In: Siewert JR, Hrsg. *Chirurgie: mit integriertem Fallquiz — 40 Fälle nach neuer AO*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2006. p. 256–70.
- Hornberger H, Virtanen S, Boccaccini AR. Biomedical coatings on magnesium alloys - a review. *Acta Biomater* 2012; 8(7):2442–55. doi: 10.1016/j.actbio.2012.04.012.
- Hou R, Victoria-Hernandez J, Jiang P, Willumeit-Römer R, Luthringer-Feyerabend B, Yi S et al. In vitro evaluation of the ZX11 magnesium alloy as potential bone plate: Degradability and mechanical integrity. *Acta Biomater* 2019; 97:608–22. doi: 10.1016/j.actbio.2019.07.053.
- Huehnerschulte TA, Reifenrath J, Rechenberg B von, Dziuba D, Seitz JM, Bormann D et al. In vivo assessment of the host reactions to the biodegradation of the two novel magnesium alloys ZEK100 and AX30 in an animal model. *Biomed Eng Online* 2012; 11:14. doi: 10.1186/1475-925X-11-14.
- Hussein RO, Nie X, Northwood DO. An investigation of ceramic coating growth mechanisms in plasma electrolytic oxidation (PEO) processing. *Electrochimica Acta* 2013; 112:111–9. doi: 10.1016/j.electacta.2013.08.137.
- Ibrahim H, Esfahani SN, Poorganji B, Dean D, Elahinia M. Resorbable bone fixation alloys, forming, and post-fabrication treatments. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 2017; 70(Pt 1):870–88. doi: 10.1016/j.msec.2016.09.069.
- 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):8643–9. doi: 10.1016/j.actbio.2012.08.047.
- Ishimi Y. Nutrition and bone health. Magnesium and bone. *Clin Calcium* 2010; 20(5):762–7.
- Jafari S, Raman RKS, Davies CHJ, Hofstetter J, Uggowitzer PJ, Löffler JF. Stress corrosion cracking and corrosion fatigue characterisation of MgZn1Ca0.3 (ZX10) in a simulated

- physiological environment. *J Mech Behav Biomed Mater* 2017; 65:634–43. doi: 10.1016/j.jmbbm.2016.09.033.
- Jahnen-Dechent W, Ketteler M. Magnesium basics. *Clin Kidney J* 2012; 5(Suppl 1):i3-i14. doi: 10.1093/ndtplus/sfr163.
- Janning C, Willbold E, Vogt C, Nellesen J, Meyer-Lindenberg A, Windhagen H et al. Magnesium hydroxide temporarily enhancing osteoblast activity and decreasing the osteoclast number in peri-implant bone remodelling. *Acta Biomater* 2010; 6(5):1861–8. doi: 10.1016/j.actbio.2009.12.037.
- Jin L, Wu J, Yuan G, Chen T. In vitro study of the inflammatory cells response to biodegradable Mg-based alloy extract. *PLoS One* 2018; 13(3):e0193276. doi: 10.1371/journal.pone.0193276.
- Jo J-H, Hong J-Y, Shin K-S, Kim H-E, Koh Y-H. Enhancing biocompatibility and corrosion resistance of Mg implants via surface treatments. *J Biomater Appl* 2012; 27(4):469–76. doi: 10.1177/0885328211412633.
- Jung O, Smeets R, Hartjen P, Schnettler R, Feyerabend F, Klein M et al. 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). doi: 10.3390/ijms20020255.
- Kamrani S, Fleck C. Biodegradable magnesium alloys as temporary orthopaedic implants: a review. *Biometals* 2019; 32(2):185–93. doi: 10.1007/s10534-019-00170-y.
- 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. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery* 1996; 24(3):155–62. doi: 10.1016/s1010-5182(96)80049-7.
- Kenkre JS, Bassett J. The bone remodelling cycle. *Ann Clin Biochem* 2018; 55(3):308–27. doi: 10.1177/0004563218759371.
- Kennady MC, Tucker MR, Lester GE, Buckley MJ. Stress shielding effect of rigid internal fixation plates on mandibular bone grafts. A photon absorption densitometry and quantitative computerized tomographic evaluation: A photon absorption densitometry and quantitative computerized tomographic evaluation. *Int J Oral Maxillofac Surg* 1989; 18(5):307–10. doi: 10.1016/S0901-5027(89)80101-8.
- Kleinertz H, Ntalos D, Hennes F, Nüchtern JV, Frosch K-H, Thiesen DM. Accident mechanisms and injury patterns in e-scooter users—a retrospective analysis and comparison with cyclists. *Deutsches Arzteblatt Online* 2021. doi: 10.3238/arztebl.m2021.0019.
- Koerdt S, Sabatakakis A, Heiland M, Kreutzer K. Lösungsmöglichkeiten bei fehlgeschlagenen Osteosynthesen in der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie. *OP-JOURNAL* 2020; 36(02):153–8. doi: 10.1055/a-1024-5927.

König HE, Liebich H-G, Hrsg. Anatomie der Haussäugetiere: Lehrbuch und Farbatlas für Studium und Praxis ; Ausgabe in einem Band. 3., überarb. und erw. Aufl. Stuttgart: Schattauer; 2005.

Kopp A, Derra T, Müther M, Jauer L, Schleifenbaum JH, Voshage M et al. Influence of design and postprocessing parameters on the degradation behavior and mechanical properties of additively manufactured magnesium scaffolds. *Acta Biomater* 2019; 98:23–35. doi: 10.1016/j.actbio.2019.04.012.

