UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Klinik und Poliklinik für Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie

Kommissarischer Direktor: Priv.-Doz. Dr. med. Dr. med. dent. Hanken Unteranleitung von: Professor Dr. med. Dr. dent. Smeets

Biokompatibilitätsanalyse degradierbarer Magnesiumimplantate Ein In-vivo-Versuch

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Tiziana Füger aus Tübingen

Hamburg 2017

Angenommen von der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 19.02.2018

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Prof. Dr. Dr. Ralf Smeets

Prüfungsausschuss, der Gutachter: Prof. Dr. Guido Heydecke

Prüfungsausschuss, der Prüfer: Prof. Dr. Ibrahim Nergiz

Prüfungsausschuss, stellv. Mitglied: PD Dr. Hartwig Seedorf Für Elisabeth Friederike Maier-Füger Jannis Christopher Füger

Inhaltsverzeichnis

Inhal	tsverzeichnis	I
Abbil	dungsverzeichnis	. IV
Tabe	llenverzeichnis	. VI
Wiss	enschaftlicher Leitfaden	VIII
1	Arbeitshypothese und Fragestellung	1
2	Einleitung	2
2.1	Entwicklung der Osteosyntheseverfahren - Rückblick	2
2.2	Osteosyntheseverfahren	2
2.2.1	Titan-Osteosynthesesysteme	3
2.2.2	Bioresorbierbare Osteosynthesesysteme	4
2.2.2.	1 PLA-Systeme	5
2.2.2.	2 Magnesium als innovativer Implantatwerkstoff	6
3	Das Forschungsprojekt	9
3.1	Ziel des Gesamtprojekts BIOMAGIK	9
3.2	Vorarbeit und Planung	10
3.3	Unerlässlichkeit des Tierversuchs	10
3.4	Projekt- und Versuchsaufbau	11
3.4.1	Zeitraum	11
3.4.2	Versuchstiere	12
4	Material	13
4.1	Innovatives Implantatdesign	13
4.1.1	Makrostruktur des Implantats	15
4.1.2	Mikrostruktur des Implantats	16
4.2	Phasenverlauf der Degradation	17
5	Methoden	19
5.1	Implantation der Probekörper	19
5.1.1	Durchführung der Operation	19
5.2	In-vivo-Untersuchungen	22
5.2.1	Klinische Verlaufskontrolle	22
5.2.2	CT-Bildgebung	22
5.2.3	CT-Analyse (OsiriX)	24

5.2.4	Blutserum-Analyse 26					
5.3	Postmortem Untersuchungen	26				
5.3.1	Mikro-CT gestützte Analyse	27				
5.3.2	Histologische Analyse der Organe	29				
5.3.3	Ergänzende Untersuchung auf Seltene Erden (REEs)	30				
5.3.4	Untersuchung der Knochenimplantate	31				
5.3.4.	1 Histologische Auswertung	31				
5.3.4.	2 Histologische Analyse	32				
5.3.4.	3 Histomorphometrische Analyse	33				
5.3.4.	4 Polarisationsmikroskopische Analyse	34				
5.3.4.	5 Statistik	35				
6	Ergebnisse	36				
6.1	In-vivo-Ergebnisse	36				
6.1.1	Klinische Verlaufskontrolle	36				
6.1.2	Ergebnisse der makroskopischen Analyse	36				
6.1.3	CT-Analyse	37				
6.1.3.	1 Gasvolumina	38				
6.1.3.	2 Bewertung der Volumenentwicklung der Probekörper	41				
6.1.4	Blutserum-Analyse	41				
6.2	Postmortem Ergebnisse	43				
6.2.1	Histologische Analyse der Organe	43				
6.2.2	Laborchemische Organanalyse nach 12 Monaten	45				
6.2.3	Mikro-CT gestützte Analyse der Femorapräparate	46				
6.2.4	Ergebnisse der histologischen/histomorphometrischen Auswertung	50				
6.2.4.	1 Knocheneinwachstum und Degradation	50				
6.2.4.	2 Titan-Kontrolle	55				
6.2.4.	3 Degradation	57				
6.2.4.	4 Gasentwicklung	59				
6.2.5	Ergebnisse der Polarisationsmikroskopie	61				
6.2.5.	1 Biokompatibilität	62				
6.2.5.	2 Knocheneinwachstum	63				
6.2.5.	3 Integration in das umliegende Gewebe und Degradation	63				
6.3	Statistik	63				
7	Diskussion	67				
7.1	Diskussion der Teilergebnisse bezüglich der untersuchten Parameter	67				
7.1.1	Degradation	67				
7.1.2	Gasentwicklung	68				
7.1.3	Knocheneinwachstum	70				
7.1.4	Biokompatibilität	70				
	-					

7.1.5	Kanalvarianten	72
7.2	Limitierung der Studie und Ausblick für weitere Arbeiten	74
7.2.1	Computer Tomographische Untersuchung	74
7.2.2	Histologische Schnitte	75
7.2.3	Versuchsaufbau	75
7.2.4	Ergänzende Untersuchungen	76
7.3	Ergebnisdiskussion in Bezug auf die Arbeitshypothesen	76
8	Zusammenfassung	78
9	Abstract	81
10	Anhang	83
10.1	Gegenüberstellung gängiger Methoden und Versuchsdesigns – Literaturrecherche	83
10.2	Versuchstiere und Einteilung in Gruppen	85
10.3	Bewertungssystem zur Auswertung der histologischen Präparate	91
11	Abkürzungsverzeichnis	93
12	Literaturverzeichnis	96
13	Danksagung	105
14	Lebenslauf	107
15	Eidesstattliche Versicherung	109

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Projektskizze
Abb. 2: Makrostrukturierung der Implantatkörper und Vision einer individuellen CAD/CAM
basierten Rekonstruktionsplatte15
Abb. 3: Schematische Darstellung der Kanalvarianten des Magnesium-Implantatkörpers
Abb. 4: Erwarteter Degradationsverlauf (schematisierte Darstellung)
Abb. 5: Implantation von Probekörpern mit unterschiedlichen Kanalgrößen20
Abb. 6: Position der Implantate
Abb. 7: Auswertung der Gasvolumina im CT mittels OsiriX25
Abb. 8: Auswertung der Implantatvolumina im CT mittels OsiriX
Abb. 9: Mikro-CT-Bildgebung eines Magnesium-Probekörpers, postoperativ
Abb. 10: Repräsentative Darstellung der Erfassung der von Knochen bedeckten
Implantatoberfläche im µCT29
Abb. 11: Übersicht der getesteten Färbemethoden
Abb. 12: Veranschaulichung, der bei der Untersuchung berücksichtigten
histologischen Merkmale
Abb. 13: Exemplarische Darstellung der histomorphometrischen Auswertung
mittels OsteoMeasure
Abb. 14: Exemplarische Aufnahme mit Polarisationsmikroskop (Olympus BX51) 35
Abb. 15: Makroskopische Darstellung der Femora Präparate nach HE-Färbung37
Abb. 16: Computer Tomographische Untersuchung der Implantationsregion am distalen
Femur über den Zeitraum von zwölf Monaten
Abb. 17: Gasvolumina der Magnesium-/Titan-Probekörper
im zeitlichen Verlauf von 12 Monaten (Mittelwerte)40
Abb. 18: Volumina der Magnesium-Probekörper im zeitlichen Verlauf (Mittelwerte)41
Abb. 19: Blutserum-Analyse zu den Seltenen Erden (REE)
Abb. 20: Magnesiumkonzentration in der Blutserum-Analyse
Abb. 21: Histopathologische Untersuchung von Nieren und Lebern (12-
Monatsergebnisse)43
Abb. 22: Repräsentative Bilder der histologischen Milzpräparate (12-Monatsergebnisse)
Abb. 23: Ergebnisse der laborchemischen Untersuchung der Leberproben
auf den Magnesiumgehalt45
Abb. 24: Ergebnisse der laborchemischen Untersuchung der Nierenproben
auf den Magnesiumgehalt46

Abb. 25: Mikro-CT-Bildgebung von Magnesium-Probekörpern, 6 Monate nach der
Implantation47
Abb. 26: Knocheneinbau in die Kanalstrukturen der Magnesium-Probekörper
aus der µCT-Messung (n=2)48
Abb. 27: Mikro-CT-Bildgebung von Magnesium-Probekörpern,
12 Monate nach der Implantation49
Abb. 28: Knocheneinwachstum nach 6 Monaten51
Abb. 29: Knocheneinwachstum in die Probekörper zum Zeitpunkt nach 6 Monaten 52
Abb. 30: Gesamte Knochenanlagerung nach 6 und 12 Monaten53
Abb. 31: Knocheneinwachstum in die Probekörper zum Zeitpunkt nach 12 Monaten .54
Abb. 32: Minder- und gut mineralisierte Knochenanlagerung nach 6 und 12 Monaten 55
Abb. 33a: Repräsentative, histologische Bilder der Titan-Kontrollkörper
zum Zeitpunkt nach 6 Monaten56
Abb. 33b: Repräsentative, histologische Bilder der Titan-Kontrollkörper
zum Zeitpunkt nach 12 Monaten57
Abb. 34: Degradation der Magnesiumimplantate nach 6 Monaten
Abb. 35: Degradation der Magnesiumimplantate (PK) zum Zeitpunkt nach 12 Monaten.
Abb. 36: Exemplarische Ausschnitte zur Darstellung der Gasentwicklung zum Zeitpunkt
von 6 Monaten60
Abb. 37: Polarisationsmikroskopische Aufnahmen nach 6 Monaten61
Abb. 38: Polarisationsmikroskopie Aufnahmen nach 12 Monaten62
Abb. 39: Effectplot

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Übersicht zu den Implantat-/Versuchsgruppen	13
Tab. 2: Übersicht über die CT-Kontrollgruppen	24
Tab. 3: Übersicht der µCT-Proben	27
Tab. 4: Über OsiriX ermittelte Gasvolumina im 12-monatigen Verlauf	38
Tab. 5: Morphometrische Auswertung der µCT-Schnittbilder (n=2)	48
Tab. 6: Ergebnisse der statistischen Auswertung nach 6 Monaten, zusammenfas	sende
Daten	64
Tab. 7a: Vergleich der einzelnen Kanalvarianten anhand der neugebildeten	
Knochenmasse	65
Tab. 7b: Vergleich der einzelnen Kanalvarianten anhand der neugebildeten	
Knochenmasse	65
Tab. 7c: Vergleich der einzelnen Kanalvarianten anhand der neugebildeten	
Knochenmasse	65
Tab. 8: Ergebnisse der statistischen Auswertung nach 12 Monaten, zusammenfa	ssende
Daten	66
Tab. 9a: Vergleich der einzelnen Kanalvarianten anhand der neugebildeten	
Knochenmasse	66
Tab. 9b: Vergleich der einzelnen Kanalvarianten anhand der neugebildeten	
Knochenmasse	66
Tab. 9c: Vergleich der einzelnen Kanalvarianten anhand der neugebildeten	
Knochenmasse	66
Tab. 10: Versuchstiere OP Gruppe 1 mit 0,8 mm Probekörpern und Standzeit 6 M	<i>l</i> onate
	85
Tab. 11: Versuchstiere OP Gruppe 1 mit 0,6 mm Probekörpern und Standzeit 6 M	<i>l</i> onate
	85
Tab. 12: Versuchstiere OP Gruppe 1 mit 0,4 mm Probekörpern und Standzeit 6 M	<i>l</i> onate
	86
Tab. 13: Versuchstiere OP Gruppe 2 mit 0,8 mm Probekörpern und Standzeit 6 M	<i>l</i> onate
	86
Tab. 14: Versuchstiere OP Gruppe 2 mit 0,6 mm Probekörpern und Standzeit 6 M	<i>l</i> onate
	87
Tab. 15: Versuchstiere OP Gruppe 2 mit 0,4 mm Probekörpern und Standzeit 6 M	<i>l</i> onate
	87
Tab. 16: Versuchstiere OP Gruppe 1 mit 0,8 mm Probekörpern und Standzeit 12	Monate
	88

Tab. 17: Versuchstiere OP Gruppe 1 mit 0,6 mm Probekörpern und Standzeit 12 Monate
Tab. 18: Versuchstiere OP Gruppe 1 mit 0,4 mm Probekörpern und Standzeit 12 Monate
Tab. 19: Versuchstiere OP Gruppe 2 mit 0,8 mm Probekörpern und Standzeit 12 Monate
Tab. 20: Versuchstiere OP Gruppe 2 mit 0,6 mm Probekörpern und Standzeit 12 Monate
Tab. 21: Versuchstiere OP Gruppe 2 mit 0,4 mm Probekörpern und Standzeit 12 Monate

Wissenschaftlicher Leitfaden

Wissenschaft besteht darin, neue Methoden und Verfahren zu etablieren, sowie langjährig Bestehendes zu hinterfragen, Maßnahmen zu Analysieren und der Drang Verbesserungswürdiges zu optimieren. Nur durch Veränderung kann Innovation und damit ein Progress entstehen. Durchbrüche in der Forschung, aktuelle wissenschaftliche Erkenntnisse, und langjährige Expertise bilden das Fundament der evidenzbasierten Medizin. Handlungsempfehlungen und Leitlinien dienen der Qualitätssicherung in der Medizin und sollen jedem Patienten die bestmögliche Versorgung gewährleisten.

(Herold 2015)

1 Arbeitshypothese und Fragestellung

Die vorliegende Arbeit stellt die Durchführung, Analyse und Ergebnispräsentation einer In-vivo-Studie zur Beurteilung von bioresorbierbaren Magnesium-Implantatsystemen vor. Die beschriebene Forschungsarbeit bezieht sich ausschließlich auf die In-vivo-Studie, die ein Teilprojekt des Gesamtprojekts "BIOMAGIK"¹ darstellt. Ziel dieses Vorhabens ist die Entwicklung und Realisierung eines neuartigen Implantatdesigns, das Magnesium als Implantatwerkstoff nutzbar macht. Die Ergebnisse der Arbeit sollen als Grundlage für weitere Forschungsprojekte im Bereich der biodegradierbaren Magnesiumosteosynthese dienen und letztendlich deren klinische Anwendung ermöglichen.

Die Durchführung der In-vivo-Untersuchung erfolgte an 60 Kaninchen. Im Rahmen des 12-monatigen Versuchszeitraums (von Januar 2015 bis Januar 2016) sollte die Degradation von Magnesium-Implantaten und das Knocheneinwachsverhalten verglichen und untersucht werden.

Analysiert wurden Implantate mit drei verschiedenen Kanalstrukturvarianten. Neben Magnesium-Implantaten wurden bei einer Kontrollgruppe Titan-Implantate mit derselben Grundstruktur implantiert.

Die Datenerhebung und Ergebnisanalyse basiert auf folgenden Arbeitshypothesen:

- Es besteht die Annahme, dass eine der drei Kanalstrukturvarianten ein schnelleres Knocheneinwachstum bewirkt als die beiden anderen.
- Es wird erwartet, dass alle Magnesium-Implantate unabhängig der Kanalvarianten mit guter Bioverträglichkeit über einen Zeitraum von einem Jahr vollständig, unter moderater Gasentwicklung, degradieren.

¹ Fa. Meotec GmbH & Co. KG, Aachen

2 Einleitung

2.1 Entwicklung der Osteosyntheseverfahren - Rückblick

Die Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie (MKG) ist ein vergleichsweise junges Fach, welches sich in den Zwanzigerjahren des vergangenen Jahrhunderts entwickelt hat. Entscheidend an Bedeutung gewonnen hat die MKG durch die zahlreichen Verletzten, die der erste und der zweite Weltkrieg gefordert hat. Zur Versorgung der vielen Traumata haben sich vor allem für den Kopf-Hals-Bereich spezielle therapeutische Verfahren (die ersten Verfahren der MKG) entwickelt (*Erdsach 2004*).

Bis zum Ende der 60er-Jahre des 20. Jahrhunderts wurden, insbesondere um die Narkoserisiken möglichst gering zu halten, bis zu 70% der Frakturen noch konservativ versorgt (*Hausamen et al. 2011*). Die konservative Frakturversorgung basierte auf dem Einsatz von Schienensystemen in Kombination mit speziellen Verbandstechniken. Im Laufe der 70er-Jahre rückte die operative Knochenrekonstruktion, zur Frakturversorgung, in den Vordergrund. Es entwickelten sich verschiedene Osteosyntheseverfahren und Materialien zur Versorgung von Knochendefekten in der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie (MKG) (*Erdsach 2004*).

Heutzutage kommen die rein konservativen Therapieverfahren bei Frakturen nur noch selten, beispielsweise bei nicht dislozierten Frakturen oder Frakturen mit Bruchgrad 1 (gemäß AO-Klassifikation²), zum Einsatz. Die Mehrzahl der Frakturen wird unter Verwendung von Titan-Osteosyntheseverfahren fixiert *(Chaushu et al.* 2000, Gerlach 2000, Jorgenson et al. 1997).

2.2 Osteosyntheseverfahren

Das Ziel der suffizienten Frakturreposition mittels Osteosyntheseverfahren besteht in der optimalen anatomischen Rekonstruktion und Stabilisierung von Knochendefekten. Behandlungsziel ist die komplette Ausheilung von Knochendefekten. Anders ausgedrückt handelt es sich hierbei um die bedeutenden drei *"R" der* Frakturlehre: Repetition, Retention bis zur Restitution *(Hausamen et al. 2011)*. Angestrebt

² System zur Beschreibung der Lokalisation und Beschaffenheit von Frakturen

wird eine primäre Knochenheilung ohne die Bildung von Pseudoarthrosen, Kallus oder Nekrosen.

2.2.1 Titan-Osteosynthesesysteme

Die gegenwärtigen Verfahren der ersten Wahl zur Behandlung und Rekonstruktion von Knochendefekten in der MKG, z.B. infolge von Unfällen, Missbildungen oder Tumorresektionen, basieren meist auf der Verwendung von Titan und Titanlegierungsmaterialien. Diese zeichnen sich, im Vergleich zu anderen Stählen, durch ein hohes Elastizitätsmodul, eine hohe Festigkeit und Stabilität, bei nur geringem Eigengewicht, eine hervorragende Biokompatibilität und immunologische Verträglichkeit sowie durch Korrosions- und Temperaturbeständigkeit aus *(Gerlach 2000, Landes et al. 2009)*.

Die Platten können allerdings lokal zu Wärme- und Kälteempfindlichkeit und Nervenirritationen führen. Es kann aber auch zur Schraubenlockerung, mit Materialverlust ins Weichgewebe, kommen. Länger im Körper verbleibende, starre Titan-Osteosynthesesysteme beeinflussen die Umbauvorgänge des umliegenden Knochengewebes ungünstig. Durch die Veränderung der Trage- und Belastungslinien kann es zur Schwächung des Knochens kommen *(Chaushu et al. 2000, Gerlach 2000, Jorgenson et al. 1997)*. Beim Einsatz von Titan-Osteosynthesesystemen ist die Ausbildung einer bindegewebigen Kapsel, die durch Irritationen und Gleitbewegungen im Bereich der Implantat-Gewebe-Interaktion entsteht, bekannt *(Arens et al. 1998, Thomas et al. 1999)*. Darüber hinaus stellen die Plattensysteme eine Infektionsquelle dar, die zu Osteomyelitiden und Gewebsabszessen führen kann. Die postoperative Infektion des eingebrachten Implantatmaterials, die in den meisten Fällen den Verlust des Implantats bedeutet, stellt die häufigste unerwünschte Komplikation beim Einsatz von Titan-Systemen dar *(Thomas et al. 1999)*.

Titan-Implantate zeichnen sich zwar durch einen hohen Reinheitsgrad aus, es kommt jedoch durch Reibungsvorgänge zur Freisetzung unlöslicher Produkte, die das umliegende Gewebemilieu negativ beeinflussen können (*Black et al. 2005, Hayashi et al. 1999, Yao et al. 1995*).

Beim noch nicht ausgewachsenen Patienten können starre Titanosteosynthesesysteme außerdem zu Wachstumsinterferenzen führen. In einigen Fällen wird eine chronische Entzündung der umliegenden Weichteile (Metallosis) mit lokalen Lymphknotenreaktionen beschrieben (*Thomas et al. 1999*).

Der wesentliche Nachteil der herkömmlichen Rekonstruktionsverfahren via Plattenosteosynthese (Titan bzw. chirurgische Reinmetalle) liegt in der Anschlussbehandlung, da das Synthesematerial nach einem gewissen Zeitraum wieder entfernt werden sollte. Es gibt keine eindeutige Leitline zur Metallentfernung, dennoch muss für jeden Patienten individuell entschieden werden, ob eine Entfernung des Osteosynthesematerials nach ca. 6 Monaten durchgeführt werden muss *(Hausamen et al. 2011, Gerlach 2000)*. Insbesondere bei der Verwendung von winkelstabilen Osteosynthesesystemen wird in der Literatur eine Entfernung empfohlen. Bei Verbleib des Synthesematerials muss der Patient über die Möglichkeit von Folgekomplikationen wie Infektionen, Materialversagen oder das bestehende Refrakturrisiko aufgeklärt werden. Neben den für die Materialentfernung erneut anfallenden Operationskosten, besteht für den Patienten mit jeder zusätzlichen Operation ein erneutes Risiko *(Chaushu et al. 2000).*

Die durch das statistische Bundesamt für das Jahr 2015 veröffentlichten Daten zeigen, dass bei knapp der Hälfte der durchgeführten operativen Maßnahmen Osteosyntheseverfahren zum Einsatz kommen³. Allein im Jahr 2015 waren es in Deutschland mehr als 600.000 Operationen (wobei die Zahlen der Tumorrekonstruktionen dabei nicht eingeschlossen sind). An Platz achtzehn aller im Jahr 2015 in Deutschland durchgeführten Operationen, steht die operative Entfernung von Osteosynthesematerial³. Aus wirtschaftlicher Sicht entsteht durch diese Form der Rekonstruktionsverfahren, neben den Operationskosten, durch Krankenhausaufenthalte und Arbeitsausfälle ein nicht zu unterschätzender Schaden und eine erhebliche Belastung des Gesundheitssystems.

2.2.2 Bioresorbierbare Osteosynthesesysteme

Aufgrund der nachweislich bestehenden Problematik, die sich beim Einsatz von herkömmlichem Osteosynthesematerial ergibt, wird derzeit intensiv an der Entwicklung und Einführung alternativer medizinischer Verfahren gearbeitet. Aktuell sind daher

³ Statistisches Bundesamt (2015)

bioresorbierbare Materialien Gegenstand zahlreicher Studien. Wegen ihrer vielversprechenden biomechanischen Eigenschaften wird die Biokompatibilität für klinische Anwendungen, wie vaskuläre Stents, orthopädische und mund-kiefer-gesichtschirurgische Implantate, untersucht. In der Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie können durch den Einsatz biologisch abbaubarer Implantate, beispielsweise bei Patienten mit Knochenbrüchen, erneute Operationen zur Implantatentfernung vermieden werden (Hollinger u. Battistone 1986; Hofmann et. al 1992).

Übergeordnetes Ziel der Forschung in diesem Bereich ist es, einen Knochenersatz aus rein resorbierbaren Materialien zu finden, der durch eine gleichmäßige Auflösung dem Knochen zur Selbstheilung verhilft und sich im Rahmen dieses Vorgangs selbst degradiert. Die Versorgung von Brüchen mit einem selbstauflösenden Material soll in erster Linie das Risiko eines zweiten Eingriffs für den Patienten reduzieren. Gleichzeitig können so aber auch zusätzliche Belastungen für das Gesundheitssystem verringert werden. Des Weiteren sollte das selbstauflösende Material idealer Weise den primären Knochenheilungsprozess durch Knochenstabilisierung fördern und simultan die Knochenneubildung induzieren.

Infrage kommende Materialien müssen über gewisse Grundcharaktereigenschaften verfügen, d.h. wesentliche Bedingungen erfüllen. Hierzu zählt unter anderem die Biokompatibilität, die antitoxische/antilytische Wirkweise im Rahmen der Degradation und die Fähigkeit zur positiven Beeinflussung der Osteosynthese.

2.2.2.1 PLA-Systeme

Derzeit werden hauptsächlich biokompatible, auf Polylactide (PLA) basierende, bioresorbierbare Osteosynthesesysteme angewandt. Polylactide werden auch Polymilchsäuren genannt. Sie sind aus vielen, chemisch aneinander gebundenen Milchsäuremolekülen (Polymeren) aufgebaut. Die Materialeigenschaften der Polylactid-Osteosynthesesysteme hängen vor allem von der Molekülmasse, dem Kristallinitätsgrad und vom Anteil an Co-Polymeren ab. Eine Veränderung der Zusammensetzung der einzelnen Bestandteile führt zur Veränderung der mechanischen Eigenschaften des Materials. Auf dem Markt sind eine Vielzahl verschiedener, resorbierbarer, polymerbasierter PLA-Systemen mit unterschiedlichen mechanischen Eigenschaften erhältlich. Modernere nicht kristalline PLA-Systeme, der zweiten Generation, werden in vielen Bereichen der Medizin, vor allem bei der Versorgung von pädiatrischen Frakturen z.B. in der Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie eingesetzt (*Landes et al. 2006a*). PLA-Systeme gelten als zugelassene und gut etablierte Osteosyntheseverfahren (*Guzman et al. 2011, Hayden et al. 2013*).

Durch Wärme wird der PLA-Kunststoff verformbar. Daher können PLA-Implantate intraoperativ im warmen Wasserbad individuell angepasst werden. Durch die limitierte Belastbarkeit und Stabilität der PLA-Systeme ist ihre Anwendbarkeit begrenzt. PLA-Systeme können daher nicht im Bereich hoher krafttragender Knochenabschnitte angewendet werden. PLA-Systeme mit höherer Stabilität, die sich über einen geringeren Anteil an Co-polymerisiertem PLA auszeichnen, zeigen dagegen einen deutlich protrahierten Degradationsprozess (Bergsma et al. 1995a). Im Rahmen der klinischen Anwendung von PLA-basierenden Osteosynthesesystemen werden zudem vermehrt negative Gewebereaktionen, subkutane Schwellungen und Entzündungen, sowie die Akkumulation von Abbauprodukten, wie z.B. kristalline-Ablagerungen beobachtet (Bergsma et al. 1995b; Landes et al. 2006b). Der Degradationsprozess kann mehrere Jahre dauern (Suuronen et al. 1998). Häufig verweilt das Material daher jahrelang im Körper. Im Zusammenhang mit PLA-Systemen konnten zudem inflammatorische Reaktionen sowie eine Induktion pro-inflammatorischer Zytokine nachgewiesen werden (Caires et al. 2016). Aufgrund dieser Nachteile besteht die Notwendigkeit, alternative bioresorbierbare Materialien mit verbesserter Festigkeit und Biokompatibilität für die Knochenfixierung zu entwickeln (Schumann et al. 2013).