Kraft R, Harteneck C. The mammalian melastatin-related transient receptor potential cation channels: an overview. *Pflugers Arch* 2005; 451(1):204–11. doi: 10.1007/s00424-005-1428-0.

Kraus T, Fischerauer SF, Hänzi AC, Uggowitzer PJ, Löffler JF, Weinberg AM. Magnesium alloys for temporary implants in osteosynthesis: in vivo studies of their degradation and interaction with bone. *Acta Biomater* 2012; 8(3):1230–8. doi: 10.1016/j.actbio.2011.11.008.

Kuroda Y, Hisatsune C, Nakamura T, Matsuo K, Mikoshiba K. Osteoblasts induce Ca²⁺ oscillation-independent NFATc1 activation during osteoclastogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105(25):8643–8. doi: 10.1073/pnas.0800642105.

Lang F. Säure-Basen-Haushalt. In: Brandes R, Lang F, Schmidt RF, Hrsg. *Physiologie des Menschen: mit Pathophysiologie*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2019. p. 457–68.

Lastra MD, Pastelin R, Camacho A, Monroy B, Aguilar AE. Zinc intervention on macrophages and lymphocytes response. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 2001; 15(1):5–10. doi: 10.1016/S0946-672X(01)80019-5.

Laureti M, Ferrigno N, Rosella D, Papi P, Mencio F, Angelis F de et al. Unusual Case of Osseointegrated Dental Implant Migration into Maxillary Sinus Removed 12 Years after Insertion. *Case Rep Dent* 2017; 2017:9634672. doi: 10.1155/2017/9634672.

Lee D-Y, Yeh C-R, Chang S-F, Lee P-L, Chien S, Cheng C-K et al. Integrin-mediated expression of bone formation-related genes in osteoblast-like cells in response to fluid shear stress: roles of extracellular matrix, Shc, and mitogen-activated protein kinase. *J Bone Miner Res* 2008; 23(7):1140–9. doi: 10.1359/jbmr.080302.

Lee J-W, Han H-S, Han K-J, Park J, Jeon H, Ok M-R et al. 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):716–21. doi: 10.1073/pnas.1518238113.

Lee M-J, Kim S, Lee S-A, Song H-T, Huh Y-M, Kim D-H et al. Overcoming artifacts from metallic orthopedic implants at high-field-strength MR imaging and multi-detector CT. *Radiographics* 2007; 27(3):791–803. doi: 10.1148/rg.273065087.

- Lembeck B, Wülker N. Severe cartilage damage by broken poly-L-lactic acid (PLLA) interference screw after ACL reconstruction. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 2005; 13(4):283–6. doi: 10.1007/s00167-004-0545-1.
- Lensing R, Behrens P, Müller PP, Lenarz T, Stieve M. In vivo testing of a bioabsorbable magnesium alloy serving as total ossicular replacement prostheses. *J Biomater Appl* 2014; 28(5):688–96. doi: 10.1177/0885328212472246.
- Leung MTC, Rabie ABM, Wong RWK. Stability of connected mini-implants and miniplates for skeletal anchorage in orthodontics. *Eur J Orthod* 2008; 30(5):483–9. doi: 10.1093/ejo/cjm124.
- Li L, Gao J, Wang Y. Evaluation of cyto-toxicity and corrosion behavior of alkali-heat-treated magnesium in simulated body fluid. *Surface and Coatings Technology* 2004; 185(1):92–8. doi: 10.1016/j.surfcoat.2004.01.004.
- Li RW, Kirkland NT, Truong J, Wang J, Smith PN, Birbilis N et al. The influence of biodegradable magnesium alloys on the osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *J Biomed Mater Res A* 2014a; 102(12):4346–57. doi: 10.1002/jbm.a.35111.
- Li X-J, Xie L, Pan F-S, Wang Y, Liu H, Tang Y-R et al. A feasibility study of using biodegradable magnesium alloy in glaucoma drainage device. *Int J Ophthalmol* 2018; 11(1):135–42. doi: 10.18240/ijo.2018.01.21.
- Li Y, Lu F, Li H, Zhu W, Pan H, Tan G et al. Corrosion mechanism of micro-arc oxidation treated biocompatible AZ31 magnesium alloy in simulated body fluid. *Progress in Natural Science: Materials International* 2014b; 24(5):516–22. doi: 10.1016/j.pnsc.2014.08.007.
- Li Z, Gu X, Lou S, Zheng Y. The development of binary Mg-Ca alloys for use as biodegradable materials within bone. *Biomaterials* 2008; 29(10):1329–44. doi: 10.1016/j.biomaterials.2007.12.021.
- Liebich H-G. Funktionelle Histologie der Haussäugetiere: Lehrbuch und Farbatlas für Studium und Praxis ; mit 11 Tabellen. 4., völlig überarb. und erw. Aufl. Stuttgart: Schattauer; 2004.
- Liu D, Genetos DC, Shao Y, Geist DJ, Li J, Ke HZ et al. Activation of extracellular-signal regulated kinase (ERK1/2) by fluid shear is Ca(2+)- and ATP-dependent in MC3T3-E1 osteoblasts. *Bone* 2008; 42(4):644–52. doi: 10.1016/j.bone.2007.09.058.
- Lüllmann-Rauch R, Asan E. Taschenlehrbuch Histologie. 6., vollständig überarbeitete Auflage. Stuttgart: Thieme; 2019.
- Luthringer BJC, Feyerabend F, Willumeit-Römer R. Magnesium-based implants: a mini-review. *Magnes Res* 2014; 27(4):142–54. doi: 10.1684/mrh.2015.0375.