2.2.2.2 Magnesium als innovativer Implantatwerkstoff

Es ist rund 200 Jahre her, als zum ersten Mal metallisches Magnesium hergestellt wurde (*Witte 2015*). Die erste klinische Anwendung von metallischem Magnesium wurde 1878 durch den Arzt Edward C. Huse publiziert (*Huse 1878*). Dieser verwendete erstmals Magnesiumdrähte als Ligatur für Blutgefäße. Seit der ersten Verwendung von Magnesiumimplantaten für die Osteosynthese (*Lambotte 1932, Verbrugge 1934*) war die Entwicklung neuer Legierungen mit niedrigeren Verunreinigungen, höherer Biokompatibilität und höherer Korrosionsbeständigkeit ein wichtiger Fortschritt in der Forschung mit diesem metallischen, resorbierbaren Material.

Vor ca. 10 Jahren wurde Magnesium als Implantatmaterial wiederentdeckt, und die ersten Magnesium-Herzstents und orthopädischen Schrauben in klinischen Studien getestet (Zartner et al. 2005, Windhagen et al. 2013, Ding 2016a). Um den Einsatz der biologisch abbaubaren Metalle voranzutreiben wird derzeit intensiv daran geforscht biodegradierbare Magnesium-Implantate für den klinischen Gebrauch anwendbar zumachen (Witte 2015).

In hochstabilen Osteosynthesesystemen, mit hohem Elastizitätsmodul (z.B. Titan, chirurgische Stähle), führen Makrobewegungen im Bereich der Fraktur zu Scherund Reibungsvorgängen, die im weiteren Verlauf eine schlechte Frakturheilung zu Folge haben. Zusätzlich können chronische Gewebeirritationen zur Überstimulierung des Knochenwachstums mit Kallusbildung führen (*Arens u. Martin, 1998*). Aufgrund des knochenähnlichen Elastizitätsmoduls von Magnesium, kommt es hier nicht zu einer chronischen Traumatisierung der Knochenstrukturen. Eine schlechte Frakturheilung und die Gefahr sekundärer Wundinfektionen können so vermieden werden (*Saris et al. 2000, Gerlach 2000, Jorgenson et al., 1997, Payne et al. 2014, Edwards et al. 2001*).

Biologisch abbaubares Magnesium (Mg) ist eine natürliche Komponente des menschlichen Organismus und zeichnet sich durch ein, mit gesundem Knochengewebe vergleichbaren, Elastizitätsmodul aus *(Hausamen et al. 2011).* Die physikalischen und mechanischen Eigenschaften des Magnesiums sind denen der menschlichen Knochenstatik also sehr ähnlich. Mit einer Dichte von 1,74 g/cm³ und einem Elastizitätsmodul von 45 GP liegt die physikalische Eigenschaft von Magnesium deutlich näher an dem von natürlichem Knochen (6-25 GP) als die von Titan (105 GP, D 4,50 g/cm³) oder Stahl (104 -106 GP) *(Jacobi-Gresser 2011, Staiger et al. 2006).* Als köpereigener Soff wird Magnesium vom Körper toleriert und indiziert keine Abwehrreaktionen *(Han et al. 2012, Witte et al. 2008, Krause et al. 2012).*

Magnesium ist zudem ein wichtiger Protagonist des Knochenmetabolismus - "important Tracy-Element" (*Kanzaki et al. 2001*). In verschiedenen Studien, bei denen der Einfluss einer erhöhten Magnesiumkonzentration auf die Knochenformation untersucht wurde, konnte zudem gezeigt werden, dass Magnesium einen entscheidenden Einfluss auf nahezu alle Stadien des Knochenstoffwechsels hat (*Landi et* al. 2008, He et al. 2013). Als Resultat konnte eine erhöhte Osteoblastenaktivität, sowie eine gesteigerte Zellmigration gezeigt werden (He et al. 2016, Hong et al. 2013, Weng et al. 2011). In der Arbeit von Abed u. Moreau et al. 2007 konnte eine verminderte Knochenformation und -mineralisation bei Abwesenheit von Magnesium nachgewiesen werden. Additive günstige Vorteile des Magnesiums sind eine antibakterielle-, ostoconduktive- sowie osteoinduktive Wirkung (Hong et al. 2013, Weng et al. 2011, Yang et al. 2013, Robinson et al. 2010). Zudem konnte eine antibakterielle Wirkung, ähnlich der Wirkweise etablierter Antibiotika, dokumentiert werden.

Magnesium erfüllt somit, aufgrund seiner Resorbierbarkeit, seiner uneingeschränkten Biokompatibilität und der knochenähnlichen Festigkeit, theoretisch alle Voraussetzungen für einen geeigneten Implantatwerkstoff *(Staiger et al. 2006, Payne et al. 2014)*. Trotzdem ist es bislang nicht gelungen, Magnesium als Knochenersatz bzw. Osteosynthesesystem zu etablieren.

Der größte Nachteil von unbehandeltem, unbeschichtetem Magnesium sowie den meisten bisher bekannten Legierungen, besteht in dem vorzeitigen, ungehemmten Korrosionsvorgang in wässriger Umgebung, unter einer massiven Hydrogen H2-Gasentwicklung (Staiger et al. 2006, Hornberger et al. 2012, Xin et al. 2008), unter gleichzeitiger Alkalisierung des umgebenden Gewebes und der Bildung von Calciumphosphat (Rettig und Virtanen 2009, Han et al. 2012). Daher müssen magnesiumbasierte Stoffe für die klinische Anwendung strenge Tests durchlaufen. Im Rahmen von In-vitro- und In-vivo-Tests muss die Biokompatibilität nachgewiesen und die Zytotoxizität ausgeschlossen werden. Die Tendenz von Magnesium zur Korrosionsreaktion, wird durch verschiedene Faktoren begünstigt. Beeinflussende Größen sind unter anderem das, das Implantat umgebende Milieu, der PH-Wert, die Bikarbonat-Konzentration sowie die Albumin-Konzentration (Fischer et al. 2010, Ng et al. 2010, Song u. Atrens 2003, Xin et al. 2011a, Xin et al. 2011b). In der Studie von Guo et al. (2016) wurden gezielt die biologischen Einflüsse und Effekte von Magnesium-Mikropartikeln (MgMP) auf Zellen, im Vergleich zu Titan, in vitro und in vivo untersucht. Das Ergebnis der Studie zeigt, dass Magnesium zwar einen, durch das bei der Degradation entstehende Wasserstoffgas, größeren toxischen Effekt auf Makrophagen und Zellen hat, allerdings entwickelten sich im Vergleich zu der

Titankontrollgruppe eine geringere Menge Zytokine (IL-1, IL-6, und TNF). Zusätzlich konnte nachgewiesen werden, dass Magnesium die Knochenregeneration fördert, ohne eine Entzündungsreaktion zu induzieren. Insgesamt konnten in dieser Studie keine negativen Effekte des Magnesiums festgestellt werden.

3 Das Forschungsprojekt

3.1 Ziel des Gesamtprojekts BIOMAGIK

Aus den bereits dargelegten Vorteilen, die man sich aus der Verwendung degradierbarer Magnesiumstoffe - als Knochenersatzmaterial - erhofft, liegt der Fokus des Gesamtprojekts "BIOMAGIK" darin die Magnesiumeigenschaften hinsichtlich ihrer Eignung für die Fertigung eines degradierbaren Biomaterials und ihrer Biokompatibilität zu bestimmen. Zielsetzung des Projekts ist die Entwicklung resorbierbarer, biokompatibler Magnesium-Implantate für den Einsatz in der Mund-Kiefer- und Gesichtschirurgie, sowie die Übertragbarkeit der Vorgehensweise auf andere Implantatsysteme für den Einsatz in der Operativ-Chirurgischen-Medizin. Zur Gewinnung relevanter Aussagen bezüglich der Belastbarkeit, Biokompatibilität und des Knocheneinwachstums, wurde zunächst im Rahmen eines Vorversuchs, eine Invitro-Testung durchgeführt. Relevante Erkenntnisse und Ergebnisse aus dem Invitro-Versuch bzgl. der Implantatbeschichtung, wurden bei der Planung und beim Aufbau des In-vivo-Versuchs berücksichtigt.

Die vorliegende Arbeit umfasst die komplette Durchführung des In-Vivo-Versuchs, von der Implantation der Probekörper, die in vivo Untersuchungen über den gesamten Beobachtungszeitraum, bis hin zur Planung und Durchführung der postmortem Untersuchungen.

Im zentralen Fokus der Forschung und der späteren Auswertung der In-vivo-Studie stehen die Knochenheilung und das Knochenwachstum. Als Nebenzielgrößen sind die Entwicklung der Wasserstoffgase, sowie die Degradationsprozesse der Magnesium-Implantatkörper zu sehen. Auf Basis der aus der Studie gewonnen Erkenntnisse soll in der klinischen Anwendung die Erstellung individueller, auf den Patienten abgestimmter, Implantate möglich werden.

3.2 Vorarbeit und Planung

Der gesamte Aufbau des In-vivo-Versuchs ist an gängigen, publizierten aktuellen Methoden und Verfahren orientiert. Dazu wurden zunächst ausführliche Literaturrecherchen nach Schlagwortsuche mit allen relevanten Suchbegriffen (wie nach "biodegradable", "Magnesium", "Implant" etc.) in PubMed⁴ durchgeführt. Die Abstracts der resultierenden Publikationen wurden gesichtet und sämtliche Publikationen zu In-vivo-Versuchen mit Magnesium-Implantaten weiter ausgewertet. Um einen Überblick über die gängigsten Versuchsdesigns und Methoden zu erhalten, wurden der Versuchsaufbau (Art und Anzahl der Versuchstiere, Euthanisierungszeitpunkte), die Implantateigenschaften (Material, Dimensionen), die Implantationsstellen sowie die verwendeten analytischen Methoden in einer Tabelle⁵ gegenübergestellt.

Auf Basis der Literaturrecherche wurden Implantate in unterschiedlichen Kanalgrößen im Submillimeterbereich (0,4/0,6/0,8 mm) gewählt, da für Kanäle ähnlicher Dimension osteoinduktive Effekte gezeigt werden konnten *(Bobyn et al. 1999, Fukuda et al. 2011)*.

3.3 Unerlässlichkeit des Tierversuchs

Die Degradation und Resorption von Magnesium-Implantaten ist ein komplexes Geschehen, dessen Einzelschritte in der Gesamtheit nicht in vitro nachgeahmt werden können (Martinez Sanchez 2015). Die Studien von Walker et al. (2012) und Shadanbaz u. Dias (2012) zeigen, dass es bislang unmöglich ist, die In-vivo-Situation der Magnesium-Degradation akkurat nachzuahmen. Ebenso konnte die Studie von Guo et al. (2016) deutliche Abweichungen bezüglich der Ergebnisse aus den In-vitro- zu den In-vivo-Magnesiumversuchen aufzeigen (Razavi et al. 2015, Landes et al. 2006c). Tierversuche sind somit unerlässlich, um wissenschaftlich nachvollziehbare

⁴ Meta-Datenbank mit medizinischen Artikeln/Publikationen f
ür Ärzte, Wissenschaftler etc. (URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/)

⁵ Vgl. Anhang Kapitel 9.1

und belastbare Aussagen über die Biokompatibilität, Degradation und das Einwachsverhalten des Implantatdesigns in vivo und damit über die generelle Realisierbarkeit des Konzeptes in der klinischen Anwendung zu erhalten. Die Implantate mussten dazu im Tiermodell unter standardisierten Bedingungen getestet werden.

Für die In-vivo-Testung von bioresorbierbaren Osteosynthesematerialien hat sich, vor allem für Dentalimplantate, die Implantation in die Femora von Kaninchen als geeignet erwiesen und etabliert (*Meredith et al. 1997, Scarano et al. 2003, Ragamouni et al. 2013, Lake et al. 2013, Razavi et al. 2014, Chaya et al. 2015).* Durch die dort gegebene mechanische Belastung und die herrschenden Traktions-kräfte können die Implantate unter ähnlichen Kräfte- und Belastungsverhältnissen, wie den im Kiefer gegebenen, getestet werden.

3.4 Projekt- und Versuchsaufbau

3.4.1 Zeitraum

Basierend auf aktuellen Literaturdaten wurde, zur Untersuchung der Degradation der Magnesium-Implantate, ein Versuchszeitraum von sechs bis zwölf Monaten als besonders geeignet angesehen.

Um eine Aussage bezüglich der primären Stabilität der Implantate und des zeitlichen Verlaufs des Degradationsprozesses machen zu können, wurde jeweils die Hälfte der Tiere nach sechs Monaten euthanasiert. Der zweite Euthanasierungszeitpunkt der verbliebenen 30 Versuchstiere nach zwölf Monaten wurde gewählt, um eine Langzeitaussage über die Osteointegration und den weiteren Implantatabbau machen zu können (Dziuba et al. 2013, Chen et al. 2011, Erdmann et al. 2011).



Die Projektskizze in Abb. 1 zeigt die zeitliche Planung des Projektverlaufs:

3.4.2 Versuchstiere

Als geeignetes Versuchstier für die Studie wurden sechs Monate alte weibliche, im Schnitt zwei bis drei Kilogramm schwere, New Zealand White Rabbits (NZW) gewählt. Um eine statistisch relevante Aussage machen zu können, wurden die Implantate an sechzig Versuchstieren untersucht. Diese wurden auf zwei Versuchsgruppen zu je dreißig Tieren verteilt.

Den Versuchstieren der Implantatgruppen 1, 2 und 3 wurden Magnesium-Probekörper implantiert. Bei den Gruppen 4, 5 und 6 handelt es sich um Kontrollgruppen, denen Kontrollkörper aus nicht degradierbarem Titan implantiert wurden. Aus jeder Implantatgruppe sollten je 10 Tiere (inkl. 1 Tier der Titan-Kontrollgruppe) nach sechs Monaten und 10 Tiere (inkl. 1 Tier der Titan-Kontrollgruppe) nach zwölf Monaten euthanasiert werden. Die Zuteilung der Versuchstiere zu den einzelnen Gruppen und Kanalvarianten erfolgte nach dem Zufallsprinzip. Tabelle 1 zeigt die gewählten Versuchsgruppen.

Implantatgruppe	1	2	3	4	5	6
Implantat	Mg	Mg	Mg	Ti	Ti	Ti
Kanalvariante (mm)	0,4	0,6	0,8	0,4	0,6	0,8
VG1: # Tiere 6-Monatsgruppe	9	9	9	1	1	1
VG2: # Tiere 12-Monatsgruppe	9	9	9	1	1	1

Tab. 1: Übersicht zu den Implantat-/Versuchsgruppen

Operationsgruppen

Die Tiere wurden zu zwei Zeitpunkten operiert. Die Operation der ersten 30 Tiere fand im Januar 2015 und die der zweiten 30 Tiere im Juni 2015 statt. Eine detaillierte Übersicht über die Gruppen und welche Tiere zu welchem Zeitpunkt operiert wurden sind dem Anhang⁶ zu entnehmen. Die Zuordnung zu den Operationsgruppen erfolgte randomisiert und doppelblind.

4 Material

4.1 Innovatives Implantatdesign

Für das biomechanische Verhalten von Osteosynthesesystemen ist, neben dem eingesetzten Synthesematerial, der Aufbau des Implantats von besonderer Bedeutung. So kann es beispielsweise im Inneren größerer Implantate zu einer Minderversorgung (durch Minderperfusion und Diffusion von Nährstoffen) kommen, was ein vermehrtes Zellsterben, der an das Implantat grenzenden Zellen, zur Folge hat (*Xin et al. 2008*).

In Studien hat sich häufiger gezeigt, dass es im Bereich guter Nährstoffversorgung um das Implantat, innerhalb weniger Wochen zur Knochenneubildung kommt. Wohingegen innerhalb der Implantate, vor allem bei Implantaten größeren Ausmaßes mit grenzwertiger Versorgung, die Ossifikation verzögert einsetzt *(Xin et al. 2008).* In Bereichen guter Nährstoffversorgung ist auch eine gute Zellmigration für Osteoblasten und Osteozyten gewährleistet. Entscheidende Faktoren zur primären voll-

⁶ Vgl. Anhang Kapitel 9.2

ständigen Knochenregeneration sind stark von der Implantat-Knochen-Interaktionsfläche abhängig (Yang et al 2012, Castellani et al. 2011). Entscheidend ist zudem die Topographie, sowie die biochemische Beschaffenheit der Implantat-Interaktionsfläche (Yazdimamaghani et al. 2016).

Eine knochenähnliche Oberflächenbeschaffenheit des Implantats ermöglicht eine gute Interaktion von Knochen mit dem Implantat und ist für eine optimale Integration des Implantats in den Knochendefekt notwendig. Über eine günstige Oberflächenbeschaffenheit kann so die Zellmigration und Osseointegration entscheidend beeinflusst werden. Die Voraussetzung für eine gelungene Implantation ist, dass sich der Knochen und das Implantat stabil miteinander verbinden. Durch den in den Knochen eingebrachten Fremdkörper bildet der Organismus ein einfassendes Knochenlager um das Implantat. Dieser Prozess wird als Osseointegration bezeichnet.

Auf Basis der aktuellen wissenschaftlichen Erkenntnisse, wurde in enger Zusammenarbeit der wissenschaftlichen Abteilung der Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf (UKE) und der Firma Meotec GmbH & CO. KG⁷, ein neuartiges Implantatkonzept entworfen, das im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurde. Durch das, speziell für die Studie entwickelte, Implantatdesign wurden eine gute Integration des Implantats in das umliegende Knochengewebe erwartet.

Das innovative Implantatdesign sollte eine optimale Zellversorgung im Bereich der Implantat-Knochen-Grenze gewährleisten, um so das Risiko für vermehrtes Zellsterben in größeren Implantaten zu verringern und damit die Grundlage für eine vollständige Ausheilung und Remineralisierung von Knochendefekten zu erreichen. Der Knochen-Implantat-Kontakt stellt, vor allem in Bezug auf das Refrakturrisiko, einen relevanten Faktor dar (*Arens u. Martin, 1998*). Zudem soll die biochemische Aktivität während des Knochenheilungsprozess durch signifikante Vergrößerung der Oberfläche gesteigert werden.

⁷ Die Firma Meotec GmbH & Co. KG ist ein innovatives Forschungsunternehmen aus Aachen (http://www.meotec.eu/home/).

4.1.1 Makrostruktur des Implantats



Abb. 2: Makrostrukturierung der Implantatkörper und Vision einer individuellen CAD/CAM basierten Rekonstruktionsplatte⁸

Für die, in diesem In-vivo-Versuch verwendeten Magnesium-Implantatkörper, wurde der Grundwerkstoff W43 gewählt, ein Kombinationswerkstoff, der sich aus verschiedenen Elementen (Magnesium, Seltene Erden, Verunreinigungen (0,038%) zusammensetzt.

Die für das Implantatdesign gewählte Makrostruktur ist dem anatomisch, histologischen Knochenaufbau nachempfunden (vgl. Abb.2) und ähnelt in ihrer netz-, gitterartigen Struktur stark, der aus Trabekeln und Kanaliculi bestehenden, Knochenarchitektur. Die gitterartige Struktur des Implantatdesigns vergrößert die Implantatoberflächenstruktur und soll dadurch eine bessere Nährstoffversorgung innerhalb des Implantats gewährleisten, sowie die Zellmigration und damit die Osteoinduktion und Knochenneubildung stimulieren. Durch die Makrostrukturierung der Implantate sollen Osteonekrosen durch Gefäßeinsprossung vermieden und der Degradationsvorgang des Implantats erleichtert werden. Ziel ist es die Masse des massiven Implantatkörpers auf ein Minimum zu reduzieren und dabei die Oberfläche für die nachfolgende Beschichtung zu vergrößern, ohne jedoch die mechanische Festigkeit und Stabilität der Magnesium-Implantate zu verlieren (*Xin et al. 2008*).

Um die gewünschte Struktur des Implantats herstellen zu können, wird zunächst eine vorstrukturierte Elektrode mittels Funkenerosion (EDM) in drei verschiedene Ebenen des Magnesiumgrundkörpers gesenkt. Die funkenerosive Bearbeitung bietet die notwendige Flexibilität hinsichtlich der Kanalgeometrie und ermöglicht die gewünschte Makrostruktur.

⁸Quelle: Das dritte und vierte Bild entstammt dem Projektdesign BIOMAGIK (2011), S. 4, Bild 3

Für eine geeignete Makrostruktur der Implantate wurden, wie bereits dargelegt, verschiedene Kanalstrukturen im Submillimeterbereich gewählt, da für Kanäle in ähnlichen Dimensionen osteoinduktive Effekte gezeigt wurden *(Bobyn et al.1999, Fukuda et al. 2011)*. Im Verlauf der Auswertung der In-vivo-Studie sollte untersucht werden, ob es Unterschiede zwischen den Kanalvarianten, bezüglich des Knocheneinwachstums gibt und welche Kanalgröße ein optimales Einwachsverhalten zeigt.

Für die In-vivo-Testung wurden durch das Forschungsunternehmen drei Kanalvarianten unterschiedlicher Porosität bereitgestellt (Abb. 3). Bei der Porosität handelt es sich um eine Messgröße, die das Verhältnis von Hohlraum- zu Gesamtvolumen eines Stoffes beschreibt. Die Porosität hat entscheidenden Einfluss auf die Dichte eines Stoffes. Bei den verwendeten Implantaten wurde durch das Einbringen von Kanälen eine künstliche Porosität erzeugt.



Abb. 3: Schematische Darstellung der Kanalvarianten des Magnesium-Implantatkörpers

4.1.2 Mikrostruktur des Implantats

Die Funktion der Mikrostruktur besteht darin, die primäre Implantatstabilität zu garantieren und die vorzeitige Korrosion zu verhindern, ohne dabei chronisch traumatischen Knochenabrieb zu induzieren. Der Degradationsprozess, der im Zusammenhang mit der kritischen Gasentwicklung steht, soll verzögert werden und das Gas in physiologisch vertretbaren, verträglichen Dosen freisetzen (Xue et al. 2011, Schaller et al. 2016, Marukawa et al. 2016).

Der Ansatz der Mikrostrukturierung zielt auf die Oberflächenbeschaffenheit des Implantats, sowie deren Optimierung ab. Die Bedeutung der Implantatoberfläche wurde in verschiedenen Studien untersucht. So fördert beispielsweise eine raue Oberfläche die Adhäsion und Migration von Osteoblasten und führt zu einem guten Knocheneinwachstum, sowie zu einer guten Einbettung der Systeme in das umliegende Gewebe (Fischer et al. 2015, Tian et al. 2014, Kieswetter et al. 1996). Durch die Mikrostrukturierung der Oberfläche entsteht eine korrosions- und verschließfeste Schicht, deren Parameter so variiert werden können, dass es zu einer Reduktion der negativen Umgebungsreaktionen kommt. Dies ermöglicht eine optimale Integration des Materials in das umliegende Gewebe sowie das Einwachsen von gesundem Knochengewebe. Hierzu wurde die freie Magnesiumoberfläche des Implantats durch ein neuartiges Konversionsverfahren keramisiert. Durch die Keramisierung entsteht eine schützende Schicht, die das Magnesium daran hindert sich im feuchten Milieu des Körpers vorzeitig zu zersetzten. Durch gezielte Schichtkorrosion der keramisierten Implantatoberfläche werden sogenannte Fehlstellen, d.h. Bereiche mit geringerer Beschichtung, erzeugt. Auf diese Weise kann die Resorption des Grundmaterials gesteuert werden, da über die individuelle Wahl der Schichtparameter das Auflösungsverhalten des beschichteten Magnesium-Vollmaterials kontrolliert werden kann. Angestrebt wird ein verträgliches, stufenweises Degradationsverhalten der Magnesium-Implantate, welches sich in zwei Phasen gliedert.

4.2 Phasenverlauf der Degradation

Der ersten Phase, in der die Stabilität durch das Implantat gewährleistet ist, folgt die zweite Phase, in der die Stabilität von dem in der ersten Phase neugebildeten Knochen übernommen wird (Abb. 4, Punkt A). Wie in Abbildung 4 skizziert, sollte das Magnesiumimplantat im gleichen Maße degradieren, wie Knochen entsteht.



Abb. 4: Erwarteter Degradationsverlauf (schematisierte Darstellung)9

In herkömmlichen Systemen ist das Massenverhältnis von Grundmaterial gegenüber der äußeren Beschichtung zu groß, dadurch wird nur der anfängliche Anstieg der Resorptionsrate begrenzt. Danach kommt es zu einer beschleunigten Korrosion und einem frühzeitigen Materialversagen, d.h. die Degradationsphase (vgl. Phase II in Abb. 4) wird vorgezogen, wodurch sich die Phase der Primärstabilität (vgl. Phase I in Abb. 4) verkürzt. Um eine optimale Massendifferenz zwischen äußerer Oberfläche und innerem massiven Körper zu erhalten erschien es daher sinnvoll die oben beschriebene Makrostrukturierung mit einer geeigneten Mikrostrukturierung zu kombinieren. Das Ergebnis ist eine Fusion aus spezifischen Makro -und Mikrostrukturierungen, die an den zwei kritischsten Interaktionspunkten, den Knochen-Implantat-Grenzen, die unerwünschten Reaktionen des Magnesiums vermindern sollen.

Durch das Einbringen der Kanäle mittels Funkenerosion in alle Achsenrichtungen, lässt sich die Implantatoberfläche signifikant vergrößern. Die Vergrößerung der Oberfläche ermöglicht eine bessere Beschichtung der Implantate. Diese Beschichtung schützt in der primären Heilungsphase vor dem vorzeitigen Abbau des Implantats. Bis zur vollständigen Ausheilung löst sich diese Schicht vollständig auf und es kommt zum stufenweisen Abbau des Implantatkörpers. Es verbleiben lediglich kleine Inseln des Grundwerkstoffes, die durch den neugebildeten Knochen gestützt

⁹ In Anlehnung an Projektdesign BIOMAGIK (2011), S. 3, Bild 2

werden und trotz erhöhter Resorption zu keinem nennenswerten Anstieg der Auflösungsrate führen (Siebers 1994, Nöthe 2001).

5 Methoden

5.1 Implantation der Probekörper

Die Implantation der Probekörper wurde unter standardisierten Bedingungen, gemäß eines zuvor erstellten OP-Protokolls, von einem festgelegten Operationsteam durchgeführt. Zur Identifizierung der Kaninchen, verfügte jedes Kaninchen über eine in das Ohr tätowierte Nummer und zusätzlich einen subkutan applizierten Chip.

Nach einer Vorlaufzeit von 4 Wochen, in denen sich die Tiere an ihre neue Unterbringung und die Tierhaltung im UKE gewöhnen konnten, wurde der In-vivo-Versuch gemäß den FELASA-Empfehlungen (*Guillen 2012*) und nach dem deutschen Tierschutzgesetz durchgeführt (*Schmitz u. Hollinger 1986*).

5.1.1 Durchführung der Operation

Die Durchführung der Operation erfolgte gemäß folgendem Protokoll:

Für die Narkose erfolgte eine anticholinerge Prämedikation mit 0,1 mg/kg Atropin (Atropinum sulfuricum®, Eifelfango, Bad Neuenahr-Ahrweiler) und eine Sedierung mit 6 mg/kg Xylazin (Rompun®, Bayer, Leverkusen). Die Narkosemittel wurden für jedes Tier gewichtsadaptiert dosiert. Die Injektionsnarkose wurde durch eine i.m. Gabe von 60 mg/kg Ketamin (Ursotamin®, Serumwerk, Bernburg) in den M. semitendinosus / M. semimembranosus erreicht. Im Bedarfsfall erfolgte zur Aufrechterhaltung der Narkose eine Nachdosierung mit Ketamin. Eine zusätzliche Lokalanästhesie an der Präparationsstelle wurde mit Scandicain 1% vorgenommen.

Im Rahmen der Vorbereitung auf die Operation wurden die Kaninchen im Bereich der Präparationsstelle am jeweils rechten bzw. linken Femur proximal des Knies (Genu articularis) maschinell rasiert. Anschließend wurde eine Hautdesinfektion mit Cutasept®F durchgeführt. Um die Kaninchen nicht unnötigem Stress auszusetzen, wurden die Tiere vor der Vorbereitung des OP-Feldes, sprich vor der Rasur und der Hautdesinfektion, bereits sediert.

Nach der Gabe von Enrofloxacin 10 mg/kg KG s.c. zur intraoperativen antibiotischen Abdeckung (single shot), wurde ein Hautschnitt gesetzt. Um die lokale Blutung möglichst gering zu halten und zudem die intra- und postoperativen Schmerzspitzen zu reduzieren, wurde ein Lokalanästhetikum an der Präparationsstelle mit Ultracain 1% appliziert.

Der Zugang erfolgte durch eine ca. 3 cm lange Hautinzision mit Cutfix-Einmalskalpell (B. Braun) über den distalen Oberschenkel. Zunächst erfolgte die Durchtrennung der Cutis und Subcutis sowie die Freilegung des Femurs. Nach stumpfer Freipräparation einer 1 x 1 cm großen Knochenfläche, sowie kontrollierter Blutstillung wurde, unter konstanter Kühlung mit physiologischer Kochsalzlösung (NaCl 0,9%), mit einem Implantatbohrer im Bereich des distalen Femurs, knapp oberhalb des Kniegelenks, eine Bohrung mit einem Durchmesser von 4 mm gesetzt. Die Implantatbohrung, erfolgte durch schrittweise Vergrößerung des Bohraufsatzes bis zum Erreichen der Zielgröße von 4,4 mm monokortikal. Auf diese Weise wurde ein standardisierter und reproduzierbarer Defekt geschaffen. In diesen Defekt wurde dann der zylindrische Probekörper implantiert. Der zylindrische Probekörper wurde dabei möglichst ohne vorherige Manipulation am Probekörper eingebracht. Es wurde darauf geachtet, den Eingriff möglichst minimalinvasiv durchzuführen. Abbildung 5 zeigt exemplarisch die Implantation von Probekörpern der unterschiedlichen Kanalvarianten.



Abb. 5: Implantation von Probekörpern mit unterschiedlichen Kanalgrößen

Aufgrund des noch weitestgehend unbekannten Plasmaanodisationsverfahren im Bereich der Implantatherstellung bestand Unsicherheit, in wie weit die, per Plasmaanodisation hergestellte Oberflächenbeschichtung, die sogenannte Mikrostruktur der Implantatkörper, manipulationsstabil ist. Daher wurde die Anzahl der Manipulationen, d.h. die Kontakte mit dem Implantatkörper, z.B. mit der Pinzette oder Gewebe bei der Einbringung, erfasst. Neben der Anzahl, der Vor- und Nachbohrungen, wurde die Zahl der Einsetzversuche des Probekörpers gezählt, um mögliche Beschädigungen oder vorzeitige Degradierungsvorgänge des Probekörpers im Verlauf nachvollziehen zu können.

Abbildung 6 zeigt die Position der Implantate an einer computertomographischen (CT) Aufnahme des Femurs eines toten New Zealand White Rabbit, dem in einem Vorversuch ein Probekörper implantiert wurde.



Abb. 6: Position der Implantate (CT-Aufnahme von ventral, Visualisierung mittels InVesalius3.0¹⁰)

Der Wundverschluss (Muskel, Subcutis, Haut) erfolgte schichtweise. Die Hautnaht wurde mit resorbierbarem, monofilem Faden (Vicryl 3-0, Ethicon®) vorgenommen. Die Einlage einer Drainage war nicht erforderlich. Zuletzt wurde ein Druckverband angelegt, der für die Dauer von 2 Stunden belassen und danach wieder entfernt wurde. Zusätzlich erhielten die Tiere einen Kragen als Leckschutz. Dieser wurde für die Dauer von 7-10 Tagen, bis zum Tag des Fadenzugs, getragen. In dieser Zeit wurden die Kaninchen nicht auf Stroh, sondern auf Stofftüchern gehalten, um die Wundheilung nicht negativ zu beeinflussen. Postoperativ wurden alle Tiere täglich klinisch kontrolliert. Weiterhin erfolgte erstmalig postoperativ und danach alle 4 Wochen eine CT-graphische Kontrolle des Femurs zur Beurteilung der Wasserstoffbildung, der Resorption des Prüfkörpers und der Knochenneubildung.

¹⁰ InVesalius ist eine kostenlose medizinische Software zur Visualisierung von CT-Datensätzen.

Nach sechs und nach zwölf Monaten wurden aus jeder Versuchsgruppe jeweils 10 Tiere (1 Tier für die Titankontrolle) euthanasiert, um in einer postmortalen Analyse den entstandenen Knochen und das umliegende Weichgewebe abschließend histologisch analysieren zu können. Die Euthanasierung wurde gemäß folgendem Protokoll durchgeführt: Die Narkoseeinleitung erfolgte mit Propofol (10mg/kg KG) intravenös über die Ohrvene. Die anschließende Euthanasierung wurde mit Pentobarbital (120mg/kg KG) über denselben Zugang vorgenommen. Dieses Verfahren zur Euthanasierung wurde als die Schonendste angesehen, da sie in tiefer Narkose erfolgt und somit die Stressbelastung der Tiere minimiert.

5.2 In-vivo-Untersuchungen

5.2.1 Klinische Verlaufskontrolle

Neben der apparativen Diagnostik, wurde durch die Tierärzte und Tierpfleger die tägliche Beobachtung und Kontrolle der Wundheilung sowie des klinischen Gesamtzustands, über den gesamten Versuchszeitraum, durchgeführt.

5.2.2 CT-Bildgebung

Ziel der dreidimensionalen in vivo computertomographischen Bildgebung (Healthcare CT Scanner, Modell: Philips Brilliance 16) war die Darstellung, Überwachung und der Nachweis der Wasserstoffgasbildung, die bei dem Zerfall des Magnesiums entsteht sowie die Beurteilung der ablaufenden Degradationsprozesse.

Die Computertomographie (CT) ist ein radiologisches Verfahren, mit dem Schichtaufnahmen erzeugt werden können. Mit Hilfe der Computertomographie lassen sich Organ- und Gewebestrukturen überlappungsfrei zweidimensional abbilden. Die Summe der zweidimensionalen Schnittbildaufnahmen ergeben die zusätzliche Information für die dritte Dimension (3D), die mittels moderner Computerverfahren zur Darstellung gebracht werden kann. Die 3D-Visualisierung von Strukturen stellt ein Werkzeug in der diagnostischen Medizin dar, das vor allem in der Darstellung von vaskulären Systemen, z.B. von Herzkranzgefäßen, zur Anwendung kommt *(Zartner et al. 2005, Windhagen et al. 2013).* Die Auswahl der Computertomographie als geeignetes Untersuchungsinstrument für die kontinuierliche Kontrolle und Vermessung der Probekörper, ist in der guten Darstellung von Knochenstrukturen und knochenähnlichen Strukturen bergründet, die die Voraussetzung für eine fehlerfreie und möglichst genaue Auswertung schafft. Ein weiterer Vorteil der Computertomographie ist die kurze Untersuchungszeit von maximal 1-2 Minuten pro Kaninchen (*Reiser et al. 2011*).

Für die CT-Untersuchung wurden die Kaninchen, mittels einer kurzwirksamen Ketamin–Xylazin-Kombination, für die kurze Zeit der Bildaufnahmen sediert, da sich diese Kombination bereits im Rahmen der zuvor durchgeführten Operationen als gut steuerbar und verträglich erwiesen hatte. Für die Narkose erfolgte eine anticholinerge Prämedikation mit 0,1 mg/kg Atropin (Atropinum sulfuricum®, Eifelfango, Bad Neuenahr-Ahrweiler) und eine Sedierung mit 6 mg/kg Xylazin (Rompun®, Bayer, Leverkusen). Die Injektionsnarkose wurde durch eine i.m. Gabe von 60 mg/kg Ketamin (Ursotamin®, Serumwerk, Bernburg) in den M. semitendinosus / M. semimembranosus erreicht. Im Bedarfsfall erfolgte zur Aufrechterhaltung der Narkose eine Nachdosierung mit Ketamin. Die Tiere konnten sich nach der Beendigung der Narkose frei bewegen.

Um eine möglichst präzise Aussage über die Probekörper anhand der CT-Bildgebung machen zu können, mussten die Kaninchen im CT immer genau gleich positioniert werden.

Grauwerte werden im CT über Hounsfield-Einheiten (H-E) angegeben. Die H-E-Werte beschreiben dabei das Ausmaß der Strahlenabsorption durch das Gewebe und sind zudem ein Maß für die Dichte eines Stoffes. Für eine strukturierte, ergebnisorientierte Datenerhebung, wurden zunächst je vier Tiere aus den Implantatgruppen (0,4/0,6/0,8 mm) inklusive des Titan-Kontrolltiers, für die CT-Kontrollen ausgewählt. Hierzu wurden zusammen mit der Tierärztin aus jeder der Implantatgruppen je vier Tiere (3 * Mg + 1 * Titan) aus der 12-Monats-Versuchsgruppe (VG2), im Abstand von 4 Wochen, für die CT-Kontrollen ausgewählt.

Implantatgruppe	1	2	3	4	5	6
Implantat	Mg	Mg	Mg	Ti	Ti	Ti
Kanalvariante (mm)	0,4	0,6	0,8	0,4	0,6	0,8
VG2: Tiere 12-Monatsgruppe	3	3	3	1	1	1

Tab. 2: Übersicht über die CT-Kontrollgruppen (Die Tabelle zeigt die Anzahl Tiere, die pro Kanalvariante untersucht wurden.)

Um Auswirkungen möglicher Manipulationen auf die Probekörper und das damit verbundene Knocheneinwachsverhalten nachvollziehen zu können, wurden in die CT-Gruppen auch Versuchstiere aufgenommen, bei denen es bei der Implantation zu Manipulationen am Probekörper oder mehreren Implantationsversuchen gekommen war.

Nach Rücksprache mit der zuständigen Tierärztin, erfolgte die erste CT-Kontrolle des Femurs direkt postoperativ zur primären Lagekontrolle und um einen möglichst genauen Referenzwert zum Zeitpunkt "0" für die spätere Auswertung der CT-Bilder zu erhalten.

Im direkten Anschluss an die Operation und darauffolgend in vierwöchigen Abständen wurden computertomographisch gestützte Kontrolluntersuchungen zur Bestimmung von H₂-Einschlüssen im Gewebe und zur Beurteilung der Resorption der Probekörper durchgeführt. Für eine hohe Aussagekraft und eine gute Vergleichbarkeit der Ergebnisse aus den CT-Kontrollen, erfolgten die Kontrollen, im gesamten Beobachtungszeitraum, immer an denselben vier Versuchstieren der jeweiligen Versuchsgruppen.

5.2.3 CT-Analyse (OsiriX)

Zur Auswertung der CT-Bilder wurde in allen Fällen die "Felsenbein fein"-Aufnahme¹¹ aus den erstellten Datensätzen zur Berechnung der Volumina verwendet.

¹¹ Spezielle CT-Einstellung im CCT mit besonders dünnen/vielen Schichten.

Die Berechnung der Volumina erfolgte mit der, für den Apple Mac erhältlichen Software, OsiriX (Version OsiriX MD 8.0.2)¹². Über die Einstellung des gewünschten H-E-Fensters können bestimmte Strukturen, die innerhalb der vorgegebenen H-E-Bereiche liegen, markiert und deren Volumina berechnet werden.

Um Messfehler möglichst auszuschließen und die Genauigkeit der Daten zu erhöhen, wurden die Messungen der Volumina für jede Probe drei Mal wiederholt und die Ergebnisse gemittelt.

Abbildung 7 zeigt beispielhaft die Auswertung der CT-Aufnahmen hinsichtlich der Gasvolumina mittels OsiriX. Zur Berechnung der Gasvolumina wurde in dieser Arbeit der H-E-Bereich von -2000 bis -350 gewählt [A]. Mit der Funktion "Growing Region" können im Berechnungsfenster ausgewählte Bereiche markiert und deren Volumina berechnet werden. Über die Segmentierungs-Einstellungen können die individuellen Hounsfield-Einheiten ausgewählt werden. Im ROI-Verwaltungsfenster [B] werden die berechneten Volumina angezeigt.



Abb. 7: Auswertung der Gasvolumina im CT mittels OsiriX (Die Magnesiumprobekörper zeigen sich weiß, die Gaseinschlüsse zeigen sich schwarz)

¹² OsiriX ist eine Software für MAC OS X, zur Darstellung und Verarbeitung radiologischer DICOM-Bilddaten (www.osirix-viewer.com).
Abbildung 8 zeigt exemplarisch die Auswertung der CT-Aufnahmen hinsichtlich der Implantatvolumina mittels OsiriX. Für die Berechnung der Implantatvolumina wurde ein H-E-Bereich von 1750 bis 3500 [A] gewählt.



Abb. 8: Auswertung der Implantatvolumina im CT mittels OsiriX (Die Magnesiumprobekörper zeigen sich weiß, die Gaseinschlüsse zeigen sich schwarz)

5.2.4 Blutserum-Analyse

Jedem Tier wurde regelmäßig Blut abgenommen, um die allgemeine Tiergesundheit und die Organfunktion zu evaluieren. Dazu wurden im Rahmen der Voruntersuchung, präoperativ und zu den CT-Kontrollen, Blutseren gesammelt. Die präoperativ ermittelten Blutwerte dienten dabei als Referenzwert für die Beurteilung die nachfolgende Auswertung der Magnesiumlevel. (Die Analyse der Proben erfolgte durch ein externes Labor.)

5.3 Postmortem Untersuchungen

Die Erstellung der histologischen Präparate erfolgte in enger Zusammenarbeit mit dem Institut für Osteologie und Biomechanik (IOBM, UKE Hamburg).

Alle der sechzig Proben wurde histologisch und histomorphometrisch untersucht. Bei den Auswertungen wurden für beide Versuchsgruppen (6 und 12 Monate) speziell folgende Parameter erfasst:

• Quantität des neugebildeten Knochens

- "Qualität" des neugebildeten Knochens
- Gasentwicklung
- Biokompatibilität
- Degradationsgrad

5.3.1 Mikro-CT gestützte Analyse

Wie in Tabelle 3 dargestellt, wurden postmortem 12 Proben mittels Mikro-CT (μ CT) untersucht (Scanco Medical μ CT 42, Brüttisellen (CH)).

Implantatgruppe	1	2	3	4	5	6
Implantat	Mg	Mg	Mg	Ti	Ti	Ti
Kanalvariante (mm)	0,4	0,6	0,8	0,4	0,6	0,8
VG1: # Tiere 6-Monatsgruppe	2	2	2	0	0	0
VG2: # Tiere 12-Monatsgruppe	1	1	1	0	0	0

Tab. 3: Übersicht der µCT-Proben

Nach der Euthanasierung der Tiere und der Entnahme und Aufarbeitung der Femora, sollten mit Hilfe von der μ CT-Bildgebung die Degradation und die Osteoinduktivität der Prüfkörper mit verschieden dimensionierten Kanalstrukturen und der Ersatz von Magnesium durch Knochen untersucht werden. Dazu musste zunächst die μ CT-Bildgebung, für in Knochen implantierte Magnesium-Probekörper, etabliert werden. Hierfür wurden die geeigneten Einstellungen der Grauwerte, sowie die Schichtdicke der Präparate, im Vorfeld des In-vivo-Versuchs an Probeaufnahmen getestet.

Für die Analyse der Integration der Implantate in das umliegende Gewebe und den Knocheneinbau in die Probekörper, hat sich die μ CT-Bildgebung als geeignetes Verfahren erwiesen. Die mittels μ CT erstellten Bilder zeigen bei einer Einstellung von 70 kV, 114 μ A, voxel size 15 μ m, integration time 200 ms, eine gute Darstellbarkeit von neugebildeten Knochen. Magnesium verursacht bei den gewählten Messbedingungen im Vergleich zum CT (mit erschwerter Knochenabgrenzbarkeit) weniger Bildgebungs-Artefakte.

Untersucht wurden die Probekörper zum Zeitpunkt von sechs Monaten und zwölf Monaten nach Implantation bzw. nach der Euthanasierung der Tiere der jeweiligen Versuchsgruppen.

Abbildung 9 zeigt die dreidimensionale Rekonstruktion eines Probekörpers aus einem μ CT-Datensatz, die von einem vorzeitig (wenige Tage nach Implantation), infolge des Auftretens einer Fraktur, euthanasierten Kaninchens generiert wurden. Die Bilder demonstrieren, die bereits erwähnte, hervorragende Darstellbarkeit von Magnesium im Knochen bei sehr guter Auflösung (Voxel size: 15 µm). Mit der so etablierten Methodik wurden dann die übrigen, aufgearbeiteten Femora untersucht.



Abb. 9: Mikro-CT-Bildgebung eines Magnesium-Probekörpers, postoperativ (3D-Rekonstruktionen, optisch dichte Strukturen in der Schnittebene sind rot dargestellt)

Beurteilt wurde die Position des Implantats, die Degradation, sowie die Knochenintegration und die Dichte der verbliebenen Implantatreste. Die Umgebung der Implantatregion wurde in der µCT-graphischen Darstellung eingehend, hinsichtlich der Implantateinbettung und Wasserstoffgas-Formationen, untersucht.

Die Abgrenzbarkeit der Implantate gegenüber den Knochenstrukturen ist aufgrund der ähnlichen Dichteeigenschaften schwierig. Zudem besteht ein enger Implantat-Knochen-Kontakt, was die Auswertung zusätzlich erschwert. Zur Analyse der graphischen Bilder wurde der Quotient, Knochenvolumen (BV) zu Totalvolumen (TV), bestimmt (vgl. Abb. 10).



Abb. 10: Repräsentative Darstellung der Erfassung der von Knochen bedeckten Implantatoberfläche im µCT

Im Anschluss an die µCT-Untersuchung wurden die Knochenblöcke für die histologische Untersuchung präpariert. Die Proben wurden zurechtgeschnitten und im Anschluss in Paraffin eingebettet. Die Paraffinschnitte wurden in Alkoholbädern dehydriert und auf 200 µm mit einer "Leica" Maschine geschliffen.

5.3.2 Histologische Analyse der Organe

Die Bewertung der Gesamtstruktur des neugebildeten Knochengewebes und der entnommenen Organe (Leber, Niere, Milz) erfolgte über die histologischen Präparate in Zusammenarbeit mit dem Institut für Pathologie am UKE. Orientiert an der Vorgehensweise aktueller wissenschaftlicher Publikationen wurden die histologischen Bilder unter Verwendung eines Bildanalysators (Osteomeasure¹³) untersucht. Die histologische sowie laborchemische Untersuchung der Organe erfolgte mit spezifischer Fragestellung bezüglich der Biokompatibilität, des Abbauprozesses und der Akkumulation von Degradationspartikeln.

Zur Beurteilung, wurden die entnommenen Organe (Leber, Niere, Milz) für die auflichtmikroskopische Diagnostik, zunächst in Formalin fixiert. Im Autotechnikon¹⁴ wurde, nach einer Einwirkzeit des Fixierungsmittels von ca. 1-5 mm/h, die Fixierflüssigkeit mit Wasser und Alkohol ausgewaschen. Die Präparate wurden durch eine Alkoholreihe mit zunehmender Konzentrierung entwässert und gleichzeitig ge-

¹³ Osteometrics Inc., Atlanta, Georgia, US

¹⁴ Fa. Bavimed, Modellreihe 2500

härtet. Die Organ-Proben wurden anschließend in 61°C warmes Paraffin eingegossen und zu einem schneidbaren Paraffinblock verarbeitet. Mit einem Schlittenmikrotom¹⁵ wurden ca. 5µm dicke Schnitte für die histologische Auswertung erstellt. Für die Färbung der Paraffinschnitte wurde die Standardfärbung "Hämatoxylin-Eosin-Färbung" gewählt.

In den Organpräparaten wurde gezielt nach einer Akkumulation von Abbauprodukten bzw. Partikeln des Magnesiums, sowie nach toxischen bzw. pathologischen Gewebereaktionen, gesucht.

Die Untersuchung der Niere ist von besonderer Bedeutung, da die Ausscheidung des im Rahmen des Degradationsprozesses frei werden Magnesiums größtenteils über den Urin erfolgt. Reguliert wird die Ausscheidung über die glomeruläre Filtration der Nieren. Der Anteil an Magnesium, welcher im tubulären System der Nieren rückresorbiert wird, ist dabei abhängig von der Plasma-Konzentration. Bei einer hohen Magnesium-Plasma-Konzentration, erfolgt eine Anpassung des Magnesiumspiegels über eine verminderte Rückresorption und eine damit vermehrte Ausscheidung von Magnesium über den Urin. Bei einer gesunden Nierenfunktion kommt es daher bei erhöhter Magnesiumzufuhr zu keinem signifikanten Konzentrationsanstieg im Plasma. Um eine Überbelastung der Organe, sowie eine Akkumulation von Magnesium in den Nierentubuli auszuschließen, wurde zusätzlich zu der histologischen Untersuchung eine laborchemische Untersuchung aller entnommenen Organe durchgeführt.

5.3.3 Ergänzende Untersuchung auf Seltene Erden (REEs)

Bei der Gewinnung von Reinmetallen entsteht als Nebenprodukt die Stoffklasse der Seltenen Erden (REEs). Seltene Erden wurden in zahlreichen Versuchen als Legierungsmaterial bzw. als zusätzliche Stoffkomponente für biodegradierbare Osteosynthesesysteme untersucht. Neuere Studien haben herausgefunden, dass diese Elemente (REEs) in Mg-Legierungen zahlreiche Vorteile aufweisen, wie eine verbesserte Korrosionsbeständigkeit und günstigere mechanische Eigenschaften (*Kirkland et al. 2011, Al-Samman et al. 2011, Bayani et al. 2009*). REE-haltige Mg-

¹⁵ Fa. Reichert-Jung, HN4

Legierungen sind biologisch abbaubare Legierungen für biomedizinische Anwendungen (Ding et al. 2016b, Qu et al. 2004)

Die in diesem Versuch verwendete Legierung basiert auf W43, die einen gewissen Anteil an unterschiedlichen Seltenerdelemente enthält und bereits in verschiedenen Studien eine gute Biokompatibilität bei günstigen mechanischen Eigenschaften gezeigt hat (*Schaller et al. 2015, Marukawa 2016, Waksman et al. 2006*). Obwohl Mg-REE-basierte Legierungen für kardiovaskuläre Anwendungen in klinischen Studien eingesetzt wurden, bestehen für die meisten Mg-REE-Legierungen in orthopädischen Anwendungen Bedenken, bezüglich der Biosicherheit. Es besteht insbesondere kein Konsens hinsichtlich der sicheren Dosierung (*Drynda et al. 2009*).

In der Studie von *Myrissa et al. (2015)* wurde die Verteilung und Akkumulation von Gadolinium (Gd) in Ratten-Organen während des Abbaus von Mg10Gd, als eines zu den Seltene Erden gehörenden Elementen, untersucht. Die Ergebnisse zeigten, dass sich Gd in den tierischen Organen ansammelt, vor allem in Milz, Leber und in Niere.

Die Akkumulation und der Einfluss von REE-haltigen Magnesiumlegierungen ist von großer Bedeutung für eine sichere Anwendung von REE-haltigen Magnesiumlegierungen beim Menschen. Um eine Akkumulation und eine toxische Organreaktion durch Seltene Erden auszuschließen, wurden daher zusätzlich alle Organe auf diese Stoffgruppe laborchemisch untersucht.

5.3.4 Untersuchung der Knochenimplantate

5.3.4.1 Histologische Auswertung

Die aufbereiteten histologischen Schnitte wurden lichtmikroskopisch untersucht. Die visuelle Beurteilung der Proben erfolgte hinsichtlich des Knocheneinbaus, des Degradationsgrades der Probekörper, sowie hinsichtlich erkennbarer Gaseinschlüsse und Entzündungsanzeichen. Hierzu wurde ein Bewertungssystem¹⁶ entwickelt, bei dem je nach Ausprägung unterschiedliche Punktzahlen vergeben wurden.

¹⁶ Vgl. Anhang: Kapitel 9.3

Im Einzelnen wurden auf diese Weise folgende Parameter bewertet:

- Quantität an neugebildetem Knochen
- Einwachsverhalten (= Eindringtiefe des gebildeten Knochens in das Implantat)
- Qualität des gebildeten Knochens
- Degradationsgrad des Probekörpers
- Gasentwicklung
- Verdrängung von gesundem Knochengewebe durch Gasentwicklung
- Entzündungsreaktionen (= Einwanderung von Entzündungszellen)

Die einzelnen Parameter wurden jeweils von 0 (nicht/kaum zu beobachten) bis 3 bzw. 4 (vorrangig zu beobachten) bewertet.

5.3.4.2 Histologische Analyse

Die histologische Auswertung der implantattragenden distalen Femuranteile erfolgte im Anschluss an die µCT-Untersuchungen. Die Gewebeproben wurden in Alkohol dehydratisiert und in Kunststoff¹⁷ eingebettet. Von den vorbehandelten Gewebeproben wurden 1000 µm dicke Schnitte hergestellt. Diese wurden dann mit Hilfe einer Schleifmaschine auf die endgültige Schichtdicke von 50-80 µm gebracht. Daraufhin erfolgt die Anfärbung mit Toluidinblau-Färbung sowie die histologische und histomorphometrischen Auswertung. Die Toluidinblau-Färbung war im Vorfeld, anhand von Tests, als geeignete Färbemethode ermittelt worden (vgl. Abb. 11).



Abb. 11: Übersicht der getesteten Färbemethoden

¹⁷ K-PLAST®, MEDIM-Medizinische Diagnostik Methoden GmbH, Giessen

Abbildung 12 veranschaulicht die bei der Untersuchung berücksichtigten histologischen Merkmale. Eine detaillierte Beschreibung ist der Legende zu entnehmen. Unter dem Auflichtmikroskop wurden die Proben unter 20-facher Vergrößerung hinsichtlich der Gasentwicklung, sowie der damit verbundenen Verdrängung von gesundem Knochengewebe/Knochenmark untersucht.



histologischen Merkmale

5.3.4.3 Histomorphometrische Analyse

Alle 60 Proben wurden histomorphometrisch, mittels Auflichtmikroskopie und OsteoMeasure Programm, hinsichtlich der Knochenneubildung ausgewertet (s. Abb. 13).