- Ma WH, Liu YJ, Wang W, Zhang YZ. Improved biological performance of magnesium by micro-arc oxidation. *Braz J Med Biol Res* 2015; 48(3):214–25. doi: 10.1590/1414-431X20144171.
- Mang HA, Hofstetter G. Grundlagen der Elastizitätstheorie. In: Mang HA, Hofstetter G, Hrsg. Festigkeitslehre. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2013. p. 19–105.
- Marsell R, Einhorn TA. The biology of fracture healing. *Injury* 2011; 42(6):551–5. doi: 10.1016/j.injury.2011.03.031.
- Martini LA. Magnesium supplementation and bone turnover. *Nutr Rev* 1999; 57(7):227–9. doi: 10.1111/j.1753-4887.1999.tb06948.x.
- McBride ED. MAGNESIUM SCREW AND NAIL TRANSFIXION IN FRACTURES. *Southern Medical Journal* 1938; 31(5):508–14. doi: 10.1097/00007611-193805000-00010.
- Meier R, Panzica M. Erste Ergebnisse mit einer resorbierbaren MgYREZr-Kompressionsschraube bei der instabilen Kahnbeinfraktur zeigen eine massive Zystenbildung. *Handchir Mikrochir Plast Chir* 2017; 49(1):37–41. doi: 10.1055/s-0042-121416.
- 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):311–4. doi: 10.1016/S0901-5027(89)80102-X.
- Musso CG. Magnesium metabolism in health and disease. *Int Urol Nephrol* 2009; 41(2):357–62. doi: 10.1007/s11255-009-9548-7.
- Myrissa A, Braeuer S, Martinelli E, Willumeit-Römer R, Goessler W, Weinberg AM. Gadolinium accumulation in organs of Sprague-Dawley® rats after implantation of a biodegradable magnesium-gadolinium alloy. *Acta Biomater* 2017; 48:521–9. doi: 10.1016/j.actbio.2016.11.024.
- Nagels J, Stokdijk M, Rozing PM. Stress shielding and bone resorption in shoulder arthroplasty. *J Shoulder Elbow Surg* 2003; 12(1):35–9. doi: 10.1067/mse.2003.22.
- Naujokat H, Seitz J-M, Açı Y, Damm T, Möller I, Gülses A et al. Osteosynthesis of a cranio-osteoplasty with a biodegradable magnesium plate system in miniature pigs. *Acta Biomater* 2017; 62:434–45. doi: 10.1016/j.actbio.2017.08.031.
- 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):731–5. doi: 10.1016/j.ijom.2009.02.016.
- Orringer JS, Barcelona V, Buchman SR. Reasons for removal of rigid internal fixation devices in craniofacial surgery. *J Craniofac Surg* 1998; 9(1):40–4. doi: 10.1097/00001665-199801000-00009.

- 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 Relat Res* 1978; (136):287–93.
- Pan Z, Patil PM. Titanium osteosynthesis hardware in maxillofacial trauma surgery: to remove or remain? A retrospective study. *Eur J Trauma Emerg Surg* 2014; 40(5):587–91. doi: 10.1007/s00068-013-0348-5.
- Papay FA, Hardy S, Morales L, Walker M, Enlow D. "False" migration of rigid fixation appliances in pediatric craniofacial surgery. *J Craniofac Surg* 1995; 6(4):309–13. doi: 10.1097/00001665-199507000-00010.
- Park J-W, An C-H, Jeong S-H, Suh J-Y. Osseointegration of commercial microstructured titanium implants incorporating magnesium: a histomorphometric study in rabbit cancellous bone. *Clin Oral Implants Res* 2012a; 23(3):294–300. doi: 10.1111/j.1600-0501.2010.02144.x.
- Park J-W, Ko H-J, Jang J-H, Kang H, Suh J-Y. Increased new bone formation with a surface magnesium-incorporated deproteinized porcine bone substitute in rabbit calvarial defects. *J Biomed Mater Res A* 2012b; 100(4):834–40. doi: 10.1002/jbm.a.34017.
- Park K-D, Lee B-A, Piao X-H, Lee K-K, Park S-W, Oh H-K et al. Effect of magnesium and calcium phosphate coatings on osteoblastic responses to the titanium surface. *J Adv Prosthodont* 2013; 5(4):402–8. doi: 10.4047/jap.2013.5.4.402.
- Pearce AI, Richards RG, Milz S, Schneider E, Pearce SG. Animal models for implant biomaterial research in bone: a review. *Eur Cell Mater* 2007; 13:1–10. doi: 10.22203/ecm.v013a01.
- Peltoniemi HH, Tulamo RM, Toivonen T, Hallikainen D, Törmälä P, Waris T. Biodegradable semirigid plate and miniscrew fixation compared with rigid titanium fixation in experimental calvarial osteotomy. *J Neurosurg* 1999; 90(5):910–7. doi: 10.3171/jns.1999.90.5.0910.
- Pietrzak WS, Sarver DR, Verstynen ML. Bioabsorbable polymer science for the practicing surgeon. *J Craniofac Surg* 1997; 8(2):87–91. doi: 10.1097/00001665-199703000-00004.
- Pobloth A-M, Checa S, Razi H, Petersen A, Weaver JC, Schmidt-Bleek K et al. Mechanobiologically optimized 3D titanium-mesh scaffolds enhance bone regeneration in critical segmental defects in sheep. *Sci Transl Med* 2018; 10(423). doi: 10.1126/scitranslmed.aam8828.
- Poinern GEJ, Brundavanam S, Fawcett D. Biomedical Magnesium Alloys: A Review of Material Properties, Surface Modifications and Potential as a Biodegradable Orthopaedic Implant. *AJBE* 2013; 2(6):218–40. doi: 10.5923/j.ajbe.20120206.02.
- Pourbaix M. Atlas of electrochemical equilibria in aqueous solutions. 2., English ed. Houston, Tex.: National Association of Corrosion Engineers; 1974.