Abb. 13: Exemplarische Darstellung der histomorphometrischen Auswertung mittels OsteoMeasure

Aus der Analyse der nicht degradierbaren Titanimplantate, die als Kontrolle implantiert wurden, kann ein qualitativer Vergleich zu den resorbierbaren Magnesium-Probekörpern hergestellt werden.

Die histomorphometrische Analyse der Proben erfolgte blind und mit Hilfe des OsteoMeasure Programms. Die Software OsteoMeasure ermöglicht eine umfangreiche Auswertung histologischer Schnitte und die Erhebung von vergleichbaren Knochenparametern. Für die anschließende histomorphometrische Analyse, mittels OsteoMeasure, wurde ein Lichtmikroskop vom Typ Axio Scope.A1 der Firma Carl Zeiss AG mit einer Gesamtvergrößerung von 20x5 verwendet.

Um vergleichbare Werte für das Knocheneinwachstum in die Probekörper zu erhalten wurde, wie in anderen bereits publizierten Studien, die Fläche des Knochen-Implantat-Kontakts (Bone Implantat Contact (BIC)) herangezogen *(Wang et al. 2016)*. Unter Verwendung des Programms OsteoMeasure wurde die Quantität des neugebildeten Knochens durch Bestimmung des Knochen-Implantat-Kontakts in % bestimmt. Dazu wurden die Oberflächen, die von gut mineralisiertem Knochen überzogen waren, gemessen und in das Verhältnis zur gesamten Implantatoberfläche gesetzt.

5.3.4.4 Polarisationsmikroskopische Analyse

Für die Beurteilung der Mineralisation (Qualität) des neugebildeten Knochens wurden die Dünnschliffe zusätzlich polarisationsmikroskopisch (mit dem Polarisationsmikroskop Olympus BX51) untersucht. Die Polarisationsmikroskopie ist zur Analyse von lichtbrechenden Materialien besonders geeignet, so z.B. bei der Beurteilung von Mineralisation des Knochens. Knochenstrukturen mit guter Mineralisation zeigen sich durch helle, bläuliche Lichtreflexe (vgl. Abb. 14, gut mineralisierte Knochensubstanz ist mit * markiert). Minder mineralisierte Areale zeigen sich dunkel bis schwarz (vgl. Abb. 14, rote Pfeilmarkierung).





5.3.4.5 Statistik

Die statistische Auswertung für das BIOMAGIK Projekt wurde vom Institut für medizinische Biometrie und Epidemiologie (Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf) durchgeführt (Schön 2017).

6 Ergebnisse

Insgesamt zeigen die Ergebnisse der einzelnen Analysen nur eine Tendenz der ablaufenden Prozesse. Eine sehr viel genauere Beurteilung ergibt sich aus der Zusammenschau der gesamten erhobenen Daten aller durchgeführten Untersuchungen.

6.1 In-vivo-Ergebnisse

6.1.1 Klinische Verlaufskontrolle

Im folgenden Abschnitt werden die Ergebnisse der täglichen Kontrollen durch die Tierärzte und Tierpfleger zur Beurteilung der Wundheilung und des klinischen Gesamtzustands der Tiere, über den vollständigen In-Vivo-Versuchszeitraum, diskutiert. Aus beiden Versuchstiergruppen (VG1, VG2) musste jeweils ein Tier vorzeitig, zwei Tage postoperativ, aufgrund von Femurfrakturen euthanasiert werden. Die Frakturen sind am ehesten auf eine zu frühe und übermäßige Belastung des operierten Beins zurückzuführen. Sie sind nicht im Zusammenhang mit dem verwendeten Probekörperimplantat zu sehen.

Über den gesamten Verlauf zeigte sich keines der Tiere verhaltensauffällig. Es waren außerdem keine Anzeichen für Infektionen oder andere unerwünschte Gewebereaktionen erkennbar. In der Phase der Degradation der Probekörper kam es im Implantatumfeld zu Gasentwicklungen. Bei vier, der insgesamt 58 Versuchstiere, konnten zum Zeitpunkt von drei Monaten nach Implantation, kleinere Gasblasenbildungen, sowie kleine knisternde emphysemartige Lufteinschlüsse, subkutan getastet werden. Eine gestörte Wundheilung wurde in diesem Zusammenhang jedoch nicht beobachtet.

Die Wunden zeigten sich über den gesamten Zeitraum reizlos, ohne Rötungen oder Schwellungen. Es wurden keine vorzeitigen Implantatbrüche oder Schwächen der Implantate dokumentiert. Keines der Implantate musste aufgrund von Unverträglichkeit vor Ablauf der Versuchszeit explantiert werden.

6.1.2 Ergebnisse der makroskopischen Analyse

Verglichen zum Zeitpunkt der Implantation, zeigten alle Implantate bereits nach

sechs Monaten makroskopische Veränderungen in ihrer Struktur. Makroskopisch waren zwölf Monate nach der Implantation keine massiven Magnesiumpartikel mehr erkennbar (vgl. Abb. 15). Die Implantate waren noch als weißlicher Leerkörper erkennbar. Das umliegende Gewebe, in der Nachbarschaft des Implantats, zeigte makroskopisch keine Veränderungen.



Abb. 15: Makroskopische Darstellung der Femora Präparate nach HE-Färbung (Schwarze Pfeile markieren Magnesiumrückstände, graue Pfeile zeigen Restkörper ohne metallisches Magnesium)

6.1.3 CT-Analyse

Untersucht wurden jeweils drei Tiere aus jeder Magnesium-Implantatgruppe und je ein Tier aus der Titan-Kontrollgruppe.

6.1.3.1 Gasvolumina

Die mittels Osirix ermitelten Volumina sind Tabelle 4 zu entnehmen. Gezeigt sind die gemessenen Gasvolumina der untersuchten Implantatkörper. Es wurden drei Implantatkörper pro Kanalvariante, sowie drei Titan-Kontrollkörper, auf H₂-Gas untersucht. Die Ergebnisse sind im zeitlichen Verlauf von 12 Monaten dargestellt.

		Gasvolumen in cm ³								
	Probekörper	Monat 0	Monat 1	Monat 2	Monat 3	Monat 4	Monat 5	Monat 6	Monat 9	Monat 12
_	0,4 mm	0,037	0,04338	0,063	0,056	0,056	0,033	- 1	-	-
ta.	0,6 mm	0,046	0,04528	0,093	0,072	0,050	0,046	-	-	-
F	0,8 mm	0,058	0,05978	0,093	0,085	0,085	0,025	-	-	-
	0,4 mm	0,199	0,28418	0,422	0,495	0,262	0,025	0,013	0,009	0,008
	0,4 mm	0,091	0,73108	2,136	2,206	0,262	0,081	0,074	0,044	0,009
	0,4 mm	0,149	0,31326	0,429	0,890	0,956	0,038	0,038	0,026	0,009
E										
siu	0,6 mm	0,304	0,15031	0,231	0,461	0,026	0,009	0,015	0,046	0,022
ne	0,6 mm	0,063	0,945	0,9902	1,426	0,971	0,239	0,033	0,033	0,010
ag	0,6 mm	0,052	0,34583	0,772	1,490	1,299	0,167	0,018	0,029	0,014
Σ										
	0,8 mm	0,046	0,66351	0,691	1,687	1,183	0,583	0,091	0,020	0,017
	0,8 mm	0,091	0,28721	0,642	0,334	0,046	0,018	0,014	0,011	0,008
	0,8 mm	0,113	0,36708	1,203	1,775	2,253	2,253	0,156	0,057	0,029

 Tab. 4: Über OsiriX ermittelte Gasvolumina im 12-monatigen Verlauf

Abbildung 16 zeigt repräsentative Bilder der computertomographischen Diagnostik zu den Zeitpunkten 0, 1, 2, 3, 4, 6, 9 und 12 Monate nach der Implantation für die jeweiligen Implantatvarianten. Die blauen Pfeile zeigen die Gaseinschlüsse, die bis zum Zeitpunkt von 6 Monaten nachweisbar waren. Die roten Pfeile zeigen die Position der Implantatkörper und waren für jede Kanalvariante zu jedem Zeitpunkt darstellbar.



Abb. 16: Computer Tomographische Untersuchung der Implantationsregion am distalen Femur über den Zeitraum von zwölf Monaten (Die Bilder zeigen die Gaseinschlüsse zu den Zeitpunkten 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 9, 12 Monate nach Implantation. Die weißen Pfeile markieren die Gasvolumina. Gaseinschlüsse zeigen sich als schwarze/dunkle Areale in der Umgebung des Implantats. Die roten Pfeile markieren die Implantatkörper.)

Wie aus den Daten hervorgeht, wiesen sowohl die Magnesium-Probekörper als auch die Titan-Kontrollkörper zum Zeitpunkt der Implantation (Zeitpunkt "0") bereits geringe Gaseinschlüsse auf. Bei den Gaseinschlüssen handelt es sich am ehesten um Gas, welches durch die Implantation des Probekörpers in den Knochenraum gelangt ist.

Die gemessenen Volumina zeigen eine kontinuierlich verlaufende Gasentwicklung über den Versuchszeitraum, mit initialem Anstieg und deutlicher Rückbildung ab dem fünften Monat. (vgl. Abbildung 16 und 17).

Bei allen Kanalvarianten der Magnesium-Implantate verlief die Gasentwicklung bis zum 3. Monat nach Implantation mit steigender Tendenz und stagnierte anschließend auf einem gleichbleibenden Plateau. Diese Kinetik spricht für ein sich, ab dem 4. Monat, entwickelndes Gleichgewicht im Gewebe, zwischen den ablaufenden Degradations-Prozessen, der einhergehenden H₂-Gasentwicklung und den Absorptionsvorgängen. In dem Maße, in dem der Abbau des Probekörpers voranschreitet bzw. dieser degradiert, wird Wasserstoffgas freigesetzt.

Das nachfolgende Diagramm (in Abb. 17) verdeutlicht die Ergebnisse der CT-Analyse der Gas-Einschlüsse.



Abb. 17: Gasvolumina der Magnesium-/Titan-Probekörper im zeitlichen Verlauf von **12** Monaten (Mittelwerte) (Pro Magnesium-Implantatkörper wurden n=3, für die Titan-Kontrollkörper n=1 Tiere pro Kanalvariante untersucht)

6.1.3.2 Bewertung der Volumenentwicklung der Probekörper

Das Diagramm in Abbildung 18 zeigt die Volumenentwicklung der Probekörper im zeitlichen Verlauf. Eine genaue Umrechnung in cm³ war wegen der knochenähnlichen Eigenschaften im CT nicht möglich. Gezeigt werden daher Mittelwerte für die Kanalvarianten.



Wie aus den CT-Daten hervorgeht, zeigten die Probekörper zwar eine fortschreitende H₂-Gasentwicklung, die auf die Magnesiumdegradation zurückzuführen ist, aber scheinbar keine Abnahme des Implantatvolumens über den gesamten Beobachtungszeitraum. Das Implantatvolumen zeigte sich bei allen Kanalvarianten konstant. Es konnten keine Calcificationen des, das Implantat umgebenden, Weichgewebes gezeigt werden.

6.1.4 Blutserum-Analyse

Die Blutentnahmen erfolgten in monatlichen Abständen, simultan zu der computertomographischen Bildgebung. Die Serumdiagnostik erfolgte durch ein extern beauftragtes Labor. Die Untersuchung der Serumproben ergab über den gesamten Versuchszeitraum keinen Hinweis auf die Akkumulation von toxischen Abbaumetaboliten durch die Degradation der Magnesium-Implantate. Auch konnte keine erhöhte Konzentration von seltenen Erden (Cer, Dysprosium, Erbium, Europium, Gadolinium, Holmium, Lanthan, Lutetium, Neodym, Praseodym, Promethium, Samarium, Scandium, Terbium, Thulium, Ytterbium, Yttrium) nachgewiesen werden. Wie aus





Abb. 19: Blutserum-Analyse zu den Seltenen Erden (REE)

Im Vergleich der Serumproben der Magnesium-Probekörper zu den Proben der Titanimplantate konnte keinen erhöhten Konzentrationen an Magnesium gemessen werden (vgl. Abb. 20). Der Vergleich der beiden Gruppen ergab auch keine anderen Unterschiede.



Abb. 20: Magnesiumkonzentration in der Blutserum-Analyse

Präoperativ zeigte keines der Versuchstiere einen erhöhten Magnesiumspiegel im Blut. Über den gesamten Versuchszeitraum zeigte sich die Magnesiumkonzentration in allen Versuchsgruppen konstant erhöht, jedoch stets in physiologisch tolerierbaren Bereichen

6.2 Postmortem Ergebnisse

6.2.1 Histologische Analyse der Organe

Bei allen Versuchstieren wurden die Hauptorgane (Leber, Niere und Milz), die wesentlich an Entgiftungs- und Stoffwechselprozessen beteiligt sind und eine Filterfunktion haben, auf die Anwesenheit von Degradationsrückständen und die Akkumulation von Magnesium untersucht.

Abbildung 21 zeigt repräsentative Präparate der Leber und Niere, nach HE-Färbung. Zu sehen sind pathologisch unauffällige, gesunde Gewebestrukturen ohne Anzeichen für Ablagerungen oder pathologische Gewebeveränderungen:



Abb. 21: Histopathologische Untersuchung von Nieren und Lebern (12-Monatsergebnisse)

- "1A (HE)" zeigt regelrechtes Gewebe der Nierenrinde zum Zeitpunkt von sechs Monaten. Zu sehen ist eine pathologisch unauffällige Nieren-Architektur mit Nieren-Glomeruli.
- "1B (HE)" zeigt die charakteristische Histologie des Nieren-Marklagers ohne Zeichen einer Nekrose oder einer ablaufenden Entzündung sowie keine toxischen oder degenerativen Prozesse. Es konnte keine negative Gewebeveränderung irgendeiner Art festgestellt werden.
- "2A (HE)" und "2B (HE)" sind repräsentative Bilder der Kaninchenleber zum Zeitpunkt von 6 Monaten. Zu sehen ist hier die normale Histologie einer Kaninchenleber, ohne Hinweise auf eine Nekrose, eine ablaufende Entzündung sowie toxische Gewebeveränderungen oder andere degenerative, negative Gewebsreaktionen.

In keiner der untersuchten Gewebeproben wurden pathologische Auffälligkeiten festgestellt, die auf toxische Effekte durch die Degradation der Implantate hinweisen würden.

Abbildung 22 zeigt repräsentative Aufnahmen der Analyse der Milz-Präparate in HE-Färbung. Zu sehen sind physiologische Organstrukturen ohne Hinweis auf pathologische Veränderungen. Im Bereich der weißen Pulpa (Pulpa alba) sind keine vergrößerten Lymphfollikel oder eine vermehrte Anzahl an B-Lymphozyten nachweisbar, die für eine toxische Gewebereaktion oder eine systemisch entzündliche Reaktion sprechen würden. Es konnten keine Degradationsrückstände oder eine Akkumulation von Magnesium nachgewiesen werden.



Abb. 22: Repräsentative Bilder der histologischen Milzpräparate (12-Monatsergebnisse)

6.2.2 Laborchemische Organanalyse nach 12 Monaten

Für die laborchemische Analyse wurden die Organe (Leber und Niere) der 12-Monatsgruppe (VG2) entnommen und nach Aufbereitung der Proben auf die Akkumulation von Stoffen und Degradationsrückständen untersucht. Die Abbildungen 23 und 24 zeigen die Mittelwerte der laborchemischen Untersuchung von Leber und Niere.



Abb. 23: Ergebnisse der laborchemischen Untersuchung der Leberproben auf den Magnesiumgehalt



Abb. 24: Ergebnisse der laborchemischen Untersuchung der Nierenproben auf den Magnesiumgehalt

Beim Vergleich der für die Magnesiumkonzentration in den Organen ermittelten Werte, zwischen den Titan- und Magnesium-Implantaten, sind für die Magnesium-Versuchsgruppe leicht erhöhte Magnesiumwerte erkennbar. Die Konzentration der Magnesiumgruppe (Mg) zeigt eine größere Varianz der Einzelwerte in den verschiedenen Kanalvarianten, als die der Titangruppe (Ti).

Eine erhöhte Konzentration an Seltenen Erden konnte in keiner der untersuchten Proben festgestellt werden.

6.2.3 Mikro-CT gestützte Analyse der Femorapräparate

Mittels der mikro-computertomographischen (µCT) Diagnostik wurde die Degradation und die Osteoinduktivität der verschieden kanalikulären Prüfkörper, sowie der Ersatz von Magnesium durch Knochen, untersucht.

Abbildung 25 zeigt die dreidimensionalen Rekonstruktionen bzw. zweidimensionalen Schnitte der Probekörper sechs Monate nach Implantation. Die sechs Monatsdaten aus dem µCT zeigen keine signifikante Abnahme des Implantatvolumens.



Abb. 25: Mikro-CT-Bildgebung von Magnesium-Probekörpern, 6 Monate nach der Implantation (3D-Rekonstruktionen in blau, sowie graue Schnittbilder in sagittaler und axialer Schicht)

Da die Daten der histologischen Auswertung bereits sechs Monate nach Implantation einen eindeutigen, starken Abbau des massiven, metallischen Magnesiumwerkstoffes zeigten, ist davon auszugehen, dass die Magnesiumdegradations-(zwischen)-produkte in der µCT-Bildgebung (genau wie in der CT-Bildgebung) nicht von metallischem Magnesium unterschieden werden können. Die CT-gestützte Volumenbestimmung lässt daher keine eindeutigen Aussagen über die Degradation des metallischen Magnesiumwerkstoffes zu. Neugebildete Knochenstrukturen sind hingegen gut darstellbar.

In Tabelle 5 sind die Ergebnisse der µCT-Analyse der Probekörper, sowie des eingewachsenen Knochens gezeigt.

Implantat	Volumen (außen)	Volumen (innen)	max. mögli- ches Kno- chenvolumen	Gemessenes Knochenvolu- men	Knochen- einbau (%)
Magnesium 0,8 mm	0,039	0,013	0,022	0,007	32
Magnesium 0,6 mm	0,046	0,014	0,032	0,007	22
Magnesium 0,4 mm	0,033	0,010	0,023	0,001	4
Titan 0,8 mm	0,037	0,012	0,025	0,005	20

Tab. 5: Morphometrische Auswertung der µCT-Schnittbilder (n=2)(6-Monatsauswertung)

Abbildung 26 zeigt eine grafische Darstellung des morphometrisch bestimmten Knocheneinbaus in die Kanalstrukturen der Magnesium-Probekörper. Die ersten Ergebnisse zum Knocheneinbau in die Probekörper mit den verschiedenen Kanalvarianten weisen auf ein besseres Einwachsen in die größeren Kanäle hin. Das meiste Knocheneinwachstum erzielten die Implantate mit 0,8 mm großen Kanälen.



Abb. 26: Knocheneinbau in die Kanaistrukturen der Magnesium-Probekorpei aus der µCT-Messung (n=2) (6-Monatsauswertung)

Die Daten der µCT-Auswertung lassen zwölf Monate nach der Implantation, einen fortgeschrittenen Degradationsprozess der Magnesium-Probekörper, d.h. des massiven metallischen Magnesiumwerkstoffes, zu vereinzelten Magnesiumpartikeln erahnen. In Abbildung 27 sind repräsentative µCT-graphische Bilder der jeweiligen Implantatvarianten zu sehen. Die Implantatkörper der 0,8 mm Kanalvariante zeigen einen weit fortgeschritten Degradationzustand (Abb.27, C35?60). Graue Bereiche

der 3D-Rekonstruktionen zeigen, degradierte Bereiche mit Knocheneinwachstum. Die blauen Bereiche zeigen Mikropartikel und Rückstände des metallischen Magnesiums, sowie Restsubstanzen der Probekörper. In den Schnittbildern zeigen sich massive Implantatanteile der Probekörper weiß, degradierte Anteile grau. Aufgrund der, bereits beschriebenen, erschwerten Darstellbarkeit der Probekörper, durch Bildartefakte und der hohen Gewebeähnlichkeit, können die Bilder nur als Tendenz angesehen werden. Die Ergebnisse der µCT-Daten decken sich mit den Beobachtungen der histologischen Untersuchung.



Abb. 27: Mikro-CT-Bildgebung von Magnesium-Probekörpern, 12 Monate nach der Implantation

(3D-Rekonstruktionen in blau, sowie graue Schnittbilder in sagittaler und axialer Schicht)

6.2.4 Ergebnisse der histologischen/histomorphometrischen Auswertung

Im Anschluss an die mikro-computertomographische (µCT) Bildgebung wurde die histologische und histomorphometrische Untersuchung der entnommenen Femorapräparate durchgeführt. Bei der makroskopischen Beurteilung der Präparate, war die kortikale Oberfläche an der Implantationsstelle, vollständig von neugebildetem Knochengewebe bedeckt. Im Querschnitt waren die Reste der Probekörper nur noch bei genauer Begutachtung zu erkennen. Bei keinem der Präparate konnte eine Fraktur des Implantats, die Bildung von Pseudoarthrosen oder eine Kallusbildung festgestellt werden. Im weiteren Studienverlauf wurden die Präparate mikroskopisch hinsichtlich der Degradation, der Osteoinduktivität der verschieden kanaliku-

6.2.4.1 Knocheneinwachstum und Degradation

Die Paraffinschnitte in HE der jeweiligen Kanalvarianten (nach 6 Monaten) sind in Abbildung 28 dargestellt. Die Abbildungen 29 und 31 zeigen die histologische Analyse des neugebildeten Knochens um die Magnesium-Implantatkörper nach sechs (Abb. 29) bzw. nach zwölf Monaten (Abb. 31). Es sind jeweils repräsentative Probekörper der verschiedenen Kanalvarianten gezeigt. Nicht degradierte Anteile der Magnesium-Probekörper stellen sich schwarz dar. Bereits degradierte Anteile der Probekörper zeigen sich hell violett. Massives Titan (Abb. 33a und 33b) stellt sich ebenfalls wie massives, nicht degradiertes Magnesium, schwarz dar.



Abb. 28: Knocheneinwachstum nach 6 Monaten Exemplarische Ausschnitte zur Darstellung des Knocheneinwachstums in die Kanalstrukturen. Nach 6 Monaten zeigen sich neben gut mineralisierten Knochen mit Osteoblasten (markiert mit *) noch reichlich unmineralisiertes Osteoid (roter Pfeil).

Die Magnesium-Probekörper zeigten bereits zum Zeitpunkt von sechs Monaten eine deutliche Knochenneubildung von gesundem, gut mineralisiertem Knochenmaterial (vgl. Abb. 28 und 29). Neugebildete gut mineralisierte Knochenanteile zeigen sich in der Touludinblau-Färbung zartrosa und weisen eine hohe Anzahl von Osteozyten auf. Neben gut mineralisiertem Knochenmaterial ist, vor allem in Fällen mit vielen Gaseinschlüssen, auch unreifer, schlecht mineralisierter Knochen zu beobachten. (vgl. Abb. 28 und 29). Im Bereich um das Implantat, sowie innerhalb der Kanäle zeigen sich deutlich kleinere und größere H₂-Gaseinschlüsse mit Verdrängung von gesundem Knochenmark. Das Implantatbett zeigt vereinzelt vaskularisiertes Knochenmark und Fettgewebe (oranges Dreieck). In der näheren Umgebung der Gaseinschlüsse sind teilweise Gewebereaktionen mit Makrophagen und Riesenzellen nachweisbar.



Abb. 29: Knocheneinwachstum in die Probekörper zum Zeitpunkt nach 6 Monaten. Die Bilder [A] – [D] zeigen gesunde Knochenstrukturen (rosa-violett), als Referenz zur Beurteilung des neugebildeten Knochengewebes am Implantatkörper. Gut mineralisierter Knochen mit Osteoblasten ist mit (*) markiert.

Die Magnesium-Implantate zeigten nach sechs Monaten keine Implantat- Schwachstellen. Die äußere Implantatoberfläche war zu 30-40% von einer gut mineralisierten Knochenschicht überzogen, was auf eine gute Biokompatibilität und Osteointegration hindeutet (vgl. Tab. 6). Hingegen war in den inneren Kanalstrukturen kaum Knochen eingewachsen. An vielen Kontaktstellen zwischen Implantat und Probekörperoberfläche waren osteogene Prozesse zu erkennen. In den Schliffen waren gleichermaßen Osteoklasten und Osteoblastensäume nachweisbar. In den Magnesium-Implantaten war sowohl gut mineralisierter, als auch mindermineralisierter, neugebildeter Knochen nachweisbar (vgl. Abb. 28 oder 29 und Diagramm in Abb. 30 (6. Monat). In die 0,8 mm Kanalstrukturen war tendenziell etwas mehr gut mineralisierter Knochen eingewachsen, als in die kleineren Kanalstrukturen (vgl. Tab. 7c). Bezüglich der Anteile an Implantat bedeckender Knochensubstanz waren zwischen



den Titan-Kontrollkörpern und den Magnesium-Implantaten keine Unterschiede zu erkennen.

Abb. 30: Gesamte Knochenanlagerung nach 6 und 12 Monaten (Gezeigt sind Mittelwerte (6 Monate: n=8 pro Mg-Kanalvariante + n=1 pro Titan-Kanalvariante / 12 Monate: n= 10 pro Mg-Kanalvariante + n=1 pro Titan-Kanalvariante)

Nach zwölf Monaten zeigte sich ein deutlich fortgeschrittener Einwachsprozess von Knochenmaterial in die Prüfkörper (vgl. Abb. 32 (12. Monat)). Verglichen mit den Proben zum Zeitpunkt von sechs Monaten war eine deutliche Zunahme an gut mineralisierter Knochenmasse und Knochenmarkstrukturen zu erkennen. Schlecht mineralisierte Anteile waren nach zwölf Monaten kaum noch nachweisbar. Es waren nur noch vereinzelt, kleinere Gaseinschlüsse erkennbar. Alle Implantatköper zeigten gut mineralisierte Knochenstrukturen der Implantatkörper waren fast vollständig mit Knochengewebe und Knochenmark ausgekleidet. Das günstigste Einwachsverhalten war vor allem bei den Prüfkörpern der Kanalgröße 0,8 mm zu beobachten (vgl. Abb. 31 und 32). Eine Abgrenzung zur Umgebungsmatrix, war aufgrund der fortgeschrittenen Gewebsintegration und Degradation der Implantatkörper nur noch schwer auszumachen. Das Implantatbett bestand nun bei den meisten Implantaten vorwiegend aus flächigem und stark vaskularisiertem Knochenmark und Fettgewebe (oranges Dreieck).



Abb. 31: Knocheneinwachstum in die Probekörper zum Zeitpunkt nach 12 Monaten Die Bilder [A] – [D] zeigen gesunde Knochenstrukturen (rosa-Violett), als Referenz zur Beurteilung des neugebildeten Knochengewebes am Implantatkörper. Gut mineralisierter Knochen mit Osteoblasten ist mit (*) markiert.

Der Knocheneinwuchs in die Probekörper wurde histomorphometrisch durch Messung der mit Knochengewebe bedeckten Kontaktfläche bestimmt. Das Diagramm in Abbildung 32 zeigt die Ergebnisse der histomorphometrischen Analyse nach sechs bzw. zwölf Monaten für gut und schlecht mineralisierten Knochen, sowie für den Knochen insgesamt (= die Summe von gut und schlecht mineralisiertem Knochen). Nach zwölf Monaten war der Anteil, der an mit Knochen bedeckten Kontaktfläche, bei den Probekörpern mit Kanälen von 0,6 und 0,8 mm, auf ca. 60 % gestiegen und der eingewachsene Knochen war größtenteils gut mineralisiert (vgl. Tab. 8). In die Probekörper mit 0,4 mm Kanälen war deutlich weniger Knochen eingewachsen (vgl. Tab. 8 und Tab. 9a). Hier lag der Anteil, der an mit Knochen bedeckten Kontaktfläche, nur bei ca. 25 % (vgl. Abb. 32 (12. Monat)).



Abb. 32: Minder- und gut mineralisierte Knochenanlagerung nach 6 und 12 Monaten (Gezeigt sind Mittelwerte (6 Monate: n=8 pro Mg-Kanalvariante + n=1 pro Titan-Kanalvariante / 12 Monate: n= 10 pro Mg-Kanalvariante + n=1 pro Titan-Kanalvariante)

6.2.4.2 Titan-Kontrolle

Die Titan-Probekörper zeigten nach sechs Monaten keine negativen Gewebereaktionen, keine Gasentwicklung und keine Veränderung ihres Volumens. Eine Verdrängung von gesundem Gewebe durch Gas war nicht nachweisbar. Die kleinen Gasbläschen lassen sich auf Lufteinschlüsse bei der Implantation der Probekörper zurückführen. In den Abbildungen 33a und 33b ist zu sehen, dass sich an den Titan-Probekörper gut mineralisierte, gesunde Knochenstrukturen angelagert hatten. Bei der Titankontrolle war kaum mindermineralisiertes Knochengewebe nachweisbar.



Abb. 33a: Repräsentative, histologische Bilder der Titan-Kontrollkörper zum Zeitpunkt nach 6 Monaten. (Blaue Dreiecke markieren Lufteinschlüsse. Gut mineralisierter Knochen mit Osteoblasten ist mit (*) markiert.)



Abb. 33b: Repräsentative, histologische Bilder der Titan-Kontrollkörper zum Zeitpunkt nach 12 Monaten. (Blaue Dreiecke markieren Lufteinschlüsse.Gut mineralisierter Knochen mit Osteoblasten ist mit (*) markiert.)

6.2.4.3 Degradation

Beurteilt wurde die Degradation nach sechs und zwölf Monaten.

Zum Zeitpunkt von sechs Monaten war keine im Rahmen der Messmöglichkeiten nachweisbare Volumenreduktion der Implantate zu beobachten. Die Magnesium-Implantate zeigten zu diesem Zeitpunkt eine gute Stabilität ohne Hinweis auf vorzeitige Degradation. Bei der Degradation der Magnesium-Probekörper bildete sich zunächst ein nicht lösliches Degradationsprodukt, das in der HE-Färbung unterschiedlich stark violett erscheint. Nach sechs Monaten wiesen die verschiedenen Kanalvarianten augenscheinlich keine Unterschiede im Abbau-/Degradationsverhalten auf. Bei der visuellen Beurteilung zeigten Probekörper der Größe 0,4 mm die größten Anteile an nicht degradiertem Magnesium-Implantatmaterial (vgl. Abb. 34 (Mg)). Implantatkörper der Größe 0,6 mm (vgl. Abb. 34 (Mg)) zeigten vereinzelt kleinere und größere Akkumulationen von Magnesiumresten. Im Vergleich zu den Probekörpern der Kanalgröße 0,4 mm war jedoch ein fortgeschrittener Degradationsprozess sichtbar. Die deutlichsten Fortschritte im Degradationsprozess zeigten sich bei den Implantatkörpern mit dem größten Kanaldurchmesser (0,8 mm).



Abb. 34: Degradation der Magnesiumimplantate nach 6 Monaten (Durch Gaseinschlüsse verdrängtes Gewebe ist mit grünem Dreieck markiert.)

Zwölf Monate nach Implantation der Magnesiumprobekörper waren bei allen Kanalvarianten kaum noch metallische Rückstände erkennbar (vgl. Abb. 36 (R)). Das Magnesium der Implantate war nach 12 Monaten fast vollständig degradiert. Zurück blieb ein Reststoff (R), in Form der ehemaligen Implantatstruktur, mit bislang noch unbekannten chemischen Eigenschaften (vgl. Abb. 36 (R)).



Abb. 35: Degradation der Magnesiumimplantate (PK) zum Zeitpunkt nach 12 Monaten (Gut mineralisierter Knochen ist mit (*), Reste der Implantatkörper sind mit (R) gekennzeichnet) (Gesamtvergrößerung 20x_5x)

Basierend auf den gezeigten Ergebnissen lässt sich ein stufenweise ablaufender Degradationsprozess über den Versuchszeitraum annehmen.

6.2.4.4 Gasentwicklung

Nach sechs Monaten waren in allen Magnesium-Implantaten Gaseinschlüsse erkennbar. Die Größe der Gaseinschlüsse lag in der Größenordnung von 10% der Probekörperfläche. Vereinzelt war eine Verdrängung von gesundem Gewebe durch Gas zu beobachten (vgl. Abb. 36 (H₂)). Beim Auftreten größerer Gasvolumina waren in der histologischen Betrachtung vermehrt schlecht mineralisierte Knochenneubildungen erkennbar (vgl. Abb. 28 (rote Pfeile)).

Nach zwölf Monaten war ein deutlicher Rückgang der Gaseinschlüsse zu verzeichnen. Die höchste Zahl an größeren Gasblasen war bei der Kanalvariante 0,4 mm zu beobachten. Die beiden anderen Kanalvarianten zeigten zu diesem Zeitpunkt nur noch nur vereinzelt Gaseinschlüsse (vgl. Abb. 36).



Abb. 36: Exemplarische Ausschnitte zur Darstellung der Gasentwicklung zum Zeitpunkt von 6 Monaten (Gesamtvergrößerung 20x_5x)

Die maximale Gasentwicklung fand im 3. Monat statt. Die Bilder in Abbildung 36 zeigen, dass sich die Gaseinschlüsse unmittelbar um das Implantatgerüst (violett), sowie im Umfeld der metallsichen Magnesiumrückstände (Mg) gebildet und dort lokal zu einer Verdrängung von umliegendem gesunden Gewebe geführt haben. Insbesondere in Darstellung [2C] sieht man eine neugebildete Knochenlamelle, die sich gelöst hat und durch Gas verdrängt wurde. Direkt am Probekörper hat sich an derselben Stelle bereits neuer Knochen gebildet.

6.2.5 Ergebnisse der Polarisationsmikroskopie

Aus der polarisationsmikroskopischen Darstellung der Implantate ist ersichtlich, dass im Verlauf des zwölfmonatigen Beobachtungszeitraums insgesamt ein graduierter Einbau von Knochengewebe in das Implantat stattfand (vgl. Abb. 37 und Abb. 38). Alle Probekörper degradierten innerhalb der ersten 6 Monate in einem verzögert ablaufenden Prozess und zeigten sich nach 12 Monaten nahezu vollständig abgebaut und in das umliegende Gewebe integriert. Insgesamt zeigten die Proben mit 0,6 bzw. 0,8 mm-Kanalstrukturen eine höhere Anzahl an trabekulären Strukturen bzw. ein besseres Einwachsverhalten mit Bildung von neuem Knochengewebe.



Abb. 37: Polarisationsmikroskopische Aufnahmen nach 6 Monaten (Gut mineralisierter Knochen ist mit schwarzen/gelben Stern (+) markiert, rote Pfeile verweisen auf minder mineralisierte Knochenstrukturen.)

In den polarisationsmikroskopischen Untersuchungen nach 12 Monaten (vgl. Abb. 38) konnte der fortgeschrittene Durchbau der Implantate mit Knochengewebe sowie
die Integration der Prüfkörper in das umliegende Gewebe nachgewiesen werden. Es waren keine Zeichen einer möglichen Abstoßreaktion erkennbar.





6.2.5.1 Biokompatibilität

Während des Versuchszeitraums zeigten die Tiere keine erhöhte Morbidität oder Mortalität. Keines der Tiere entwickelte im Verlauf eine Infektion der Wunde oder des Knochens. Die Gewebetoxizität durch das entstehende Wasserstoffgas scheint im physiologischen Bereich zu liegen. In der histologischen Untersuchung der Femorapräparate konnten nur vereinzelt Makrophagen und Riesenzellen nachgewiesen werden. Es konnten keine negativen Gewebereaktionen oder eine Hemmung der Knochenneubildung gezeigt werden. Unabhängig vom Zeitpunkt, konnten bei keinem der untersuchten Magnesium-, oder Titan-Prüfkörper Anzeichen für inflammatorische Prozesse nachgewiesen werden.

6.2.5.2 Knocheneinwachstum

Die Ergebnisse zum Knocheneinbau in die Probekörper der verschiedenen Kanalvarianten weisen auf ein besseres Einwachsen bei den größeren Kanälen hin. Ein günstiges Einwachsverhalten zeigte sich bei den 0,8 mm großen Kanälen. Im Bereich der Epiphyse sind in der Polarisationsmikroskopie trabekuläre Strukturen zu erkennen, die bis an den Probekörper heranreichen.

6.2.5.3 Integration in das umliegende Gewebe und Degradation

Insgesamt konnte eine gute Integration der Probekörper in die entstehende Knochenmatrix gezeigt werden. Die Porosität des Probekörpers zeigte ein gutes Knocheneinwachstum. Die kanalikulären Strukturen der Implantatkörper waren fast vollständig von gut mineralisiertem Knochen ausgekleidet bzw. von Knochenmark ausgefüllt.

Manipulationen am Implantatkörper, die im Rahmen der Einbringung entstanden waren, zeigten keinen beschleunigten bzw. vorzeitigen Abbau der Magnesiumimplantate.

6.3 Statistik

Die statistischen Ergebnisse (vgl. Tab. 6 – Tab. 9) basieren auf den erhobenen Daten der Osteomeasure Auswertung. In der nachfolgenden Aufstellung sind die Daten des Knocheneinwachstums, bezogen auf die Unterschiede zwischen den Kanalvarianten, übersichtlich zusammengefasst.

In die Bewertung der 6 Monatsgruppe wurden 22 Probekörper eingeschlossen. Die durchschnittliche Implantatoberfläche beträgt, bezogen auf die Gesamtheit der Probekörper in der 6-Monatsauswertung, 64,84mm². In Zusammenschau aller Probe-

köper (n=22) zu diesem Zeitpunkt, lässt sich eine implantatbedeckende Knochenbildung von 33,66% feststellen (vgl. Tab.6). Der Anteil an bereits gutmineralisiertem Knochen liegt hierbei durchschnittlich bei 15,76%.

6-Monatsgruppe

Implantatoberfläche							
n	sd	median	25%	75%	min	max	range
22	19,62	64,84	44,57	69,18	30,39	108,81	78,42

Gut mineralisierter Knochen								
n	sd	median	25%	75%	min	max	range	
22	7,79	15,76	8,86	19,85	5,92	36,28	30,36	

Schlecht mineralisierter Knochen							
n	sd	median	25%	75%	min	max	range
22	4.58	3.03	2.03	7.19	0	15.53	15.53

Neugebildeter Knochen gesamt								
n	sd	median	25%	75%	min	max	range	
22	8.55	20.6	15.89	25.2	5.92	39.12	33.2	

Gut mineralisierter Knochen in %								
n	sd median 25% 75% min max rar						range	
22	0.1	0.25	0.19	0.32	0.08	0.43	0.35	

Schlecht mineralisierter Knochen in %								
n sd median 25% 75% min max ran							range	
22 0.08 0.06 0.03 0.13 0 0.29 0.29								

Knochen gesamt in %								
n	sd	median	25%	75%	min	max	range	
22	12.13	33.55	27.51	43.18	7.98	56.83	48.85	

Tab. 6: Ergebnisse der statistischen Auswertung nach **6** Monaten, zusammenfassende Daten (6-Monatsgruppe, n= 22 Versuchstiere)¹⁸

Im Vergleich der einzelnen Kanalvarianten, lassen sich Unterschiede bezüglich der Knochenneubildung erkennen. Die Probeköper, der Kanalvariante 0,4 mm zeigen die geringste Knochenneubildung, mit einer durchschnittlich neugebildeten Knochenmasse, von 24,43% (vgl. Tab. 7a). Die Kanalvariante 0,6 mm zeigen eine durchschnittlich, neugebildete Knochenmasse von 35,41% (Vgl.Tab. 7b). Den größten Anteil an neugebildetem Knochen zeigen sich in der Gruppe der 0,8 mm Kanalvariante mit 41,23% (vgl. Tab.7c).

¹⁸ Quelle: Schön (2016), S. 3

	0,4 mm	0,6 mm
Knochenmasse gesamt in %	24,434	35,419

Tab. 7a: Vergleich der einzelnen Kanalvarianten anhand der neugebildeten Knochenmassein % (Differenz in Prozent %: -11,0; Signifikanz: p-Wert 0.047)

	0,4 mm	0,8 mm					
Knochenmasse gesamt in %	24,434	41,230					
Fab. 7b: Vergleich der einzelnen Kanalvarianten anhand der neugehildeten Knochenmasse							

Tab. 7b: Vergleich der einzelnen Kanalvarianten anhand der neugebildeten Knochenmassein % (Differenz in Prozent %: -16,4; Signifikanz: p-Wert 0. 047)

	0,6 mm	0,8 mm
Knochenmasse gesamt in %	35,419	41,230

Tab. 7c: Vergleich der einzelnen Kanalvarianten anhand der neugebildeten Knochenmassein % (Differenz in Prozent %: -5,8; Signifikanz: p-Wert 0.302)

Tab. 7a-c: Ergebnisse der statistischen Auswertung nach 6 Monaten, Vergleich der einzelnen Ka-
nalvarianten (6-Monatsgruppe, n= 22 Versuchstiere)

In die statistische Auswertung der 12 Monatsgruppe wurden insgesamt 30 Probekörper eingeschlossen. Die durchschnittliche Implantatoberfläche beträgt in der 12 Monatsgruppe 74.95 mm². In Zusammenschau aller Probeköper (n=30) zu diesem Zeitpunkt, lässt sich eine Implantatbedeckendes Knochenbildung von insgesamt 56.32 % feststellen (vgl. Tab. 8).

12-Monatsgruppe

Implantatoberfläche							
n	sd	median	25%	75%	min	max	range
30	22.6	74.95	54.43	95.2	28.13	103.56	75.43

Gut mineralisierter Knochen								
n	sd	median	25%	75%	min	max	range	
30	10.33	32.14	26.48	38.7	10.29	60.7	50.42	

Schlecht mineralisierter Knochen									
n	sd	median	25%	75%	min	max	range		
30	0.05	0.03	0.01	0.06	0	0.17	0.17		

Neugebildeter Knochen gesamt									
n	sd	median	25%	75%	min	max	range		
30	0.47	0.16	0.46	0.32	0.62	0.12	0.71		

Gut mineralisierter Knochen in %									
n	sd	median	25%	75%	min	max	range		
30	0.1	0.25	0.19	0.32	0.08	0.43	0.35		

¹⁹ Quelle: Schön (2016), S. 3

Schlecht mineralisierter Knochen in %									
n	n sd median 25% 75% min max range								
30	0.08	0.06	0.03	0.13	0	0.29	0.29		

Knochen gesamt in %									
n	sd median 25% 75% min max range								
30 18.34 56.32 33.72 64.32 12.45 81.67 69.22									

Tab. 8: Ergebnisse der statistischen Auswertung nach 12 Monaten, zusammenfassende Daten(12-Monatsgruppe, n= 22 Versuchstiere)

Im Vergleich der einzelnen Kanalvarianten, lassen sich Unterschiede bezüglich der Knochenneubildung erkennen. Die Probeköper, der Kanalvariante 0,4 mm zeigen, wie bereits zum Zeitpunkt von 6 Monaten, die geringste mediane Knochenneubildung mit einer durchschnittlich, neugebildeten Knochenmasse von 38,99% (vgl. Tab. 9a). Die Kanalvariante 0,6 mm zeigt eine durchschnittlich, neugebildete Knochenmasse von 55,43% (vgl. Tab. 9b). Den größten Anteil an neugebildetem Knochen zeigen sich in der Gruppe der 0,8 mm Kanalvariante mit 58,49% (vgl. Tab. 9c).

	0,4 mm	0,6 mm
Knochenmasse gesamt in %	38,987	55,432

Tab. 9a: Vergleich der einzelnen Kanalvarianten anhand der neugebildeten Knochenmassein % (Differenz in Prozent %: -16,4; Signifikanz: p-Wert 0. 047)

	0,4 mm	0,8 mm				
Knochenmasse gesamt in %	38,987	58,494				

Tab. 9b: Vergleich der einzelnen Kanalvarianten anhand der neugebildeten Knochenmassein % (Differenz in Prozent %: -19,5; Signifikanz: p-Wert 0. 023)

	0,6 mm	0,8 mm						
Knochenmasse gesamt in % 55,432 58,494								
Tab. 9c: Verdleich der einzelnen Kanalvarianten anhand der neugebildeten Knochenmasse								

Tab. 9c: Vergleich der einzelnen Kanalvarianten anhand der neugebildeten Knochenmasse in % (Differenz in Prozent %: -3,1; Signifikanz: p-Wert 0. 659)

Tab. 9a-c: Ergebnisse der statistischen Auswertung nach 12 Monaten, Vergleich der einzelnen Ka-
nalvarianten (12-Monatsgruppe, n= 22 Versuchstiere) 21

²⁰ Quelle: Schön (2016): S. 5f

²¹ Quelle: Schön (2016): S. 5f

7 Diskussion

7.1 Diskussion der Teilergebnisse bezüglich der untersuchten Parameter

In der vorliegenden Arbeit sollte ein neues Implantatdesign hinsichtlich seines Degradationsverhaltens, der Wasserstoffgas-Entwicklung und seiner Biokompatibilität untersucht werden. Untersucht wurden Implantate mit unterschiedlicher Porosität (0,4/0,6/0,8 mm), die durch die Einführung von Kanälen unterschiedlichen Durchmessers, mittels Funkenerosion, erstellt wurden. Des Weiteren sollten im Rahmen dieser Arbeit mögliche Unterschiede bezüglich der verschiedenen Kanalvarianten erarbeitet werden.

7.1.1 Degradation

Makroskopisch

Die Implantate weisen nach 12 Monaten eine deutliche, mikroskopische Veränderung ihrer Makrostruktur auf. Das metallische Erscheinungsbild der Probekörper vor der Implantation ist in den Schnitten nur noch als farbloser Restkörper zu erkennen. Farbe und Form sind der umliegenden Knochenstruktur sehr ähnlich.

Mikroskopisch

Die histologische Untersuchung zeigte augenscheinlich einen stufenweise verlaufenden Abbauprozess der Implantatkörper. Sechs Monate nach der Implantation war bereits mehr als die Hälfte des Anteils an metallischem Magnesium der Implantate abgebaut.

Das Implantatvolumen zeigte sich bis zum sechsten Monat weitestgehend konstant. Es wurde keine vollständige Degradation eines Implantats beobachtet. Innerhalb der sechsmonatigen Untersuchungszeit erschien das implantierte Magnesiummaterial in der µCT-Untersuchung als stabiles Implantat. Zu keinem Zeitpunkt konnten vorzeitige Implantatschwächen oder -brüche festgestellt werden. Nach zwölf Monaten waren die Implantate, wie erwartet, bis auf einige Restfragmente fast vollständig abgebaut. In der Histologie waren teilweise nur noch einzelne Fragmente der Implantatkörper zu erkennen. Die Implantatreste waren vollständig in das gesunde Gewebe integriert und stellenweise durch Knochen oder Knochenmark ersetzt worden. Zudem konnte gezeigt werden, dass die Beschichtung eine gewisse Belastbarkeit besitzt. Manipulationen die durch Kontakt mit scharfen Gegenständen oder Implantatkörper, die mit einem höheren Widerstand in den Knochen eingebracht worden waren, hatten, im Gegensatz zu anderen Studien (*Witte et al. 2008*), im Verlauf keine vorzeitige oder stark beschleunigte Degradation zur Folge. Eine vollständige Degradation der Probekörper, wie z.B. *Kraus et al. (2012)* für ZX50- und WZ21-Beschichtungen beobachtet hat, konnte im vorliegenden Versuch für W43 nicht gezeigt werden. In den Präparaten fanden sich auch nach 12 Monaten noch nachweisbare Reste der Probekörper.

Da die Daten der histologischen Auswertung (vgl. Abb. 35 und 36) bereits 6 Monate nach der Implantation eindeutig einen starken Abbau des metallischen Magnesiumwerkstoffes zeigten, ist davon auszugehen, dass die Magnesiumdegradations-(zwischen)-produkte in der CT-Bildgebung nicht von metallischem Magnesium unterschieden werden können und daher die CT-gestützte Volumenbestimmung keine belastbaren Aussagen über die Degradation des metallischen Magnesiumwerkstoffes zulässt.

Primärstabilität

Während des Versuchszeitraums konnten, wie bereits beschrieben, keine vorzeitige Implantatbrüche beobachtet werden, woraus eine gute Stabilität der Probekörper abgeleitet werden könnte.

7.1.2 Gasentwicklung

Es konnte gezeigt werden, dass die Entstehung von freiem Wasserstoffgas im Umfeld des Implantats mit der ablaufenden Korrosion und der Degradation des Magnesiums zusammenhängt (*Witte et al. 2008, Razavi et al. 2013*). Die langsamen Korrosionsraten des Magnesiums sind bei der Verwendung auf Hartgewebe oder Implantatoberflächen mit hoher Zytokompatibilität erforderlich, um die Eigenschaften des umgebenden Knochens nicht zu beeinträchtigen. Das im Rahmen dieser Studie untersuchte Implantatdesign scheint in mehreren Zwischenstufen zu degradieren. Beginnend mit der Korrosion der, den Probekörper umgebenden Oberflächenbeschichtung, bis zur vollständigen Degradation des Probekörpers und des metallischen Magnesiums im Zentrum der Implantatkörper. Nach vollständiger Degradation des metallischen Magnesiumanteils stagnierte die Gasfreisetzung und es kam zur Rückbildung der Volumina durch Absorption der Gaslakunen.

Die in vivo CT-Verlaufskontrolle zeigte eine messbare Gasentwicklung der Magnesium-Probekörper, deren Kinetik aber dafürspricht, dass sich zwischen den ablaufenden Degradationsprozessen, der damit einhergehenden H₂-Gasentwicklung und dem sich anschließenden Absorptionsprozess im Gewebe, ab dem 4. Monat, ein Gleichgewicht einstellt. Nach 5 Monaten kommt es zu einer Rückbildung der Gasvolumina.

Zum Zeitpunkt der maximalen Gasentwicklung konnte die Verdrängung von gesunden Gewebestrukturen durch Gaseinschlüsse beobachtet werden. Es konnten in diesem Zusammenhang aber keine negativen Gewebereaktionen oder Entzündungen nachgewiesen werden.

Sechs Monate nach der Implantation der Probekörper war im CT bei allen Kanalvarianten ein deutlicher Rückgang der Gaseinschlüsse zu verzeichnen. Die histologischen Präparate der Sechsmonatsgruppe (VG1) zeigten eine vereinzelte Verdrängung von umliegenden Gewebestrukturen durch Gasvolumina (vgl. Abb. 36). Bis zum Zeitpunkt von zwölf Monaten sind sowohl im CT, als auch in den histologischen Präparaten nahezu alle Gaseinschlüsse fast vollständig resorbiert (Abb. 31). Zusammen mit den klinischen Befunden spricht dies dafür, dass die H₂-Gasentwicklung in einem gut verträglichen Ausmaß abläuft. Eine übermäßige Gasentwicklung hätte eine negative Auswirkung auf die Knochenformation, welche im Rahmen dieses In-vivo-Versuchs nicht nachweisbar war. In der Zusammenschau der Ergebnisse aus dem Mikro-CT und der ermittelten Gasvolumina aus der CT-Analyse lässt sich sagen, dass die Entstehung größerer Gasvolumina die Knochenneubildung nicht negativ zu beeinflussen scheint.

7.1.3 Knocheneinwachstum

Sowohl die Daten aus der µCT-Bildgebung als auch die der histologischen bzw. histomorphometrischen Auswertung zeigen eine deutliche Knochenneubildung in allen Implantatvarianten. Die erhobenen Daten aus der histologischen und histomorphometrischen Auswertung zeigen, dass die Knochenneubildung proportional zur Implantatdegradation zu verlaufen scheint. Eine übermäßige Knochenreaktion mit Kallusbildung konnte zu keinem Zeitpunkt beobachtet werden. Die gewählte Makrostruktur der Implantate scheint das Knochenwachstum zu begünstigten und durch eine verbesserte Nährstoffversorgung, im Inneren des Implantats, die Integration in das umliegende Gewebe durch Zellmigration zu fördern.

Bei der computertomographischen Untersuchung präsentierte der neu gebildete Knochen ein normales radiologisches Signal und histologisch eine gute Mineralisierung. Die, vor allem in den ersten Versuchsmonaten, beschriebene Gasentwicklung scheint daher keine nachteiligen Einflüsse auf die Knochenbildung zu haben. Dass die Gasentwicklung nur einen untergeordneten Einfluss auf die Knochenbildung hat, deckt sich mit den Erkenntnissen anderer Studien, die ebenfalls trotz ausgeprägter Gasentwicklung eine deutliche Knochenneubildung nachweisen konnten (Kraus et al. 2012).

7.1.4 Biokompatibilität

In der klinischen Verlaufskontrolle zeigte sich über den gesamten Versuchszeitraum keines der Tiere verhaltensauffällig. Es waren außerdem keine Anzeichen für Infektionen oder negative Gewebereaktionen erkennbar. Im Rahmen der regelmäßigen Wundkontrolle, konnten zum Zeitpunkt von drei Monaten, bei drei der sechzig Versuchstiere subkutan emphysemartige Gasblasen getastet werden. Die Wunden zeigten sich über den gesamten Zeitraum reizlos, ohne Rötungen oder Schwellungen. Es zeigten sich also weder bei den Tieren mit Titan- noch bei den Tieren mit Magnesium-Probekörpern Gewebsirritationen oder Probleme bei der Wund- bzw.