- Reifenrath J, Krause A, Bormann D, Rechenberg B von, Windhagen H, Meyer-Lindenberg A. Deep differences in the in-vivo-degradation and biocompatibility of two very similar rare-earth containing Mg-alloys in a rabbit model. *Mat.-wiss. u. Werkstofftech.* 2010; 41(12):1054–61. doi: 10.1002/mawe.201000709.
- Rendenbach C, Fischer H, Kopp A, Schmidt-Bleek K, Kreiker H, Stumpp S et al. Improved in vivo osseointegration and degradation behavior of PEO surface-modified WE43 magnesium plates and screws after 6 and 12 months. *Materials Science and Engineering: C* 2021; 129:112380. doi: 10.1016/j.msec.2021.112380.
- Rendenbach C, Schoellchen M, Bueschel J, Gauer T, Sedlacik J, Kutzner D et al. Evaluation and reduction of magnetic resonance imaging artefacts induced by distinct plates for osseous fixation: an in vitro study @ 3 T. *Dentomaxillofac Radiol* 2018; 47(7):20170361. doi: 10.1259/dmfr.20170361.
- Rodríguez-Carballo E, Gámez B, Ventura F. p38 MAPK Signaling in Osteoblast Differentiation. *Front Cell Dev Biol* 2016; 4:40. doi: 10.3389/fcell.2016.00040.
- Salomon F-V, Achilles W, Hrsg. *Anatomie für die Tiermedizin. 2., überarb. und erw. Aufl.* Stuttgart: Enke; 2008.
- Sanchez AHM, Luthringer BJC, Feyerabend F, Willumeit R. Mg and Mg alloys: how comparable are in vitro and in vivo corrosion rates? A review. *Acta Biomater* 2015; 13:16–31. doi: 10.1016/j.actbio.2014.11.048.
- Sankara Narayanan TSN, Park IS, Lee MH. Strategies to improve the corrosion resistance of microarc oxidation (MAO) coated magnesium alloys for degradable implants: Prospects and challenges. *Progress in Materials Science* 2014; 60:1–71. doi: 10.1016/j.pmatsci.2013.08.002.
- Saris N-EL, Mervaala E, Karppanen H, Khawaja JA, Lewenstam A. Magnesium. *Clinica Chimica Acta* 2000; 294(1-2):1–26. doi: 10.1016/S0009-8981(99)00258-2.
- Schaller B, Matthias Burkhard JP, 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* 2018; 76(10):1–13. doi: 10.1016/j.joms.2018.03.039.
- Schaller B, Saulacic N, Beck S, Imwinkelried T, Goh BT, Nakahara K et al. In vivo degradation of a new concept of magnesium-based rivet-screws in the minipig mandibular bone. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 2016a; 69:247–54. doi: 10.1016/j.msec.2016.06.085.
- Schaller B, Saulacic N, Beck S, Imwinkelried T, Liu EWY, Nakahara K et al. 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 Craniomaxillofac Surg* 2017; 45(6):862–71. doi: 10.1016/j.jcms.2017.03.018.
- Schaller B, Saulacic N, Imwinkelried T, Beck S, Liu EWY, Gralla J et al. In vivo degradation of magnesium plate/screw osteosynthesis implant systems: Soft and hard tissue response in a calvarial model in miniature pigs. *J Craniomaxillofac Surg* 2016b; 44(3):309–17. doi: 10.1016/j.jcms.2015.12.009.
- Schlegel KA, Rupprecht S, Petrovic L, Honert C, Srour S, Wilmowsky C von et al. Preclinical animal model for de novo bone formation in human maxillary sinus. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2009; 108(3):e37-44. doi: 10.1016/j.tripleo.2009.05.037.
- Schlingmann KP, Gudermann T. A critical role of TRPM channel-kinase for human magnesium transport. *J Physiol* 2005; 566(Pt 2):301–8. doi: 10.1113/jphysiol.2004.080200.
- Schmitz F, Bley C-H. *Anatomie, Physiologie: Mit Biologie, Chemie, Physik und Histologie*. 2. korrigierter Nachdruck. Stuttgart: Thieme; 2015.
- Schnorr B, Kressin M. *Embryologie der Haustiere* 2006. doi: 10.1055/b-002-10329.
- Schubert J. Therapie von Mittelgesichtsfrakturen. *Radiologe* 2007; 47(7):598-605. doi: 10.1007/s00117-007-1513-9.
- Schumann P, Lindhorst D, Wagner MEH, Schramm A, Gellrich N-C, Rücker M. Perspectives on resorbable osteosynthesis materials in craniomaxillofacial surgery. *Pathobiology* 2013; 80(4):211–7. doi: 10.1159/000348328.
- Seal CK, Vince K, Hodgson MA. Biodegradable surgical implants based on magnesium alloys – A review of current research. *IOP Conf. Ser.: Mater. Sci. Eng.* 2009; 4:12011. doi: 10.1088/1757-899X/4/1/012011.
- Shellock FG, Mink JH, Curtin S, Friedman MJ. MR imaging and metallic implants for anterior cruciate ligament reconstruction: assessment of ferromagnetism and artifact. *J Magn Reson Imaging* 1992; 2(2):225–8. doi: 10.1002/jmri.1880020217.
- Siewert JR, Brauer RB. *Basiswissen Chirurgie*. Heidelberg: Springer; 2007.
- Simchen F, Sieber M, Kopp A, Lampke T. Introduction to Plasma Electrolytic Oxidation—An Overview of the Process and Applications. *Coatings* 2020; 10(7):628. doi: 10.3390/coatings10070628.
- Simianer H, Köhn F. Genetic management of the Göttingen Minipig population. *J Pharmacol Toxicol Methods* 2010; 62(3):221–6. doi: 10.1016/j.vascn.2010.05.004.
- Singh Raman RK, Jafari S, Harandi SE. Corrosion fatigue fracture of magnesium alloys in bioimplant applications: A review. *Engineering Fracture Mechanics* 2015; 137:97–108. doi: 10.1016/j.engfracmech.2014.08.009.

- Smeets R, Schöllchen M, Gauer T, Aarabi G, Assaf AT, Rendenbach C et al. Artefacts in multimodal imaging of titanium, zirconium and binary titanium-zirconium alloy dental implants: an in vitro study. *Dentomaxillofac Radiol* 2017; 46(2):20160267. doi: 10.1259/dmfr.20160267.
- Solar RJ, Pollack SR, 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):217–50. doi: 10.1002/jbm.820130206.
- Song G, Song S. A Possible Biodegradable Magnesium Implant Material. *Adv. Eng. Mater.* 2007; 9(4):298–302. doi: 10.1002/adem.200600252.
- Song GL, Atrens A. Corrosion Mechanisms of Magnesium Alloys. *Adv. Eng. Mater.* 1999; 1(1):11–33. doi: 10.1002/(SICI)1527-2648(199909)1:1<11::AID-ADEM11>3.0.CO;2-N.
- Srinivasan P, Miller MA, Verdonschot N, Mann KA, Janssen D. Strain shielding in trabecular bone at the tibial cement-bone interface. *J Mech Behav Biomed Mater* 2017; 66:181–6. doi: 10.1016/j.jmbbm.2016.11.006.
- Staiger MP, Pietak AM, Huadmai J, Dias G. Magnesium and its alloys as orthopedic biomaterials: a review. *Biomaterials* 2006; 27(9):1728–34. doi: 10.1016/j.biomaterials.2005.10.003.
- Štembírek J, Kyllar M, Putnová I, Stehlík L, Buchtová M. The pig as an experimental model for clinical craniofacial research. *Lab Anim* 2012; 46(4):269–79. doi: 10.1258/la.2012.012062.
- Sumitomo N, Noritake K, Hattori T, Morikawa K, Niwa S, Sato K et al. Experiment study on fracture fixation with low rigidity titanium alloy: plate fixation of tibia fracture model in rabbit. *J Mater Sci Mater Med* 2008; 19(4):1581–6. doi: 10.1007/s10856-008-3372-y.
- Sumner DR, Galante JO. Determinants of stress shielding: design versus materials versus interface. *Clin Orthop Relat Res* 1992; (274):202–12.
- Sun H, Luo CF, Zhong B, Shi HP, Zhang CQ, Zeng BF. A prospective, randomised trial comparing the use of absorbable and metallic screws in the fixation of distal tibiofibular syndesmosis injuries: mid-term follow-up. *Bone Joint J* 2014; 96-B(4):548–54. doi: 10.1302/0301-620X.96B4.32171.
- Sun L, Li X, Xu M, Yang F, Wang W, Niu X. In vitro immunomodulation of magnesium on monocytic cell toward anti-inflammatory macrophages. *Regen Biomater* 2020; 7(4):391–401. doi: 10.1093/rb/rbaa010.
- Suuronen R, Lindqvist C. Bioresorbable Materials for Bone Fixation: Review of Biological Concepts and Mechanical Aspects. In: Greenberg AM, Prein J, Hrsg. *Cranio-maxillofacial*

- Reconstructive and Corrective Bone Surgery: Principles of Internal Fixation Using the AO/ASIF Technique. New York, NY: Springer New York; 2002. p. 113–23.
- Suuronen R, Pohjonen T, Hietanen J, Lindqvist C. A 5-year in vitro and in vivo study of the biodegradation of polylactide plates. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 1998; 56(5):604–14. doi: 10.1016/S0278-2391(98)90461-X.
- Swaminathan R. Magnesium metabolism and its disorders. *Clin Biochem Rev* 2003; 24(2):47–66.
- Swindle MM, Makin A, Herron AJ, Clubb FJ, Frazier KS. Swine as models in biomedical research and toxicology testing. *Vet Pathol* 2012; 49(2):344–56. doi: 10.1177/0300985811402846.
- Terjesen T, Apalset K. The influence of different degrees of stiffness of fixation plates on experimental bone healing. *J. Orthop. Res.* 1988; 6(2):293–9. doi: 10.1002/jor.1100060218.
- Thomas S, Medhekar NV, Frankel GS, Birbilis N. Corrosion mechanism and hydrogen evolution on Mg. *Current Opinion in Solid State and Materials Science* 2015; 19(2):85–94. doi: 10.1016/j.cossms.2014.09.005.
- Thorén H, Snäll J, Hallermann W, Kormi E, Törnwall J. Policy of routine titanium miniplate removal after maxillofacial trauma. *J Oral Maxillofac Surg* 2008; 66(9):1901–4. doi: 10.1016/j.joms.2008.03.009.
- Topf JM, Murray PT. Hypomagnesemia and hypermagnesemia. *Rev Endocr Metab Disord* 2003; 4(2):195–206. doi: 10.1023/a:1022950321817.
- van Laecke S. Hypomagnesemia and hypermagnesemia. *Acta Clin Belg* 2019; 74(1):41–7. doi: 10.1080/17843286.2018.1516173.
- Virtanen S. Biodegradable Mg and Mg alloys: Corrosion and biocompatibility. *Materials Science and Engineering: B* 2011; 176(20):1600–8. doi: 10.1016/j.mseb.2011.05.028.
- Vormann J. Magnesium: nutrition and metabolism. *Molecular Aspects of Medicine* 2003; 24(1-3):27–37. doi: 10.1016/S0098-2997(02)00089-4.
- Waizy H, Diekmann J, Weizbauer A, Reifenrath J, Bartsch I, Neubert V et al. In vivo study of a biodegradable orthopedic screw (MgYREZr-alloy) in a rabbit model for up to 12 months. *J Biomater Appl* 2014; 28(5):667–75. doi: 10.1177/0885328212472215.
- Wang J. Titanium, chromium and cobalt ions modulate the release of bone-associated cytokines by human monocytes/macrophages in vitro. *Biomaterials* 1996; 17(23):2233–40. doi: 10.1016/0142-9612(96)00072-5.
- Wang J-L, Xu J-K, Hopkins C, Chow DH-K, Qin L. Biodegradable Magnesium-Based Implants in Orthopedics-A General Review and Perspectives. *Adv Sci (Weinh)* 2020; 7(8):1902443. doi: 10.1002/advs.201902443.

- Wang ML, Nesti LJ, Tuli R, Lazatin J, Danielson KG, Sharkey PF et al. Titanium particles suppress expression of osteoblastic phenotype in human mesenchymal stem cells. *J. Orthop. Res.* 2002; 20(6):1175–84. doi: 10.1016/S0736-0266(02)00076-1.
- Wang S, Liu Y, Fang D, Shi S. The miniature pig: a useful large animal model for dental and orofacial research. *Oral Dis* 2007; 13(6):530–7. doi: 10.1111/j.1601-0825.2006.01337.x.
- Weingart D, Bublitz R, Michilli R, Class D. Perossäre intrakraniale Translokation von Titanosteosyntheseplatten und -schrauben nach frontoorbitalem Advancement. *Mund Kiefer Gesichtschir* 2001; 5(1):57–60. doi: 10.1007/PL00010794.
- Willbold E, Kaya AA, Kaya RA, Beckmann F, Witte F. Corrosion of magnesium alloy AZ31 screws is dependent on the implantation site. *Materials Science and Engineering: B* 2011; 176(20):1835–40. doi: 10.1016/j.mseb.2011.02.010.
- Wiltfang J. Osteosynthesesysteme in der Mund-, Kiefer-, Gesichtschirurgie. *HNO* 2002; 50(9):800–11. doi: 10.1007/s00106-002-0667-z.
- Wiltfang J, Merten H-A, Becker H-J, Luhr H-G. The resorbable miniplate system lactosorb in a growing cranio-osteoplasty animal model. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery* 1999; 27(4):207–10. doi: 10.1016/s1010-5182(99)80030-4.
- Windhagen H, Radtke K, Weizbauer A, Diekmann J, Noll Y, Kreimeyer U et al. Biodegradable magnesium-based screw clinically equivalent to titanium screw in hallux valgus surgery: short term results of the first prospective, randomized, controlled clinical pilot study. *Biomed Eng Online* 2013; 12:62. doi: 10.1186/1475-925X-12-62.
- Winkler T, Sass FA, Duda GN, Schmidt-Bleek K. A review of biomaterials in bone defect healing, remaining shortcomings and future opportunities for bone tissue engineering: The unsolved challenge. *Bone Joint Res* 2018; 7(3):232–43. doi: 10.1302/2046-3758.73.BJR-2017-0270.R1.
- Witte F. The history of biodegradable magnesium implants: a review. *Acta Biomater* 2010; 6(5):1680–92. doi: 10.1016/j.actbio.2010.02.028.
- Witte F, Fischer J, Nellesen J, Crostack H-A, Kaese V, Pisch A et al. In vitro and in vivo corrosion measurements of magnesium alloys. *Biomaterials* 2006; 27(7):1013–8. doi: 10.1016/j.biomaterials.2005.07.037.
- Witte F, Hort N, Feyerabend F, Vogt C, Hrsg. Magnesium (Mg) corrosion: a challenging concept for degradable implants. Oxford, Philadelphia: Woodhead Pub; 2011. (Woodhead Publishing in materials). Verfügbar unter: <http://site.ebrary.com/lib/alltitles/docDetail.action?docID=10654141>.