Knochenheilung. Dies lässt den Schluss zu, dass die Magnesiumdegradation den Heilungsprozess nicht negativ beeinflusst.

In der histologischen Auswertung konnten, bei keinem der untersuchten Magnesium- bzw. Titan-Prüfkörper, weder nach 6 noch nach 12 Monaten, Anzeichen für inflammatorische Prozesse nachgewiesen werden. Dies lässt auf eine gute Biokompatibilität der Implantatkörper schließen. Vereinzelt wurden Makrophagen und Riesenzellen gesichtet, daraus lässt sich jedoch kein Anhaltspunkt für eine negative Gewebereaktion ableiten.

In den Serumanalysen konnten im Vergleich zu der Kontrollgruppe keine erhöhten Werte für Magnesium gemessen werden. Die Ergebnisse der Serumproben entsprechen denen der Studie von *Grünwald et al. (2016)*. Im Rahmen der Degradation kommt es zu einer Veränderung der Magnesiumverteilung, mit einem Maximum zum Zeitpunkt von 3 Monaten, was der maximalen Wasserstoffentwicklung und dem Fortschritt des Abbauvorgangs entspricht. Die Messwerte für die Magnesiumkonzentrationen waren stets innerhalb des für Kaninchen physiologischen Bereichs für Magnesium von 0,83 mmol/L (*Witte et al. 2010, Guo et al. 2016, Brookfield 1933, Charles 1931)*.

Bei der verwendeten Legierung handelt es sich um W43, eine Legierung mit Anteilen an Yttrium und einem geringen Anteil an Cer und Lutetium. Die maximale Konzentration der REE-Werte zum Zeitpunkt von 3/4 Monaten, ist durch die maximale Degradation der Beschichtung zu diesem Zeitpunkt zu erklären. Anders, als beispielsweise in der Studie von *Myrissa et al. (2017)*, konnte bei der laborchemischen Untersuchung der Organe, in keiner der analysierten Proben, eine Akkumulation von Gadolinium nachgewiesen werden. Die Ergebnisse der Organ-Analysen decken sich mit denen ähnlicher Studien. So konnten beispielsweise *Waizy et al. (2013)* und *Dziuba et al. (2013)* ebenfalls keine erhöhten Werte oder Akkumulationen in den Organen messen. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Implantate mit Magnesiumlegierung gut von den Tieren angenommen wurden.

7.1.5 Kanalvarianten

Um die Unterschiede der Ergebnisse, bezogen auf die jeweiligen Kanalvarianten, richtig einschätzen zu können wird an dieser Stelle zwischen den Ergebnissen nach 6 bzw. nach 12 Monaten unterschieden.

Sechs-Monats-Zeitpunkt

Trotz der erwähnten minimalen Unterschiede in der Gasentwicklung und bezüglich des Degradationsverhaltens, konnte für keine der Kanalvarianten im Untersuchungszeitraum ein signifikanter Vorteil gefunden werden. Der zu diesem Zeitpunkt in den histologischen Befunden beschriebene schlecht mieralisierte Knochen, scheint mit der Gasentwicklung zusammenzuhängen. Es kann eine Korrelation zwischen Präparaten in denen große Gasvolumina gemessen wurden und der Menge an schlechter mineralisiertem Knochen festgestellt werden.

Aus den Ergebnissen kann nur eine Tendenz abgeleitet werden. Eine mögliche Schlussfolgerung ist, dass mit den 0,8 mm Implantaten eine bessere Knochenrekonstruktion erzielt werden kann.

Zwölf-Monats-Zeitpunkt

Die Zusammenschau der erhobenen Daten aus den zwölf Monatsgruppen (VG2), spricht insgesamt für eine bessere Degradation bzw. ein besseres Einwachsverhalten mit Bildung von neuem Knochengewebe der größeren Kanalvarianten von 0,6 bzw. 0,8 mm Durchmesser.

Zusammenfassend sprechen die bislang ausgewerteten Daten für eine insgesamt gute in vivo Biokompatibilität der Magnesiumprüfkörper. Dabei scheint die Größe der Kanalstrukturen für die Knochenregeneration von besonderer Bedeutung zu sein. Die Daten der statistischen Auswertung legen einen linearen Zusammenhang zwischen der Kanalgröße und dem prozentualen Anteil der Gesamtknochenmasse nahe. Je größer die Kanalgröße, desto größer ist der prozentuale Anteil der Gesamtknochenmasse (vgl. Tab. 6 - Tab. 13).



Abb. 39: Effectplot, der einen linearen Zusammenhang zwischen der Kanalgröße und dem prozentualen Anteil der Gesamtknochenmasse, zum Zeitpunkt nach darstellt.
 (Die Kanalgröße wird in der Darstellung als stetige Variable angenommen und versucht mit einer linearen Regression den prozentualen Anteil der Gesamtknochenmasse zu erklären.)²²

Die µCT- und histologischen Analysen zeigten, im Vergleich zu den Titan-Implantaten, eine vergleichbare Knochendichte und eine vergrößerte Knochenimplantat-Kontaktfläche um die beschichteten Implantate an beiden Endpunkten. Insgesamt zeigt die Studie vielversprechende Ergebnisse für die Weiterentwicklung von beschichteten Magnesium-Implantaten für die Osteosynthese des Gesichtsskeletts.

Die Ergebnisse und Bewertungen dieser Untersuchung für die Anwendbarkeit von Magnesium als Osteosynthesematerial, beziehen sich auf die erhobenen Daten aus der durchgeführten In-vivo-Untersuchung der New Zealand White Rabbits. Auch in anderen In-vivo-Studien wurde der Einsatz von Magnesiumimplantaten zur Frakturheilung an Kleintieren, wie z.B. Kaninchen untersucht (*Thomann et al. 2010, Waizy et al. 2013, Chaya et al. 2015*). Da es keine direkte Korrelation zwischen Implantat-

²² Quelle: Schön (2016), S. 12

größe und In-vivo-Korrosionsprofil gibt, können die Ergebnisse dieser Studien allerdings nicht als direkte Voraussage und Repräsentation für das tatsächliche Abbauverhalten und die Biokompatibilität beim Menschen gewertet werden.

Einen weiteren entscheidenden Einfluss auf die Degradationsgeschwindigkeit scheint auch der Ort der Implantation zu haben (*Aghion et al. 2012*). Die Studie von *Miura et al. 2016* konnte in einem Ratten-Versuch eine schnellere Abbaugeschwindigkeit bei Implantation im Bereich des Kopfes, im Vergleich zur Lokalisation in Rücken oder Oberschenkel feststellen.

7.2 Limitierung der Studie und Ausblick für weitere Arbeiten

Trotz der langjährigen Forschung im Bereich der bioresorbierbaren Magnesiummaterialien sind noch einige Fragen ungeklärt. Für eine klinische Anwendbarkeit werden weitere Untersuchungen und detaillierte Analysen notwendig sein, um die offenen Fragen, zu diesem in vielerlei Hinsicht noch unbekannten Material, zu beantworten. Für eine Etablierung biodegradierbarer Materialien als Osteosynthese Material bedarf es eines einheitlichen und kontrollierbaren Abbauverhaltens, sowie einer vorhersagbaren Implantat-Lebensdauer. Für weitere Forschungsarbeiten auf diesem Gebiet sind nachfolgend einige Problematiken der Durchführung, sowie alternative bzw. additive Untersuchungsmethoden aufgeführt.

7.2.1 Computer Tomographische Untersuchung

Im Rahmen der Forschung stellt sich die Computertomographie (CT) als nicht sehr sensitives Verfahren zur Erfassung der Implantat-Degradation heraus *(Tian et al 2015)*. Magnesium und Knochenstrukturen lassen sich in der CT und mittels moderner CT-Softwareprogramme nur schwer voneinander unterscheiden. Hounsfield-Einheiten von Knochen und Magnesium überlappen sich. Nach dem zwölfmonatigen Versuchszeitraum ist im CT keine Degradation des Implantats nachweisbar. Dies lässt sich durch Bildartefakte zurückgebliebener, sehr feiner Magnesiumpartikel, die ein starkes CT-graphisches Signal aufweisen, erklären.

Es wurde versucht die computertomographischen Aufnahmen immer aus demselben Winkel zu machen, um Abweichungen zwischen den einzelnen Aufnahmen zu vermeiden. Für eine exakte Positionierung besteht die Möglichkeit Markierungen, ähnlich den in der Strahlentherapie verwendeten, einzusetzen, um so vergleichbare und auswertbare Bilder über den gesamten Versuchszeitraum zu erhalten.

7.2.2 Histologische Schnitte

Um vergleichbare, objektive Präparate für die histologische und histomorphometrische Auswertung zu erhalten, sollten die Präparate möglichst immer aus derselben Schicht und demselben Anschnitt der Probekörper erstellt werden. In dieser Arbeit wurde, vor der Anfertigung der Schliffe, die genaue Implantatposition mittels Röntgenaufnahme visualisiert.

Bezüglich der histologischen Auswertung ist zu beachten, dass es sich hierbei um Schliffe zur besseren Darstellung der Knochenstruktur und der Implantat-Probekörper handelt. Diese ermöglichen nur begrenzte Aussagen bezüglich der einzelnen Zellen, da durch die minimalste Schichtdicke von 8-10 µm Überlagerungsartefakte entstehen. Um gezielt nach entzündlichem Gewebe bzw. Entzündungszellen zu suchen, sollten zusätzlich Zellschnitte mit 4-5 µm angefertigt und untersucht werden.

7.2.3 Versuchsaufbau

Der für diese Studie gewählte Versuchszeitraum von 12 Monaten konnte erste Ergebnisse bezüglich der Degradation, Gasentwicklung und Knochenneubildung zeigen. Für die Beurteilung der Biokompatibilität und um Langzeiterkenntnisse der weiteren Degradation und Auswirkung von sogenannten Magnesium-Mikro partikeln (MgMPs) zu gewinnen, sollte eine weitere Studie, mit längerer Versuchsdauer, angeschlossen werden.

Um die bioresorbierbaren Magnesium-Implantatsysteme, vor allem im Bereich der Mund-Kiefer- und Gesichtschirurgie, zur klinischen Anwendung zu bringen, sollten sich weitere wissenschaftliche Untersuchungen anschließen.

Die im Bereich des Gesichtsschädels, speziell im Kiefer, herrschenden Kräfteverhältnisse und Torsionskräfte, stellen besondere Anforderungen an Osteosynthesesysteme. Bei der Erstellung des Versuchsdesigns sollte daher neben der Wahl des geeigneten Versuchstiers, besonders auf den Ort der Implantation geachtet werden. Nur so ist ein Nachweis der Belastbarkeit und Bioverträglichkeit des Materials für Osteosynthesesysteme möglich.

7.2.4 Ergänzende Untersuchungen

Um eine zusätzliche Aussage bezüglich der Zytotoxizität und Biokompatibilität machen zu können, hätte man zusätzlich eine PH-Messung im umliegenden Gewebe des Implantats, während des Abbauvorgangs, durchführen können.

Durch die Implantation der Probekörper in den mechanisch stark beanspruchten Femora der Kaninchen können erste Aussagen bezüglich der Belastbarkeit der Implantate gemacht werden. Dadurch, dass es bei keinem der sechzig implantierten Probekörper zu einem vorzeitigen Implantatversagen gekommen ist, kann eine gute Belastbarkeit des Materials angenommen werden. Um genauere Messdaten über die Belastbarkeit zu den jeweiligen Degradationszeitpunkten zu erhalten, sollten zusätzlich mechanische Belastungstests durchgeführt werden. Gute Osteosynthesematerialien zeichnen sich durch eine hohe Biegebelastbarkeit, eine geringe Duktilität, ein niedriges E-Modul sowie ein geringes Ermüdungsverhalten aus (*Arens et al. 1998*).

Die histologische Untersuchung der Magnesium-Implantatkörper lässt einen stufenweise ablaufenden Abbau des Materials, von metallischem Magnesium hin zu einem festen Reststoff, vermuten. Die mechanischen und chemischen Eigenschaften des nach zwölf Monaten noch erkennbaren Reststoffes sind noch nicht ausreichend untersucht. Um Langzeitaussagen bezüglich der Degradation treffen zu können, sollten die einzelnen Degradationsstufen und das sich bildende Zwischenmaterial noch genauer untersucht werden.

7.3 Ergebnisdiskussion in Bezug auf die Arbeitshypothesen

Die vorliegende Arbeit sollte die Durchführung, Analyse und Ergebnispräsentation einer In-vivo-Studie zur Beurteilung von bioresorbierbaren Magnesium-Implantatsystemen vorstellen. Die Annahme, dass eine der drei Kanalstrukturvarianten ein schnelleres Knocheneinwachstum bewirkt, als die beiden anderen, konnte anhand der Ergebnisse belegt werden (Tab. 6 –19). Die Magnesium-Implantatkörper der größten Kanalvariante (0,8 mm) zeigten im Vergleich, innerhalb des Beobachtungszeitraums von 12 Monaten, das günstigste osseointegrative Verhalten. Unabhängig davon, konnte eine moderate Gasentwicklung für alle Implantatvarianten gezeigt werden. Für die Bioverträglichkeit scheint hierbei entscheidend zu sein, wie schnell die Gasentwicklung eintritt und abläuft.

Darüber hinaus wurde erwartet, dass die Magnesiumimplantate unabhängig der Kanalvariante, mit guter Bioverträglichkeit, über den Zeitraum eines Jahres vollständig degradieren. Die im oberen Teil der Arbeit demonstrierten Ergebnisse zeigen, dass innerhalb des Versuchszeitraums das metallische Magnesium in allen Probekörpern vollständig degradiert ist. Nach zwölf Monaten ist nur noch das Skelett der ehemaligen Probekörper in einigen Proben nachweisbar. Der Großteil der Implantate ist vollständig degradiert. Im Rahmen der strukturiert durchgeführten klinischen, computertomographischen, sowie histologischen Untersuchungen und Verlaufskontrollen, konnten keine Anzeichen für eine Bioinkompatibilität, sprich eine Verhaltensauffälligkeit der Tiere, erhöhte Morbidität, Infektionen oder negative Gewebereaktionen, nachgewiesen werden.

Die Ergebnisse dieser umfangreichen in-vivo Studie konnten zeigen, dass es möglich ist bioresorbierbare Magnesium-Implantatsysteme mit guter Bioverträglichkeit zu entwickeln. Die Studie zeigt, dass sich die Entwicklung von biokompatiblen und degradierbaren Osteosynthesesystemen nicht am Aufbau bereits etablierter Systeme, orientieren sollte. Vielmehr sollten für das Implantatdesign neue, innovative Wege beschritten werden.

8 Zusammenfassung

Die Titanosteosynthese stellt bislang den Goldstandard in der gesamten knöchernen Traumatologie dar. Einer der großen Nachteile der nicht resorbierbaren Frakturversorgung ist, dass das Osteosynthesematerial in einem zweiten Eingriff wieder entfernt werden muss. Neben den zusätzlichen Operationsrisiken eines weiteren Eingriffs, kommt es in einigen Fällen im Bereich der Osteosynthesematerialien zu lokaler Wärme- und Kälteempfindlichkeit, Nervirritationen und Schraubenlockerung.

Aufgrund der Einschränkungen wird seit Jahren intensiv daran gearbeitet resorbierbare Osteosynthesesysteme zu entwickeln und diese zur klinischen Anwendung zu bringen. Als vielversprechendes Material gilt Magnesium, das als ein wesentlicher Bestandteil des menschlichen Körpers über günstige mechanische Eigenschaften, sowie eine gute Biokompatibilität verfügt. Speziell im Bereich der Mund-Kiefer-Gesichts-Chirurgie erhofft man sich durch die günstigen mechanischen Eigenschaften, Osteosynthesesysteme mit größerer Stabilität und geringerer Plattengröße herstellen zu können, die darüberhinaus Revisionsoperationen unötig machen.

Der genaue Mechanismus der Magnesium-Korrosion unter physiologischen Bedingungen ist jedoch noch immer nicht ausreichend verstanden. Durch intensive Studien werden immer bessere Verfahren entwickelt um den Ablauf der Degradation zu kontrollieren, zu entschleunigen und eine vorhersagbare Implantatstabilität zur erreichen. Entscheidend für eine kontrollierte Degradation, sowie eine optimale Knochenintegration scheint der Aufbau der Implantatsysteme und deren Oberflächenbeschaffenheit zu sein.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde ein neuartiges makro- und mikrostrukturiertes Implantatdesign, das mittels Funkenerosion (EDM) und moderner Keramisierungsverfahren (PEO) hergestellt worden war, in einem umfangreichen In-Vivio-Tierversuch untersucht. Im Mittelpunkt stand dabei die Analyse der Knochenneubildung und der Integration des Implantatkörpers in das umliegende Gewebe, das Degradationsverhalten, die Wasserstoffgas-Entwicklung und die Biokompatibilität der Magnesium-Implantatkörper. Dazu wurden die Implantate mit unterschiedlicher Porosität (0,4/0,6/0,8 mm) in die distale Femora von sechzig Kaninchen (sechs Monate alte New Zeeland White Rabbit) implantiert und über einen Versuchszeitraum von einem Jahr untersucht. Um für die klinische Anwendung belastbare Aussagen machen zu können, wurde das Verhalten der implantierten Magnesiumkörper, dem von etablierten Titan-Kontrollkörpern, gegenübergestellt und verglichen.

In der klinischen Verlaufskontrolle zeigte sich über den gesamten Versuchszeitraum eine gute Biokompatibilität der Implantate. Im Vergleich zu den Titan-Kontrollkörpern konnte, anhand der erhobenen Parameter, keine Unterlegenheit der Magnesium-Implantatkörper gezeigt werden. Insbesondere bezüglich der Stabilität und der Knochen-Implantat-Interaktion zeigten die Magnesium-Implantate gute Ergebnisse. Negative Gewebereaktionen durch das Magnesium konnten nicht nachgewiesen werden. Darüberhinaus konnte in der laborchemischen und histologischen Auswertung der Blutserumanalysen, sowie der Organe eine gute Biokompatibilität nachgewiesen werden.

Die Gasentwicklung wurde mittels computertomographischer Bildgebung detektiert und kontrolliert. Die Ergebnisse zeigten eine kontrollierte H₂-Gasentwicklung innerhalb der ersten fünf Monate. Innerhalb des zweiten Versuchszeitraums, bis zu zwölf Monaten, konnte keine weitere Gasentwicklung festgestellt werden. Insgesamt konnte im Rahmen des Versuchs durch die Keramik-Beschichtung ein kontrollierter Abbau der Magnesiumimplantate, zusammen mit einer verträglichen Gasentwicklung, gezeigt werden.

Das der anatomischen Knochenarchitektur nachempfundene Implantatdesign zeigte in der histologischen und histomorphometrischen Analyse ein gutes Knocheneinwachsverhalten, mit der Bildung von gut mineralisiertem Knochengewebe, auch innerhalb der Kanalstrukturen, bedingt durch eine gute Nährstoffversorgung in den Probekörpern. Ein günstiges Einwachsverhalten zeigten insbesondere die Probekörber mit einer Kanalgröße von 0,8 mm. Die Magnesium-Implantatkörper zeigten in allen Bereichen des Probekörpers eine gleichmäßige, lokalisationsunabhängige Degradation. Das vorläufige Resultat der Studie lässt den Schluss zu, dass das gewählte Implantatdesign in Kombination mit der beschriebenen Mikro-Strukturierung ein vielversprechender möglicher Kandidat für künftige Osteosynthesesysteme ist.

9 Abstract

Titanosteosynthesis is so far, the international gold standard for the bone traumatology. One of the major disadvantages associated with the use of this non-resorbable fracture treatment is, that the osteosynthesis material must be removed in a second procedure. The required removal of the plates and screws is often difficult and associated with additional operational risks and therefore not desirable. Conventional reconstruction materials may also lead to infections, allergic reactions (PLA) and unhealthy load conditions *(Titan)*. In addition to the local heat and cold sensitivity, nerve irritation and screw loosening have been observed.

Due to these limitations, during the last years intensive efforts have been made to develop resorbable osteosynthesis systems and bring them to clinical use. As an essential component of the human body, Magnesium is a promising material with favourable mechanical properties as well as good biocompatibility. Especially in the field of oral-maxillofacial surgery, it is expected, that based on the good mechanical properties, the production of osteosynthesis systems with greater stability and smaller plate size will be possible and revision operations will become unnecessary.

However, the exact mechanism of magnesium corrosion under physiological conditions is still not sufficiently understood. The limiting factor is the development of a huge amount of hydrogen gas during the magnesium degradation process. Therefore, in intensive studies improved processes are developed to control the degradation behaviour.

The aim is to achieve a biocompatible deceleration with a predictable implant stability. For a controlled degradation as well as for an optimal bone integration the structure of the implant systems and their surface texture seems to be essential.

Within the scope of the present work, a novel macro- and micro structured implant design, which had been produced by means of spark erosion (EDM) and modern ceramization (PEO), was investigated in a comprehensive in vivo animal experiment. The focus was on the analysis of the new bone formation and the integration

of the implant body into the surrounding tissue, the degradation behaviour, the hydrogen gas development and the biocompatibility of the magnesium implants. For this purpose, implants with different porosity (0.4 / 0.6 / 0.8 mm) were implanted in the distal femora of sixty rabbits (six-month-old New Zeeland White Rabbits) and examined over a trial period of one year. To make reliable statements about the clinical application, the behaviour of the implanted magnesium bodies was compared with that of established titanium implants.

Over the entire trial period the clinical monitoring demonstrated a good biocompatibility of the implants. Based on the collected parameters no inferiority of the magnesium implants could be observed compared to the titanium bodies. Particularly regarding the stability and bone-implant interaction, the magnesium implants showed good results. No negative tissue reactions could be detected. In addition, a good biocompatibility could be demonstrated in the laboratory-chemical and histological evaluation of the blood serum und the organ analyses.

The gas evolution was observed and controlled by computer tomography. The results showed a controlled H_2 gas evolution within the first five months. Within the second test period, up to twelve months, no further development of H_2 gas could be detected. Within the framework of the trial a controlled degradation of the magnesium implants, along with a compatible gas evolution, could be demonstrated for the ceramic coating.

In the histological and histomorphometric analysis, the implant design, which is modelled based on the anatomical bone architecture, showed a good bone growth with the formation of well-mineralized bone tissue also within the canal structures, due to a good nutrient supply of the samples. Especially the sample bodies with a channel size of 0.8 mm showed a favourable ingrowth behaviour. The magnesium implant bodies showed in all areas of the sample body a uniform and localization independent degradation.

The preliminary result of the study indicates that the chosen implant design in combination with the described micro-structuring is a promising candidate for future osteosynthesis systems.

10 Anhang

10.1 Gegenüberstellung gängiger Methoden und Versuchsdesigns – Literaturrecherche

Quelle (Titel)	Journal	Jahr	Spezies
Biocompatibility and degradation of LAE442-based magnesium al- loys after implantation of up to 3.5years in a rabbit model.	Acta Biomaterialia.	2016	rabbit
In vivo degradation of a new concept of magnesium-based rivet- screws in the minipig mandibular bone	Mater Sci Eng C Mater Biol App	2016	minipig
In vivo degradation of magnesium plate/screw osteosynthesis im- plant systems: Soft and hard tissue response in a calvarial model in miniature pigs	Journal of Cranio-Maxil- lofacial Surger	2015	minipig
In vivo study of magnesium plate and screw degradation and bone fracture healing.	Acta Biomaterialia.	2015	rabbit
In vivo study of nanostructured akermanite/PEO coating on biode- gradable magnesium alloy for biomedical applications.	J Biomed Mater Res A.	2015	rabbit
Long-term in vivo degradation behaviour and biocompatibility of the magnesium alloy ZEK100 for use as a biodegradable bone implant.	Acta Biomaterialia.	2013	rabbit
Biodegradable magnesium implants for orthopedic applications.	Journal of Materials Science	2013	rabbit
In vivo behavior of biodegradable Mg-Nd-Y-Zr-Ca alloy	J Mater Sci Mater Med.	2012	rat
Comparison of morphological changes in efferent lymph nodes after implantation of resorbable and non-resorbable implants in rabbits	Biomed Eng Online.	2011	rabbit
Biocompatibility of magnesium-zinc alloy in biodegradable ortho- pedic implants.	Int J Mol Med.	2011	rabbit
Biocompatibility and strength retention of biodegradable Mg-Ca-Zn alloy bone implants	J Biomed Mater Res B Appl Biomater.	2012	rabbit
Load-bearing capacity and biological allowable limit of biodegrada- ble metal based on degradation rate in vivo	J Biomed Mater Res B Appl Biomater.	2012	rabbit
Long-term in vivo degradation behaviour and biocompatibility of the magnesium alloy ZEK100 for use as a biodegradable bone im- plant.	Acta Biomater.	2012	rabbit
Biomechanical testing and degradation analysis of MgCa0.8 alloy screws: a Save items comparative in vivo study in rabbits.	Acta Biomater.	2011	rabbit
Evaluation of the soft tissue biocompatibility of MgCa0.8 and surgical steel 316L in vivo: a comparative study in rabbits	Biomed Eng Online.	2010	rabbit
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	rabbit
In vivo corrosion mechanism by elemental interdiffusion of biode- gradable Mg–Ca alloy	J Biomed Mater Res B Appl Biomater.	2012	rat
Magnesium alloys for temporary implants in osteosynthesis: in vivo studies of their degradation and interaction with bone.	Acta Biomater.	2012	rat
Fast escape of hydrogen from gas cavities around corroding mag- nesium implants.	Acta Biomater.	2012	mouse
Fluoride and calcium-phosphate coated sponges of the magne- sium alloy AX30 as bone grafts: a comparative study in rabbits	J Mater Sci Mater Med.	2013	rabbit
In vivo testing of a bioabsorbable magnesium alloy serving as total ossicular replacement prostheses.	J Biomater Appl.	2014	rabbit

Assessment of cellular reactions to magnesium as implant material in comparison to titanium and to glyconate using the mouse tail model.	J Appl Biomater Funct Mater.	2013	mouse
Comparison of the effects of Mg–6Zn and titanium on intestinal tract in vivo	J Mater Sci Mater Med.	2013	rat
Ex vivo examination of the biocompatibility of biodegradable mag- nesium via microdialysis in the isolated perfused bovine udder model.	Int J Artif Organs.	2011	cow, isola- ted udder
Influence of a magnesium-fluoride coating of magnesium-based implants (MgCa0.8) on degradation in a rabbit model	J Biomed Mater Res A.	2009	rabbit
Influence of the grain size on the in vivo degradation behaviour of the magnesium alloy LAE442.	Proc Inst Mech Eng H.	2013	rabbit
In vivo degradation behavior and biocompatibility of Mg-Nd-Zn-Zr alloy at early stage	Int J Mol Med.	2012	rabbit
Biodegradable magnesium scaffolds: Part II: Peri-implant bone re- modeling	J Biomed Mater Res A.	2007	rabbit
Biodegradable magnesium scaffolds: Part 1: appropriate inflam- matory response.	J Biomed Mater Res A.	2007	rabbit
In vivo corrosion and corrosion protection of magnesium alloy LAE442	Acta Biomater.	2010	rabbit
In vivo corrosion behavior of Mg-Mn-Zn alloy for bone implant ap- plication	J Biomed Mater Res A.	2007	rabbit
In vitro corrosion behavior and in vivo biodegradation of biomedi- cal β- Ca3(PO4)2/Mg-Zn composites.	Acta Biomater.	2012	rabbit
In vivo evaluation of biodegradable magnesium alloy bone implant in the first 6 months implantation.	J Biomed Mater Res A.	2009	rabbit
On the in vitro and in vivo degradation performance and biological response of new biodegradable Mg-Y-Zn alloys	Acta Biomater.	2010	pig
Effect of a plasmaelectrolytic coating on the strength retention of in vivo and in vitro degraded magnesium implants.	Acta Biomater.	2012	pig (minipig)
In vitro and in vivo evaluation of biodegradable, open-porous scaf- folds made of sintered magnesium W4 short fibres.	Acta Biomater.	2013	rabbit
Bone-implant interface strength and osseointegration: Biodegrada- ble magnesium allov versus standard titanium control.	Acta Biomater.	2011	rat
In vitro and in vivo evaluations on osteogenesis and biodegradabil- ity of a b-tricalcium phosphate coated magnesium alloy	J Biomed Mater Res A.	2011	rat
In vivo degradation and bone response of a composite coating on Mg–Zn–Ca alloy prepared by microarc oxidation and electrochemical deposition	J Biomed Mater Res B Appl Biomater.	2011	rabbit
Drynda et al Biocompatibility of fluoride-coated mag [J Biomed Mater Res A. 2013] - PubMed	J Biomed Mater Res A.	2013	mouse
In vivo degradation performance of micro-arc-oxidized magnesium implants: a micro-CT study in rats.	Acta Biomater.	2013	rat
Comparison of degradation behavior and the associated bone re- sponse of ZK60 and PLLA in vivo.	J Biomed Mater Res A.	2013	rat
Design and assessment of a wrapped cylindrical Ca-P AZ31 Mg alloy for critical-size ulna defect repair	J Biomed Mater Res B Appl Biomater.	2011	rat
A surface-eroding poly(1,3-trimethylene carbonate) coating for fully biodegradable magnesium-based stent applications: Toward better biofunction, biodegradation and biocompatibility.	Acta Biomater.	2013	rat
In vivo degradation behavior of Ca-deficient hydroxyapatite coated Mo–Zn–Ca allov for bone implant application	Colloids Surf B Biointer- faces.	2011	rabbit
A biodegradable polymer-based coating to control the perfor- mance of magnesium alloy orthopaedic implants	Biomaterials	2010	rabbit
In vitro and in vivo evaluation of the surface bioactivity of a calcium phosphate coated magnesium alloy.	Biomaterials	2009	rabbit
In vivo biocompatibility and degradation behavior of Mg alloy coated by calcium phosphate in a rabbit model	J Biomater Appl.	2012	rabbit
In vivo study of magnesium plate and screw degradation and bone fracture healing.	Acta Biomater.	2000	rabbit

10.2 Versuchstiere und Einteilung in Gruppen

OP Gruppe	Standzeit (Monate)	Ken- nung	Probekör- per	PK- Durch- messer	OP-Da- tum	Ge- wicht in gr.	Bein	Implantat- Material	OP-Zeit (Min)	CT-Kon- trolle	Organe entnom- men	Euthanasie- rungs-datum	Einbringung des Probekörpers
1	6	C3533?	BIO-065- P10	0,8mm	04.06.15	3840	re	Titan	10		ja	30.07.15	schwierig
1	6	C35672	BIO-056- P03	0,8mm	26.01.15	3700	re	Mg	28		ja	30.07.15	einfach
1	6	C35306	BIO-056- P08	0,8mm	29.01.15	2770	li	Mg	17		ja	30.07.15	schwierig
1	6	C35452	BIO-056- P10	0,8mm	29.01.15	3330	li	Mg	15		ja	30.07.15	einfach
1	6	C35895	BIO-056- P09	0,8mm	29.01.15	3395	li	Mg	12		ja	30.07.15	einfach

Tab. 10: Versuchstiere OP Gruppe 1 mit 0,8 mm Probekörpern und Standzeit 6 Monate

OP Gruppe	Standzeit (Monate)	Ken- nung	Probekör- per	PK- Durch- messer	OP-Da- tum	Gewicht in gr.	Bein	Implantat- Material	OP-Zeit (Min)	CT-Kon- trolle	Organe entnom- men	Euthanasie- rungs-datum	Einbringung des Probekörpers
1	6	C35875	BIO-064- P10	0,6mm	01.06.15	3830	re	Titan	15		ja	30.07.15	einfach
1	6	C35296	BIO-055- P01	0,6mm	27.01.15	3560	re	Mg	25		ja	30.07.15	schwierig
1	6	C35322	BIO-055- P06	0,6mm	27.01.15	3610	re	Mg	25		ja	30.07.15	schwierig
1	6	C35206	BIO-055- P09	0,6mm	29.01.15	3306	re	Mg	15		ja	30.07.15	einfach
1	6	C35839	BIO-055- P10	0,6mm	29.01.15	4180	li	Mg	18		ja	30.07.15	einfach

Tab. 11: Versuchstiere OP Gruppe 1 mit 0,6 mm Probekörpern und Standzeit 6 Monate

OP Gruppe	Standzeit (Monate)	Ken- nung	Probekör- per	PK- Durch- messer	OP-Da- tum	Gewicht in gr.	Bein	Implan- tat-Mate- rial	OP-Zeit (Min)	CT-Kon- trolle	Organe entnom- men	Euthanasie- rungs-datum	Einbringung des Probekörpers
1	6	C35453	BIO-063- P10	0,4mm	01.06.15	3455	li	Titan	12		ja	30.07.15	einfach
1	6	C35904	BIO-054- P02	0,4mm	28.01.15	4630	re	Mg	32		ja	30.07.15	einfach
1	6	C35192	BIO-054- P04	0,4mm	28.01.15	3150	re	Mg	17			Vorzeitig (Frak- tur)	schwierig
1	6	C35864	BIO-054- P07	0,4mm	28.01.15	3740	re	Mg	20		ja	30.07.15	schwierig
1	6	C3518?	BIO-054- P10	0,4mm	28.01.15	3056	li	Mg	18		ja	30.07.15	schwierig

Tab. 12: Versuchstiere OP Gruppe 1 mit 0,4 mm Probekörpern und Standzeit 6 Monate

OP Gruppe	Standzeit (Monate)	Ken- nung	Probekör- per	PK- Durch- messer	OP-Da- tum	Gewicht in gr.	Bein	Implan- tat-Mate- rial	OP-Zeit (Min)	CT-Kon- trolle	Organe entnom- men	Euthanasie- rungs-datum	Einbringung des Probekör- pers
2	6	C35854	BIO-065- P07	0,8mm	04.06.15	4010	li	Mg	15		ja	09.12.15	einfach
2	6	C35335	BIO-065- P05	0,8mm	04.06.15	3140	li	Mg	15		ja	09.12.15	einfach
2	6	C35823	BIO-065- P04	0,8mm	04.06.15	3670	re	Mg	12		ja	09.12.15	einfach
2	6	C35376	BIO-065- P02	0,8mm	04.06.15	3310	re	Mg	10		ja	09.12.15	einfach

Tab. 13: Versuchstiere OP Gruppe 2 mit 0,8 mm Probekörpern und Standzeit 6 Monate

OP Gruppe	Standzeit (Monate)	Ken- nung	Probekör- per	PK- Durch- messer	OP-Da- tum	Gewicht in gr.	Bein	Implan- tat-Mate- rial	OP-Zeit (Min)	CT-Kon- trolle	Organe entnom- men	Euthanasie- rungs-datum	Einbringung des Probekörpers
2	6	C35299	BIO-064- P09	0,6mm	01.06.15	3570	re	Mg	16		ja	09.12.15	einfach
2	6	C35778	BIO-064- P08	0,6mm	01.06.15	3910	li	Mg	30		ja	09.12.15	schwierig
2	6	C35896	BIO-064- P04	0,6mm	01.06.15	3210	li	Mg	12		ja	09.12.15	einfach
2	6	C35295	BIO-064- P03	0,6mm	01.06.15	3290	re	Mg	20		ja	09.12.15	schwierig

Tab. 14: Versuchstiere OP Gruppe 2 mit 0,6 mm Probekörpern und Standzeit 6 Monate

OF Grup	pe (Monate)	Ken- nung	Probekör- per	PK- Durch- messer	OP-Da- tum	Gewicht in gr.	Bein	Implan- tat-Mate- rial	OP-Zeit (Min)	CT-Kon- trolle	Organe entnom- men	Euthanasie- rungs-datum	Einbringung des Probekörpers
	2 (6 C35165	BIO-063- P08	0,4mm	01.06.15	3050	li	Mg	15		ja	09.12.15	einfach
	2 (6 C35332	BIO-063- P06	0,4mm	01.06.15	3840	re	Mg	19		ja	09.12.15	einfach
	2 (6 C35691	BIO-063- P05	0,4mm	01.06.15	3430	li	Mg	12		ja	09.12.15	einfach
	2 (6 C35155	BIO-063- P01	0,4mm	04.06.15	3030	re	Mg	11			Vorzeitig (Frak- tur)	schwierig

Tab. 15: Versuchstiere OP Gruppe 2 mit 0,4 mm Probekörpern und Standzeit 6 Monate

OP Gruppe	Standzeit (Monate)	Ken- nung	Probekör- per	PK- Durch- messer	OP-Da- tum	Gewicht in gr.	Bein	Implan- tat-Mate- rial	OP-Zeit (Min)	CT-Kon- trolle	Organe entnom- men	Euthanasie- rungs-datum	Einbringung des Probekörpers
1	12	C35275	BIO-056- P13	0,8mm	26.01.15	3700	re	Mg	24	х	ja	21.01.16	einfach
1	12	C35913	BIO-056- P04	0,8mm	26.01.15	3430	re	Mg	22		ja	21.01.16	einfach
1	12	C35156	BIO-056- P05	0,8mm	26.01.15	3320	re	Mg	26	х	ja	21.01.16	schwierig
1	12	C35847	BIO-056- P06	0,8mm	26.01.15	3880	li	Mg	32	х	ja	21.01.16	schwierig
1	12	C35?60	BIO-056- p07	0,8mm	28.01.15	2840	li	Mg	15		ja	21.01.16	einfach

Tab. 16: Versuchstiere OP Gruppe 1 mit 0,8 mm Probekörpern und Standzeit 12 Monate

OP Gruppe	Standzeit (Monate)	Ken- nung	Probekör- per	PK- Durch- messer	OP-Da- tum	Gewicht in gr.	Bein	Implan- tat-Mate- rial	OP-Zeit (Min)	CT-Kon- trolle	Organe entnom- men	Euthanasie- rungs-datum	Einbringung des Probekörpers
1	12	C35756	BIO-055- P02	0,6mm	27.01.15	3220	li	Mg	17	х	ja	21.01.16	schwierig
1	12	C35844	BIO-055- P03	0,6mm	27.01.15	3250	li	Mg	15		ja	21.01.16	schwierig
1	12	C35514	BIO-055- P04	0,6mm	27.01.15	3450	re	Mg	25	х	ja	21.01.16	schwierig
1	12	C35490	BIO-055- P05	0,6mm	27.01.15	3300	re	Mg	25	х	ja	21.01.16	schwierig
1	12	C35200	BIO-055- P08	0,6mm	29.01.15	3350	li	Mg	12		ja	21.01.16	einfach

Tab. 17: Versuchstiere OP Gruppe 1 mit 0,6 mm Probekörpern und Standzeit 12 Monate

OP Gruppe	Standzeit (Monate)	Ken- nung	Probekör- per	PK- Durch-	OP-Da- tum	Gewicht in gr.	Bein	Implan- tat-Mate-	OP-Zeit (Min)	CT-Kon- trolle	Organe entnom-	Euthanasie- rungs-datum	Einbringung des Probekörpers
				messer		_		rial			men		
1	12	C35643	BIO-054- P03	0,4mm	28.01.15	3890	li	Mg	20	x	ja	21.01.16	einfach
1	12	C35333	BIO-054- P05	0,4mm	28.01.15	2850	li	Mg	18		ja	21.01.16	einfach
1	12	C35450	BIO-054- P06	0,4mm	28.01.15	3080	re	Mg	23	x	ja	21.01.16	schwierig
1	12	C35522	BIO-054- P08	0,4mm	28.01.15	3400	li	Mg	22	x	ja	21.01.16	schwierig
1	12	C35227	BIO-054- P09	0,4mm	28.01.15	3060	re	Mg	10		ja	21.01.16	schwierig

 Tab. 18: Versuchstiere OP Gruppe 1 mit 0,4 mm Probekörpern und Standzeit 12 Monate

OP Gruppe	Standzeit (Monate)	Ken- nung	Probekör- per	PK- Durch- messer	OP-Da- tum	Gewicht in gr.	Bein	Implan- tat-Mate- rial	OP-Zeit (Min)	CT-Kon- trolle	Organe entnom- men	Euthanasie- rungs-datum	Einbringung des Probekörpers
2	12	C35678	BIO-056- P01	0,8mm	26.01.15	3400	re	Titan	10		ja	01.06.2016	schwierig
2	12	C35205	BIO-065- P09	0,8mm	04.06.15	3560	li	Mg	10		ja	01.06.2016	einfach
2	12	C35557	BIO-065- P08	0,8mm	04.06.15	3760	re	Mg	8		ja	01.06.2016	einfach
2	12	C35857	BIO-065- P06	0,8mm	04.06.15	4000	re	Mg	13		ja	01.06.2016	einfach
2	12	C35690	BIO-065- P03	0,8mm	04.06.15	4020	li	Mg	11		ja	01.06.2016	einfach
2	12	C35334	BIO-065- P01	0,8mm	04.06.15	3320	li	Mg	12		ja	01.06.2016	einfach

Tab. 19: Versuchstiere OP Gruppe 2 mit 0,8 mm Probekörpern und Standzeit 12 Monate

OP Gruppe	Standzeit (Monate)	Kennung	Probekör-	PK- Durch-	OP-Da- tum	Ge- wicht	Bein	Implan- tat-Mate-	OP-Zeit (Min)	CT-Kon- trolle	Organe entnom-	Euthanasie- rungs-datum	Einbringung des Probekörpers
Crappo	(monato)		po.	messer		in gr.		rial	()		men	rango datam	
2	12	C3526?	BIO-055- P13	0,6mm	27.01.15	3000	li	Titan	30	х	ja	01.06.2016	einfach
2	12	C35882	BIO-064- P07	0,6mm	01.06.15	4190	li	Mg	14		ja	01.06.2016	einfach
2	12	C35838	BIO-064- P06	0,6mm	01.06.15	3920	re	Mg	18		ja	01.06.2016	einfach
2	12	C35380	BIO-064- P05	0,6mm	01.06.15	3640	re	Mg	15		ja	01.06.2016	einfach
2	12	C35680	BIO-064- P02	0,6mm	01.06.15	3120	li	Mg	21		ja	01.06.2016	einfach
2	12	C35289	BIO-064- P01	0,6mm	01.06.15	3760	li	Mg	25		ja	01.06.2016	einfach

Tab. 20: Versuchstiere OP Gruppe 2 mit 0,6 mm Probekörpern und Standzeit 12 Monate

OP Gruppe	Standzeit (Monate)	Kennung	Probekör- per	PK- Durch- messer	OP-Da- tum	Ge- wicht in gr.	Bein	Implan- tat-Mate- rial	OP-Zeit (Min)	CT-Kon- trolle	Organe entnom- men	Euthanasie- rungs-datum	Einbringung des Probekörpers
2	12	C35321	BIO-054- P13	0,4mm	28.01.15	2900	li	Titan	15	x	ja	01.06.2016	einfach
2	12	C35164	BIO-063- P09	0,4mm	01.06.15	3060	re	Mg	25		ja	01.06.2016	einfach
2	12	C35865	BIO-063- P07	0,4mm	01.06.15	3056	re	Mg	20		ja	01.06.2016	einfach
2	12	C35827	BIO-063- P04	0,4mm	04.06.15	3887	re	Mg	15		ja	01.06.2016	einfach
2	12	C35479	BIO-063- P03	0,4mm	04.06.15	3400	li	Mg	30		ja	01.06.2016	schwierig
2	12	C35647	BIO-063- P02	0,4mm	04.06.15	3630	li	Mg	15		ja	01.06.2016	einfach

Tab. 21: Versuchstiere OP Gruppe 2 mit 0,4 mm Probekörpern und Standzeit 12 Monate

10.3 Bewertungssystem zur Auswertung der histologischen Präparate

(Selbst erstellter Bewertungsbogen zur Beurteilung der histologischen Proben)

Quantität an neugebildetem Knochen

0 - kein Knochen

1 - gering: vereinzelte Stellen des Probekörpers sind von Knochen umwachsen

2 - mittel: an mehreren Stellen ist der Probekörper deutlich von Knochenmasse umwachsen

3 - viel: die Mehrheit der Oberfläche des Probekörpers sind von Knochen bedeckt

4- Probekörper ist vollständig in den Knochen eingewachsen

Einwachsverhalten (Eindringtiefe des gebildeten Knochens in das Implantat)

0 – kein Knochen

1 - gering: neugebildeter Knochen ist an der äußeren Oberfläche des Probekörpers nachweisbar, kein Wachstum in den inneren Kanalstrukturen erkennbar

2 - mittel: Knochenwachstum hauptsächlich an der äußeren Oberfläche des Probekörpers nachweisbar, an einzelnen Kanalstrukturen ist das Einwachsen von Knochen zu erkennen

3 - viel: Knochen durchwächst das Implantat, sowohl an der äußeren Oberfläche des Probekörpers, auch in den Kanalstrukturen ist Knochenmasse nachweisbar

Qualität des gebildeten Knochens

0 - keine Knochenbildung zu erkennen

1 – schmaler Knochensaum mit Ostoblasten erkennbar, Anlage zur Knochenbildung

2 - unreifer Knochen, angelegter Knochen ist noch nicht vollständig mineralisiert

3 - vollständig ausgereifte, gesunde Knochenstrukturen

Degradationsgrad des Probekörpers

0 - kein: Magnesium-Probekörper ist noch vollständig erhalten, kompakte Probekörperstruktur ohne Aufhellungen

1 – gering: überwiegend Kompakte Magnesium-Areale, vereinzelt jedoch Aufhellungen durch Abbauvorgänge erkennbar.

2 - fortgeschritten: größere Wolken, sowie kleinere sternförmige Magnesium-Nester erkennbar, überwiegend degeneriertes helles Probekörper-Skelett zu beobachten

3 - stark fortgeschritten: nur noch vereinzelte Magnesium-Pigmente erkennbar

4 - Probekörper vollständig degradiert, kein Probekörper mehr nachweisbar

Gasentwicklung

0 - große Mengen an Gas, die gesundes Knochenmark und umliegendes Gewebe signifikant verdrängen

1 - große Gasblasen/PK ist umgeben von Luft gefülltem Hohlraum

2 - vereinzelt kleinere Blasen/Lufteinschlüsse erkennbar

3 - kein Nachweis von Gas

Verdrängung von gesundem Knochengewebe durch Gasentwicklung

0 - massive Verdrängung von gesundem Gewebe und Knochenmark über das direkte Umfeld des PK hinaus

1 - an mehreren Stellen kann eine Verdrängung von Umliegenden Gewebe beobachtet werden, jedoch nur in direkter Nachbarschaft zum PK/ überwiegend Stellen des direkten Knochen-Implantat Kontakt

2 - geringe Verdrängung kann an vereinzelten stellen beobachtet werden

3 - kein Einfluss auf das umliegende Gewebe

Entzündungreaktionen (Einwanderung von Entzündungszellen)

0 - keine Zeichen einer laufenden oder abgelaufenen Entzündungsreaktion

1 - geringe Zeichen einer statt gehabten Entzündung

2 - Entzündungszellen bei noch intakter Knochenstruktur

3 - deutliche Entzündung mit Zeltuntergang und Eiterbildung erkennbar

11 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AO	Arbeitsgemeinschaft für Osteosynthesefragen
Aufl.	Auflage
BIC	Bone Implantat Contact
BIOMAGIK	Bioresorbierbare Magnesium-Implantate für den individuellen Knochen- einsatz
BV	Bone Volume (Knochenvolumen)
bzw.	beziehungsweise
С	Grad Celsius
ca.	circa
CH	Schweiz (Confoederatio Helvetica)
cm ³	Kubikzentimeter
СТ	Computertomographie
d.h.	das heißt
EDM	Electrical Discharge Machining (Funkenerodieren/Funkenerosion)
etc.	et cetera
f.	folgende
FELASA	Federation of European Laboratory Animal Science Associations
Gd	Gadolinium
ggf.	gegebenenfalls
h	Hour / Stunde
H ₂	Wasserstoff
HE	Hämatoxylin-Eosin
H-E	Hounsfield-Einheiten
i.m.	intramuskulär
IL-1	Interleukin 1
IL-2	Interleukin 2
inkl	inklusiv
IOBM	Institut für Osteologie und Biomechanik (UKE Hamburg)
KG	Körpergewicht

kg	Kilogramm
kV	Kilovolt
М.	Musculus
mg	Milligramm
Mg	Magnesium
MgMP	Magnesium-Mikropartikel
MKG	Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie
mm	Millimeter
ms	Millisekunde
NZW	New Zealand White Rabbits
OP	Operation
PEO	Plasma elektrolytischen Oxidation, Plasmakeramik-Verfahren
pg/l	Pikogramm pro Liter
PK	Probekörper
PLA	Polylactic Acid (Polymilchsäuren)
REEs	Rare Earth Elements (Seltene Erden)
ROI	Region of Interests
S.	Seite
S.C.	subkutan
S.O.	siehe oben
s.u.	siehe unten
sd	Standardabweichung
Tab.	Tabelle
Ті	Titan
TNF	Tumornekrosefaktor
TV	Total Volume (Totalvolumen)
u.	und
u.U.	unter Umständen
UKE	Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
VG1	Versuchsgruppe 1 (6-Monatsgruppe)

VG2	Versuchsgruppe 2 (12-Monatsgruppe)
Vol.	Volume
z.B.	Zum Beispiel
μA	Mikroampere
μCT	Mikro-CT (Mikro-Computertomographie)
μm	Mikrometer

12 Literaturverzeichnis

Abed E, Moreau R (2007): Importance of melastatin-like transient receptor potential 7 and cations (magnesium, calcium) in human osteoblast-like cell proliferation. Cell Prolif, 40(6): 849-865.

Aghion E, Levy G, Ovadia S (2012): In vivo behavior of biodegradable Mg-Nd-Y-Zr-Ca alloy. Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 23(3), March 2012, 805–812.

Al-Samman T, Gottstein G (2008): Dynamic recryustallization during high temperature deformation of magnesium. Materials Science and Engineering A, 490(1), August 2008: 411-420.

Al-Samman T, Lia X, Chowdhury GS (2011): Orientation dependent slip and twinning during compression and tension of strongly textured magnesium AZ31 alloy Materials Science and Engineering: A V527(15), June 2010: 3450–3463.

Arens S, Martin H (1998): Implantate in der Unfallchirurgie: Osteosynthese mit Titan. Deutsches Ärzteblatt 1998; 95(24): A-1516 / B-1288 / C-1208.

Bayani H, Saebnoori E (2009): Effect of rare earth elements addition on thermal fatigue behaviors of AZ91 magnesium alloy. Journal of Rare Earths 27(2), April 2009: 255-258.

Bergsma JE, Rozema FR, Bos RRM, van Rozendaal AWM, de Jong WH, Teppema JS (1995a): Biocompatibility and degradation mechanisms of predegraded and nonpredegraded poly(lactide) implants: an animal study. J Materials Science: Materials in Medicine 1995; 6:715-24.

Bergsma JE, Rozema FR, Bos RR, Boering G, de Bruijn WC, Pennings AJ (1995b): In vitro predegradation at elevated temperatures of poly(lactide). Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 6(11), November 1995: 642–646.

BIOMAGIK, Projektdesign (2011): Biokompatibilitätsanalyse degradierbarer Magnesiumimplantate für individuelle Knochendefekte (Finaler Antrag). Meotec, Aachen.

Black J, (2005): Biological performance of materials: Fundamentals of biocompatibility. 4. Auflage, Taylor & Franice Group, New York.

Bobyn JD, Stackpool GJ, Hacking SA, Tanzer M, Krygier JJ (1999): Characteristics of bone ingrowth and interface mechanics of a new porous tantalum biomaterial. J Bone Joint Surg Br., 81(5), September 1999: 907-14.

Brookfield, RW (1933): Variations in the concentrations of magnesium, calcium and inorganic phosphorus in the serum of the rabbit. Biochem. J. 27(1): 173.

Caires HR, Esteves T, Quelhas, Barbosa MA, Navarro M, Almeida CR (2016): Macrophage interactions with polylactic acid and chitosan scaffolds lead to improved recruitment of human mesenchymal stem/stromal cells: a comprehensive study with different immune cells. J R Soc Interface. 13(122), September 2016: pii: 20160570. doi: 10.1098/rsif.2016.0570.

Castellani C, Lindtner RA, Hausbrandt P, Tschegg E, Stanzl-Tschegg SE, Zanoni G, Beck S, Weinberg AM (2011): Bone–implant interface strength and osseointegration:

bio- degradable magnesium alloy versus standard titanium control. Acta Biomaterialia, 7(1), January 2011: 432–440.

Charles E, (1931): Comparative studies of sex differences in calcium and magnesium content of serum. Quarterly journal of experimental physiology 21(1), April 1931: 81–89.

Chaushu G, Manor Y, Shoshani Y, Taicher S (2000): Risk factors contributing to symptomatic plate removal in maxillofacial trauma patients. Plast Reconstr Surg., 105(2), Febrary 2000: 521-525.

Chaya A, Yoshizawa S, Verdelis K, Myers N, Costello BJ, Chou DT, Pal S, Maiti S, Kumta PN, Sfeir C (2015): In vivo study of magnesium plate and screw degradation and bone fracture healing. Acta Biomaterialia, 18, May 2015: 262-269.

Chen XB, Birbilis N, Abbott TB (2011): Review of Corrosion-Resistant Conversion Coatings for Magnesium and Its Alloys. Corrision Journal of Sience and Engineering, 67(3), March 2011: 035005-1-035005-16.

Cipriano A.F, A. Sallee, R.G. Guan, Z.Y. Zhao, M. Tayoba, J. Sanchez, et al (2015): Investigation of magnesium–zinc–calcium alloys and bone marrow derived mesenchymal stem cell response in direct culture. Acta Biomaterialia, 12, January 2015: 298–321.

Ding W, (2016a): Opportunities and challenges for the biodegradable magnesium alloys as next generation biomaterials. Regenerative Biomaterials, 3(2), June 2016: 79–86.