- Witte F, Hort N, Vogt C, Cohen S, Kainer KU, Willumeit R et al. Degradable biomaterials based on magnesium corrosion. *Current Opinion in Solid State and Materials Science* 2008; 12(5-6):63–72. doi: 10.1016/j.cossms.2009.04.001.
- Witte F, Kaese V, Haferkamp H, Switzer E, Meyer-Lindenberg A, Wirth CJ et al. In vivo corrosion of four magnesium alloys and the associated bone response. *Biomaterials* 2005; 26(17):3557–63. doi: 10.1016/j.biomaterials.2004.09.049.
- Wolff J. *Das Gesetz der Transformation der Knochen*. Berlin: Hirschwald; 1892.
- Wong HM, Wu S, Chu PK, Cheng SH, Luk KDK, Cheung KMC et al. Low-modulus Mg/PCL hybrid bone substitute for osteoporotic fracture fixation. *Biomaterials* 2013; 34(29):7016–32. doi: 10.1016/j.biomaterials.2013.05.062.
- Wong HM, Yeung KWK, Lam KO, Tam V, Chu PK, Luk KDK et al. A biodegradable polymer-based coating to control the performance of magnesium alloy orthopaedic implants. *Biomaterials* 2010; 31(8):2084–96. doi: 10.1016/j.biomaterials.2009.11.111.
- Wu L, Luthringer BJC, Feyerabend F, Schilling AF, Willumeit R. Effects of extracellular magnesium on the differentiation and function of human osteoclasts. *Acta Biomater* 2014; 10(6):2843–54. doi: 10.1016/j.actbio.2014.02.010.
- Xu L, Yu G, Zhang E, Pan F, Yang K. In vivo corrosion behavior of Mg-Mn-Zn alloy for bone implant application. *J Biomed Mater Res A* 2007; 83(3):703–11. doi: 10.1002/jbm.a.31273.
- Yamasaki Y, Yoshida Y, Okazaki M, Shimazu A, Kubo T, Akagawa Y et al. Action of FGMgCO₃Ap-collagen composite in promoting bone formation. *Biomaterials* 2003; 24(27):4913–20. doi: 10.1016/S0142-9612(03)00414-9.
- Yamasaki Y, Yoshida Y, Okazaki M, Shimazu A, Uchida T, Kubo T et al. Synthesis of functionally graded MgCO₃ apatite accelerating osteoblast adhesion. *J. Biomed. Mater. Res.* 2002; 62(1):99–105. doi: 10.1002/jbm.10220.
- Yang J, Cui F, Lee IS. Surface modifications of magnesium alloys for biomedical applications. *Ann Biomed Eng* 2011; 39(7):1857–71. doi: 10.1007/s10439-011-0300-y.
- Yang J, Koons GL, Cheng G, Zhao L, Mikos AG, Cui F. A review on the exploitation of biodegradable magnesium-based composites for medical applications. *Biomed Mater* 2018; 13(2):22001. doi: 10.1088/1748-605X/aa8fa0.
- Yerit KC, Hainich S, Enislidis G, Turhani D, Klug C, Wittwer G et al. Biodegradable fixation of mandibular fractures in children: stability and early results. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2005; 100(1):17–24. doi: 10.1016/j.tripleo.2004.11.013.
- 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* 2014a; 10(6):2834–42. doi: 10.1016/j.actbio.2014.02.002.

- Yoshizawa S, Brown A, Barchowsky A, Sfeir C. Role of magnesium ions on osteogenic response in bone marrow stromal cells. *Connect Tissue Res* 2014b; 55 Suppl 1:155–9. doi: 10.3109/03008207.2014.923877.
- Yu JC, Bartlett SP, Goldberg DS, Gannon F, Hunter J, Habecker P et al. An experimental study of the effects of craniofacial growth on the long-term positional stability of microfixation. *J Craniofac Surg* 1996; 7(1):64–8. doi: 10.1097/00001665-199601000-00014.
- 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):783–8. doi: 10.1016/j.joms.2018.10.022.
- Zeng R, Dietzel W, Witte F, Hort N, Blawert C. Progress and Challenge for Magnesium Alloys as Biomaterials. *Adv. Eng. Mater.* 2008; 10(8):B3-B14. doi: 10.1002/adem.200800035.
- Zhang B, Hou Y, Wang X, Wang Y, Geng L. Mechanical properties, degradation performance and cytotoxicity of Mg–Zn–Ca biomedical alloys with different compositions. *Materials Science and Engineering: C* 2011a; 31(8):1667–73. doi: 10.1016/j.msec.2011.07.015.
- Zhang BP, Wang Y, Geng L, Hrsg. *Research on Mg-Zn-Ca Alloy as Degradable Biomaterial: Physics and chemistry*. Rijeka, Croatia: InTech; 2011b.
- Zhang E, Xu L, Yu G, Pan F, Yang K. In vivo evaluation of biodegradable magnesium alloy bone implant in the first 6 months implantation. *J Biomed Mater Res A* 2009; 90(3):882–93. doi: 10.1002/jbm.a.32132.
- 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* 2017a; 112:287–302. doi: 10.1016/j.biomaterials.2016.10.017.
- Zhao L, Chen W, Dai J, Wang Z, Zhang X. Effects of Heat Treatment on Corrosion and Wear Behaviors of Mg-6Gd-2Zn-0.4Zr Alloy in Simulated Body Fluid. *J. of Materi Eng and Perform* 2017b; 26(11):5501–10. doi: 10.1007/s11665-017-2975-1.
- Zheng YF, Gu XN, Witte F. Biodegradable metals. *Materials Science and Engineering: R: Reports* 2014; 77:1–34. doi: 10.1016/j.mser.2014.01.001.
- Zreiqat H, Howlett CR, Zannettino A, Evans P, Schulze-Tanzil G, Knabe C et al. Mechanisms of magnesium-stimulated adhesion of osteoblastic cells to commonly used orthopaedic implants. *J. Biomed. Mater. Res.* 2002; 62(2):175–84. doi: 10.1002/jbm.10270.
- Zreiqat H, Valenzuela SM, Nissan BB, Roest R, Knabe C, Radlanski RJ et al. The effect of surface chemistry modification of titanium alloy on signalling pathways in human osteoblasts. *Biomaterials* 2005; 26(36):7579–86. doi: 10.1016/j.biomaterials.2005.05.024.

Publikationsverzeichnis

Es wurden Teilergebnisse dieser Arbeit eingereicht für die Veröffentlichung bei:

Kongress der Deutschen Gesellschaft für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie 2022

Der Einfluss einer PEO-Oberflächenmodifikation auf das Residualvolumen von ZX00-Magnesiumschrauben und die umgebende Knochendichte nach 6, 12 und 18 Monaten im Minipig.

C Rendenbach, C Leber, K Schmidt-Bleek, A Prates Soares, H Kreiker, GN Duda, H Hanken, O Jung, R Smeets, M Heiland, A Kopp, H Fischer

Deutscher Kongress für Orthopädie und Unfallchirurgie 2022

Vergleich von Degradationsverhalten und umgebendem Knochenvolumen ZX00-basierter Magnesiumimplantate mit und ohne PEO-Oberflächenmodifikation im Minipigmodell

H Fischer, C Leber, K Schmidt-Bleek, A Prates Soares, H Kreiker, GN Duda, R Smeets, M Heiland, A Kopp, C Rendenbach

Kongress der European Society of Biomechanics 2022

Long term oxidation behavior of PEO-surface modified magnesium screws in a large animal model

Ana Prates Soares, Alexander Kopp, Heilwig Fischer, Katharina Schmidt-Bleek, Christoph Leber, Henri Kreiker, Georg Duda, Henning Hanken, Ole Jung, Ralf Smeets, Max Heiland, Carsten Rendenbach

Danksagung

Als allererstes möchte ich mich an dieser Stelle bei meinem Doktorvater Herrn Univ.-Prof. Dr. med. vet. Robert Klopffleisch bedanken, unsere Gespräche auch manchmal abseits der Thematik der Dissertation haben mir stets Motivation gegeben und mich weitergebracht. Mein Dank gilt auch Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Dr. med. dent. Max Heiland Klinikdirektor der Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie der Charité Universitätsmedizin Berlin sowie Herrn Univ.-Prof. Dr.-Ing. Georg Duda Institutsdirektor des Julius Wolff Instituts für Biomechanik und Muskuloskeletale Regeneration der Charité Universitätsmedizin Berlin für die Ermöglichung dieser Doktorarbeit.

Des Weiteren möchte ich mich für die hervorragende Betreuung durch PD Dr. med. Dr. med. dent. Carsten Rendenbach und meiner gesamten Arbeitsgruppe bedanken.

Besonderer Dank gilt auch den technischen Angestellten des Julius Wolff Instituts, besonders Sabine Stumpp, Marzena Princ und Mario Thiele! Ihr wart mir stets bei methodischen Fragen zur Seite gestanden. Ein weiterer großer Dank gilt Univ.-Prof. Dr. med. vet. Marcus G. Doherr und dem Institut für Biometrie für die exzellente Beratung zu allen statistischen Fragestellungen.

Ganz besonders möchte ich meiner Doktorschwester Dr. med. Heilwig Fischer bedanken, du hattest stets ein offenes Ohr, wenn es mal nicht so lief und immer sehr gute fachliche Ratschläge! Daneben möchte ich mich auch bei meinen Doktorschwestern und Doktorbrüdern, sowie allen anderen im Julius Wolff Institut für die netten Gespräche und die moralische Unterstützung danken.

Unendlicher Dank gilt vor allem meiner Familie, speziell meinen Eltern und meinen Verwandten sowie meinen Freundinnen und Freunden. Ihr habt mich stets mit euren motivierenden Worten unterstützt, immer an mich geglaubt und mir exzellente Ratschläge gegeben sowie stets den Rückhalt gegeben, den ich gebraucht habe. Ich weiß, dass ich mich auf euch immer verlassen kann und bin froh, dass es euch gibt. Danke!

Finanzierungsquellen

Die Arbeiten wurde finanziell unterstützt durch die Karl Leibinger Medizintechnik GmbH & Co KG.

Interessenskonflikte

Es besteht kein Interessenskonflikt durch finanzielle Unterstützung der Arbeiten.

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Berlin, den 06.10.2022

Christoph Joachim Leber



9 783967 291872

mbvberlin mensch und buch verlag

49,90 Euro | ISBN: 978-3-96729-187-2