Ding Y, Lin J, Wen C, Zhang D, Li Y (2016b): Mechanical properties, in vitro corrosion and biocompatibility of newly developed biodegradable Mg-Zr-Sr-Ho alloys for biomedical applications. Scientific Reports, 6, August 2016: 31990.

Drynda A, Deinet N, Braun N, Peuster M (2009): Rare earth metals used in biodegradable magnesium-based stents do not interfere with proliferation of smooth muscle cells but do induce the upregulation of inflammatory genes. J Biomed Mater Res A., 91(2), November 2009:360-369.

Dziuba D, Meyer-Lindenberg A, Seitz JM, Waizy H, Angrisani N, Reifenrath J (2013): Long-term in vivo degradation behaviour and biocompatibility of the magnesium alloy ZEK100 for use as a biodegradable bone implant. Acta Biomaterialia, 9(10), November 2013: 8548-8560.

Edwards RC, Kiely KD, Eppley BL (2001): Fixation of bimaxillary osteotomies with resorbable plates and screws: experience in 20 consecutive cases. Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, 59(3), March 2001: 271–276.

Erdmann N, Angrisani N, Reifenrath J, Lucas A, Thorey F, Bormann D, Meyer-Lindenberg A (2011): Biomechanical testing and degradation analysis of MgCa0.8 alloy screws: a comparative in vivo study in rabbits. Acta Biomaterialia, 7(3), March 2011: 1421-1428.

Erdsach T, (2004): Die Geschichte der Deutschen Gesellschaft für Mund-, Kiefer, Gesichtschirurgie Deutsche Gesellschaft für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie e.V., Hofheim.
Farraro KF, Kim KE, Woo SL, Flowers JR, McCullough MB (2014): Revolutionizing orthopaedic biomaterials: the potential of biodegradable and bioresorbable magnesium-based materials for functional tissue engineering.J Biomech., 47(9), June 2014: 1979-86.

Fielding GA, Smoot W, Bose S (2013): Effects of SiO, SrO, MgO, and ZnO dopants in tricalcium phosphates on osteoblastic Runx2 expression. J Biomed Mater Res A., 2(7), July 2014: 2417-26.

Fischer J, Prosenc MH, Wolff M, Hort N, Willumeit R, Feyerabend F (2010): Interference of magnesium corrosion with tetrazolium-based cytotoxicity assays. Acta Biomaterialia, 6(5), May 2010: 1813–1823.

Fischerauer SF, Kraus T, Wu X, Tangl S, Sorantin E, Hänzi AC, Löffler JF, Uggowitzer PJ, Weinberg AM (2013): In vivo degradation performance of micro-arc- oxidized magnesium implants: a micro-CT study in rats. Acta Biomaterialia, 9(2), February 2013: 5411–5420.

Fukuda A, Takemoto M, Saito T, Fujibayashi S, Neo M, Pattanayak DK, Matsushita T, Sasaki K, Nishida N, Kokubo T, Nakamura T (2011): Osteoinduction of porous Ti implants with a channel structure fabricated by selective laser melting. Acta Biomaterialia, 7(5), May 2011: 2327–2336.

Gerlach KL, (2000): Resorbable polymers as osteosynthesis material Mund Kiefer Gesichtschir., 4(1), May 2000: 91-102.

Grünewald TA, Rennhofer H, Hesse B, Burghammer M, Stanzl-Tschegg SE, Cotte M, Löffler JF, Weinberg AM, Lichtenegger HC (2016): Magnesium from bioresorbable implants: Distribution and impact on the nano- and mineral structure of bone. Biomaterials, 76, January 2016: 250–260.

Guillen J, (2012): FELASA Guidelines and Recommendations. Journal of the American Association for Laboratory Animal Science, 51(3), May 2012: 311-321.

Guo C, Li J, She C,2, Shao X, Teng B, Feng J, Zhang JV, Ren PG (2016): Bioeffects of micron-size magnesium particles on inflammatory cells and bone turnover in vivo and in vitro. J Biomed Mater Res B Appl Biomater., 104(5), July 2016: 923-31.

Guzman R, Looby JF, Schendel SA, Edwards MS (2011): Fronto-orbital advancement using an en bloc frontal bone craniectomy Neurosurgery 68 (1 Suppl Operative), March 2011: 68-74.

Han HS, Kim YY, Kim YC, Cho SY, Cha PR, Seok HK, Yang SJ (2012): Bone formation within the vicinity of biodegradable magnesium alloy implant in a rat femur model. Metals and Materials International 18(2), April 2012: 243–247.

Hausamen JE, Machtens E, Reuther JF, Eufinger, H Kübler, A Schliephake, H (Hrsg.) (2011): Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie. 4. Auflage, Springer Verlag, Berlin.

Hayashi K, Kaneko H, Kawachi S, Saida T (1999): Allergic contact dermatitis and osteomyelitis due to sternal stainless steel wire. Contact Dermatitis, 41: 115–116. Hayden G, Woodard JI, Arrigo RT, Lorenz HP, Schendel SA, Edwards MS, et al (2013): Using bioabsorbable fixation systems in the treatment of pediatric skull deformities leads to good outcomes and low morbidity. Childs Nerv Syst, 29(2), February 2013: 297-301.

He LY, Zhang XM, Liu B, Y. Tian, Ma WH (2016): Effect of magnesium ion on human osteoblast activity Brazilian Journal of Medical and Biological Research 49(7), July 2016.

Herold G, (Hrsg.) (2015): Innere Medizin 2016 Herold Gerd, Köln.

Hollinger JO, Mysels, K.J. (1986): Biodegradable Bone Repair Materials Synthetic Polymers and Ceramics. Clin Orthop Relat Res., 207, June 1986: 290-305.

Hong D, Saha P, Chou DT, Lee B, Collins BE, Tan Z, Dong Z, Kumta PN (2013): In vitro degradation and cytotoxicity response of Mg-4% Zn-0.5% Zr (ZK40) alloy as a potential biodegradable material. Acta Biomaterialia, 9(10), November 2013: 8534–8547.

Horch HH, (2006): Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie: Praxis der Zahnheilkunde Band 10. 4. Auflage, Elsevier, München.

Hornberger H, Virtanen S, Boccaccini AR (2012): Boccaccini, Biomedical coatings on magnesium alloys - a review. Acta Biomaterialia, 8(7), July 2012: 2442–2455.

Huse EC, (1878): A new ligature? Chicago Medical Journal and Examine, 37: 171-172.

Jacobi-Gresser E (2011): Periimplantitis und Titanimplantatverlust unter immunologischen und genetischen Aspekten. Deutscher Berufsverband der Umweltmediziner, umwelt.medizin.gesellschaft 24/2 2011: 100-103.

Jorgenson DS, Mayer MH, Ellenbogen RG, Centeno JA, Johnson FB, Mullick FG, Manson PN (1997): Detection of titanium in human tissues after craniofacial surgery. Plast Reconstr Surg., 9(4), April 1997: 976-979.

Kanzaki N, Onuma K, Treboux G, Tsutsumi S, Ito A (2001): Effect of Impurity on Two-Dimensional Nucleation Kinetics: Case Studies of Magnesium and Zinc on Hydroxyapatite Face. J. Phys. Chem. B, 105 (10), February 2001: 1991–1994.

Kieswetter K, Schwartz Z, Dean DD, Boyan BD (1996): The role of implant surface characteristics in the healing of bone. Critical Reviews in Oral Biology and Medicine. Critical Reviews in Oral Biology & Medicine 7(4), February 1996:329-45

Kirkland NT, Waterman J, Birbilis N, Dias G, Woodfield TB, Hartshorn RM, Staiger MP (2011): Buffer-regulated biocorrosion of pure magnesium. J Mater Sci Mater Med. 23(2), February 2012 :283-91.

Kraus T, Fischerauer S, Haenzi A, Uggowitzer P, Loeffler J, Weinberg A (2012): Magnesium alloys for temporary implants in osteosynthesis: in vivo studies of their degradation and interaction with bone. Acta Biomaterialia, 8(3), March 2012: 1230-1238.

Lambotte A, (1932): L'utilisation du magnesium comme materiel perdudansl'osteosynthè se. Bull MémSoc Nat Chir 28: 1325–1334. Landes CA, Ballon A, Roth C (2006a): In-patient versus in vitro degradation of P(L/DL) LA and PLGA. J Biomed Mater Res B Appl Biomater.76(2), February 2006: 403-411.

Landes CA, Ballon A, Roth C (2006b): Maxillary and mandibular osteosyntheses with PLGA and P(L/DL) LA implants: a 5-year inpatient biocompatibility and degradation experience. Plast Reconstr Surg. 117(7), June 2006: 2347-60.

Landes CA, Ballon A, Roth C (2006c): Indications and limitations in resorbable P(L70/30DL) LA osteosyntheses of displaced mandibular fractures in 4.5-year followup. Plast. Reconstr Surg. 117(2), February 2006: 577-87.

Landes CA, Meyer C, Kleinheinz J (2009): Surgical treatment of condylar neck and head fractures: Resorbable systems. In: Fractures of the Mandibular Condyle: Basic Considerations and Treatment. Quintessenz Verlag, Berlin.

Landi, Logroscino G, Proietti L, Tampieri A, Sandri M, Sprio S. (2008): Biomimetic Mg-substituted hydroxyapatite: from synthesis to in vivo behaviour. J Mater Sci Mater Med. 19(1), January 2008:239-47.

Martinez Sanchez AH, Luthringer BJ, Feyerabend F, Willumeit R (2015): Mg and Mg alloys: how comparable are in vitro and in vivo corrosion rates? A review. Acta Biomater., Febrary 2015: 16-31

Marukawa E, Tamai M, Takahashi Y, Hatakeyama I, Sato M, Higuchi Y, Kakidachi H, Taniguchi H, Sakamoto T, Honda J, Omura K, Harada H (2016): Comparison of magnesium alloys and poly-I-lactide screws as degradable implants in a canine fracture model. J Biomed Mater Res B Appl Biomater., 104(7), October 2016 Oct: 1282-1289.

Meredith N, Shagaldi F, Alleyne D, Sennerby L, Cawley P (1997): The application of resonance frequency measurements to study the stability of titanium implants during healing in the rabbit tibia. Clin Oral Implants Res. 8(3), June 1997:234-43.

Miura C, Shimizu Y, Imai Y, Mukai T, Yamamoto A, Sano Y,Ikeo N, Isozaki S, Takahashi T, Oikawa M (2016): In vivo corrosion behaviour of magnesium alloy in association with surrounding tissue response in rats. Biomedical Materials, 11(2), March 2016: 025001

Myrissa A, Agha NA, Lu Y, Martinelli E, Eichler J, Szakács G, Kleinhans C, Willumeit-Römer R, Schäfer U, Weinberg AM (2015): In vitro and in vivo comparison of binary Mg alloys and pure Mg. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl., 61, April 2016: 865-874.

Myrissa A, Braeuer S, Martinelli E, Willumeit-Römer R, Goessler W, Weinberg AM (2017): Gadolinium accumulation in organs of Sprague-Dawley® rats after implantation of a biodegradable magnesium-gadolinium alloy. Acta Biomaterialia, 48, January 2017: 521–529.

Neff A, Kolk A, Deppe H, Horch HH (1999): New aspects for indications of surgical management of intra-articular and high temporomandibular dislocation fractures. Mund Kiefer Gesichtschir. 3(1), January 1999: 24-9.

Ng WF, Chiu KY, Cheng FT (2010): Effect of pH on the in vitro corrosion rate of magnesium degradable implant material. Mat. Sci. Eng. C Mater., 30(2010), July 2010: 898–903.

Nöthe T, (2001): Funkenerosive Mikrobearbeitung von Stahl und Hartmetall durch Schneiden mit dünnen Drähten. Dissertation RWTH Aachen, Shaker Verlag, Herzogenrath.

Payne KF, Balasundaram I, Deb S, Di Silvio L, Fan KF (2014): Tissue engineering technology and its possible applications in oral and maxillofacial surgery. British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, 52(1), January 2014: 7–15.

Ragamouni S, Kumar JM, Mushahary D, Nemani H, Pande G (2013): Histological analysis of cells and matrix mineralization of new bone tissue induced in rabbit femur bones by Mg–Zr based biodegradable implants. Acta Histochem., 115(7), September 2013:748-56.

Razavi M, Fathi M, Savabi O, Vashaee D, Tayebi L (2015): In vivo study of nanostructured akermanite/PEO coating on biodegradable magnesium alloy for biomedical applications. J Biomed Mater Res A., 103(5), May 2015: 1798-1808.

Rettig R, Virtanen S (2009): Composition of corrosion layers on a magnesium rareearth alloy in simulated body fluids. J Biomed Mater Res A., 88(2), Febrary 2009: 359-69.

Robinson DA, Griffith RW, Shechtman D, Evans RB, Conzemius MG (2010): In vitro antibacterial properties of magnesium metal against Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa and Staphylococcus aureus. Acta Biomaterialia6 (2010): 1869–1877.

Saris NE, Mervaala E, Karppanen H, Khawaja JA, Lewenstam A (2000): Magnesium. An update on physiological, clinical and analytical aspects. Clin. Chim. Acta, 294(1-2), April 2000: 1–26.

Scarano, Di Carlo F, Quaranta M, Piattelli A (2003): Bone response to zirconia ceramic implants: an experimental study in rabbits. J Oral Implantol. 29(1):8-12.

Schaller B, Saulacic N, Beck S, Imwinkelried T, Goh BT, Nakahara K, Hofstetter W, Iizuka T (2016): In vivo degradation of a new concept of magnesium-based rivetscrews in the minipig mandibular bone. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl., 69, December 2016: 247-54.

Schaller B, Saulacic N, Imwinkelried T, Beck S, Liu EWY, Gralla J, Nakahara K, Hofstetter W, Iizuka T (2015): In vivo degradation of magnesium plate/screw osteosynthesis implant systems: Soft and hard tissue response in a calvarial model in miniature pigs. Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery, 44(3), March 2016: 309–317.

Schmitz JP, Hollinger JO (1986): The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. Clin Orthop Relat Res. 1986 Apr;(205):299-308.

Schön, Gerhard (2017): Auswertung für das "BIOMAGIK"-Projekt. Version 1.2, Unversitätsklinikum Hamburg-Eppendorf.

Schumann P, Lindhorst D, Wagner ME, Schramm A, Gellrich NC, Rücker M (2013): Perspectives on resorbable osteosynthesis materials in craniomaxillofacial surgery Pathobiology 80(4): 211-217.

Shadanbaz S, Dias GJ (2012): Calcium phosphate coatings on magnesium alloys for biomedical applications: a review. Acta Biomaterialia, 8(1), January 2012: 20–30.

Siebers FJ, (1994): Funkenerosives Senken mit wässrigen Arbeitsmedien Grundlagen, Technologie und Wirtschaftlichkeit, Dissertation, RWTH Aachen.

Song GL, (2007): Control of biodegradation of biocompatible magnesium alloys corrosion Corrosion Science 49(4), April 2007: 1696–1701.

Song GL, Atrens A (2003): Understanding magnesium corrosion – a framework for improved alloy performance. Advanced Engineering Materials, 5(12), December 2003: 837–858.

Staiger MP, Pietak AM, Huadmai J, Dias G (2006): Magnesium and its alloys as orthopedic biomaterials: a review. Biomaterials, 27(9), March 2006: 1728–1734.

Statistisches Bundesamt, (2015): Die 50 häufigsten Operationen der vollstationären Patientinnen und Patienten in Krankenhäusern (Rang, Anzahl, Anteil in Prozent). (http://www.gbe-bund.de/oowa921-install/servlet/oowa/aw92/dboowasys921.xwde-vkit/xwd_init?gbe.isgbetol/xs_start_neu/&p_aid=i&p_aid=47057617&num-mer=666&p_sprache=D&p_indsp=-&p_aid=49685203, zugegriffen am 05.02.2017)

Suuronen R, Pohjonen T, Hietanan J, Lindqvist C (1998): A 5-year in vitro and in vivo study of the biodegradation of polylactide plates. J Oral Maxillofac Surg. 56(5), May 1998: 604-14.

Thomann M, Krause C, Angrisani N, Bormann D, Hassel T, Windhagen H (2010): Influence of a magnesium-fluoride coating of magnesium-based implants (MgCa0. 8) on degradation in a rabbit model. Journal of Biomedical Materials Research 93(4), June 2010: 1609-19.

Thomas P, Barnstorf S, Summer B (1999): Allergologische Aspekte der Bioverträglichkeit von Titanbasisimplantaten. Statusbericht FORBIOMAT 1999.

Tian P, Liu X (2015): Surface modification of biodegradable magnesium and its alloys for biomedical applications. Regenerative Biomaterials, 2(2), June 2015:135-51.

Verbrugge J, (1934): Le matériel métallique résorbable en chirurgie osseuse. La Press Med 23, 460-465.

Waizy H, Seitz JM, Reifenrath J, Weizbauer A, Bach FW, Meyer-Lindenberg A, Denkena B, Windhagen H (2013): Biodegradable magnesium implants for orthopedic applications. Journal of Materials Science, 48(1), January 2013: 39–50.

Waksman R, Pakala R, Kuchulakanti PK, Baffour R, Hellinga D, Seabron R, Tio FO, Wittchow E, Hartwig S, Harder C, Rohde R, Heublein B, Andreae A, Waldmann KH, Haverich A (2006): Safety and efficacy of bioabsorbable magnesium alloy stents in porcine coronary arteries. Catheter Cardiovasc Interv., 68(4), October2006: 607-17.

Walker J, Shadanbaz S, Kirkland NT, Stace E, Woodfield T, Staiger MP, Dias GJ. (2012): Magnesium alloys: predicting in vivo corrosion with in vitro immersion testing. J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater. 100 (2012): 1134–1141.

Wang J, Tang J, Zhang P, Li Y, Lai Y, Qin L (2012): Surface modification of magnesium alloys developed for bioabsorbable orthopedic implants: a general review. J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater., 100(6), August 2012: 1691–1701.

Wang X, Meng X, Chu S, Xiang X, Liu Z, Zhao J, Zhou Y (2016): Osseointegration behavior of novel Ti-Nb-Zr-Ta-Si alloy for dental implants: an in vivo study. J Mater Sci Mater Med., 27(9), September 2016: 139.

Weng D, Stock V, Schliephake H (2011): Are socket and ridge preservation techniques at the day of tooth extraction efficient in maintaining the tissues of the alveolar ridge? European journal of oral implantology. European Journal of Oral Implantology, 4(5), January 2011: 59-66.

Windhagen H, Radtke K, Weizbauer A, Diekmann J, Noll Y, Kreimeyer U, Schavan R, Stukenborg-Colsman C, Hazibullah W (2013): 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. BioMedical Engineering OnLine 2013.

Witte F, Hort N, Vogt C, S. Cohen S, Kainer KU, Willumeit R, Feyerabend F (2008): Degradable biomaterials based on magnesium corrosion. Current Opinion in Solid State and Materials Science, 12(5-6), October–December 2008: 63-72.

Xin YC, Hu T, Chu PK (2011a): In vitro studies of biomedical magnesium alloys in a simulated physiological environment: a review. Acta Biomater., 7(4), April 2011: 1452-9.

Xin YC, Hu T, Chu PK (2011b): Degradation behaviour of pure magnesium in simulated body fluids with different concentrations of HCO3. Corrosion Science, 53 (4), April 2011: 1522-1528.

Xue et al. 2011, Yun, Y.; Schulz, M.J.; Shanov, V. (2011): Corrosion protection of biodegradable magnesium implants using anodization Materials Science and Engineering: C 31(2), March 2011: 215-223.

Yang JX, Cui FZ, Lee IS, Zhang Y, Yin QS, Xia H, Yang SX (2012): In vivo biocompatibility and degradation behavior of Mg alloy coated by calcium phosphate in a rabbit model. J Biomater, 27(2), August 2012: 153-64.

Yang L, Huang Y, Feyerabend F, Willumeit R, Mendis C, Kainer KU, Hort N (2013): Microstructure, mechanical and corrosion properties of Mg-Dy-Gd-Zr alloys for medical applications. Acta Biomater. 9(10), November 2013: 8499-508.

Yang X, Lib M, Linc X, Tanc L, Lanb G, Lib L, Yinb Q, Xiab H, Zhangb Y, Yangc K (2013): Enhanced in vitro biocompatibility/bioactivity of biodegradable Mg-Zn-Zr alloy by micro-arc oxidation coating contained Mg2SiO4 Surface and Coatings Technology 233, October 2013: 65–73.

Yao J, Glant TT, Lark MW, Mikecz K, Jacobs JJ, Hutchinson NI, Hoerrner LA, Kuettner KE, Galante JO (1995): The potential role of fibroblasts in periprosthetic osteolysis: fibroblast response to titanium particles. Journal of bone and mineral research, 10 (9): 1417–1427.

Yazdimamaghani M, Razavi M, Vashaee D, Moharamzadeh K, Boccaccini AR, Tayebi L (2016): Porous Magnesium-Based Scaffolds for Tissue Engineering. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl 71, November 2016: 1253-1266.

Zartner P, Cesnjevar R, Singer H, Weyand M (2005): First successful implantation of a biodegradable metal stent into the left pulmonary artery of a preterm baby. Catheter Cardiovasc Interv., 66(4), December 2005: 590-594.

13 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei allen Menschen bedanken, ohne die diese Arbeit in dieser Form wohl mit Sicherheit nie zustande gekommen wäre.

Mein außerordentlicher Dank richtet sich an Herrn Prof. Dr. Dr. Ralf Smeets für die Bereitstellung des spannenden Themas und die Möglichkeit zur selbständigen Durchführung und Betreuung dieses bedeutungsvollen Projekts. Insbesondere danke ich ihm für das entgegengebrachte Vertrauen und die Unterstützung und Förderung seit Beginn meiner Zeit als seine Doktorandin.

Mein besonderer Dank gilt Priv.-Doz. Dr. Dr. Henning Hanken, der meine Arbeit mitbetreut hat und mir vor allem in der Anfangsphase des Projekts stets mit Rat und Tat zur Seite stand und mich an entscheidenden Punkten motiviert hat.

Der Firma Meotec danke ich für die Bereitstellung der innovativen Implantat-Systeme und die gute Zusammenarbeit.

Vielen Dank dem Institut für Osteologie und Biomechanik, insbesondere Dr. Michael Hahn, für die fachlichen Diskussionen und Elke Leicht für die gute Zusammenarbeit bei der Aufarbeitung unserer Gewebeproben.

Ebenfalls möchte ich Dr. Aline Reitmeier meinen Dank aussprechen, für die gute medizinische Betreuung der Versuchstiere während des Versuchszeitraums und die großartige Unterstützung bei der Im- sowie Explantation der Probeköper.

Herrn Dr. Götz Egerter spreche ich meinen Dank aus, da er mir als Mentor und Vorbild seit Beginn meines Studiums zur Seite gestanden hat.

Ich danke meinen Eltern, die mich in meinem bisherigen Werdegang unterstützt und immer wieder bestärkt haben.

Bei meinem Bruder möchte ich mich an dieser Stelle für den großen Rückhalt und die mentale Stärkung bedanken.

Vielen Dank für die großartige Unterstützung an alle die zu dieser Arbeit beigetragen haben.

14 Lebenslauf

PERSÖNLICHE DATEN	Name wohnhaft in	Tiziana Füger Hamburg	
	geb.	03.09.1990 in Tübingen	
SPRACHKENNTNISSE	Englisch	6 Jahre, Schulkenntnisse	
	Französisch	4 Jahre, Schulkenntnisse	
	Spanisch	3 Jahre, Schulkenntnisse, Internationale Dele-spanisch-Prüfung B1	Spanischprüfung:
SCHULAUSBILDUNG	1997 – 2001 2001 - 2006 2006 - 2010	Grundschule, Dorfackerschule Kepler-Gymnasium Wirtschafts-Gymnasium Abschluss: Abitur	Tübingen Tübingen Tübingen
BERUFLICHE ERFAHRUNG	Seit 01/2017	Assistentärztin in der Allgemein-und Visczeralchirurgie (UKE)	Hamburg
	2013 – 2016 (Semesterferien)	MKG Praxisklinik Dr. Egerter	Reutlingen
	08/2015 – 07/2016	Kongressassistentin DGMKG Kongress 2016 bei Prof. Heiland	Hamburg
WISSENSCHAFTLICHE ARBEIT	Seit 2015	Forschungsprojekt: In-vivo-Studie zu bio- degradiebaren Osteosynthesystemen im Rahmen der Doktorarbeit	
STUDIUM	2010 – 2016	Studium der Humanmedizin	Hamburg
	13.12.2016	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfur fung, Approbation)	ng (Abschlussprü-
	06/2016 – 09/2016	 3. PJ-Tertial: Allgemein-und Visczeralchirurgie (Unfallchirurgie (Prof. Rueger) UKE Hamburg 	Prof. Izbicki)
	03/2016 - 06/2016	2. PJ-Tertial: Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie (Prof. H UKE Hamburg	leiland)
	11/2015 – 03/2016	1. PJ-Tertial: Innere Medizin (Onkologie/Kardiologie kemeyer/ Dr. med. von Amsberg),	e), (Prof. Bo-

UKE Hamburg

	16.10.2015	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (2. Staatsexa- men)
FAMULATUREN	08 – 09/2013	Praxisklinik für Mund-Kiefer-Gesichts- und Plastische Chi- rurgie, Dr. med. dent. Egerter, Reutlingen
	08 – 09/2014	Mund–Kiefer-Gesichtschirurgie-Marienhospital (Dr. Dr. Fil- lies), Stuttgart
PRAKTIKA	10/2014	Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie, Plastische Operationen, Asklepios Nord (Prof. Kreusch), Hamburg
	09/2014	Plastische Gesichtschirurgie Marienhospital (Prof. Gubisch), Stuttgar
	09/2011	Israelitisches-Krankenhaus (Innere Medizin), Hamburg
	07/2011	Klinikum Ingolstadt (Orthopädie), Ingolstadt
	02/2011	Katharinenhospital (Unfall-Chirurgie), Stuttgart
	10/2008	Universitätsklinikum Tübingen - Klinik für Kinderheilkunde und Jugendmedizin Uni-Kinder-Klinik, Tübingen
	06/2008	Altersheim Pauline-Krone-Heim (Demenz-Station), Tübingen
	05/2007	Adler-Apotheke, Tübingen

15 Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Ich erkläre, versichere und gewährleiste, dass vorliegende Publikation frei von Rechten Dritter ist und nicht gegen geltendes Recht verstößt. Insbesondere ist geltendes Urheberrecht beachtet worden und ich bin Eigentümer aller Rechte an dem vorliegenden Werk und Eigentümer der für die Veröffentlichung notwendigen Rechte, Lizenzen o.ä. Ich stelle die Staats- und Universitätsbibliothek Hamburg von allen aus der Veröffentlichung der vorliegenden Arbeit von Dritten geltend gemachten Ansprüchen jedweder Art frei und trete unverzüglich nach bekannt werden an deren Stelle.

Unterschrift: