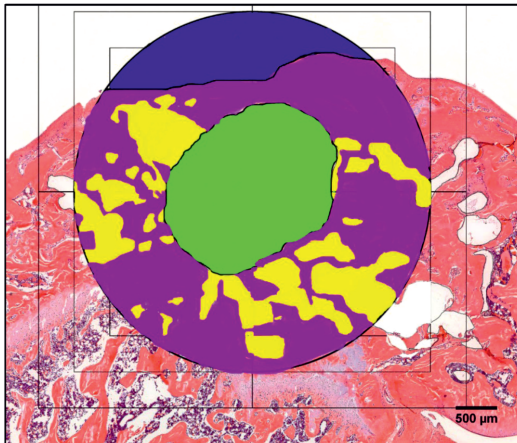


CHRISTINA GÖTZ

Magnesiumwerkstoffe als resorbierbare Implantatmaterialien im Rattenmodell



Inauguraldissertation zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei dem Autoren dieses Werkes.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung der Autoren oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2020

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Authors or the Publisher.

1st Edition 2020

© 2020 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, 35396 GIESSEN, GERMANY
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Magnesiumwerkstoffe als resorbierbare Implantatmaterialien im Rattenmodell

Inauguraldissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der
Medizin des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Götz, Christina

aus Bayreuth

Gießen, 2019

Aus dem Labor für experimentelle Unfallchirurgie
der Klinik und Poliklinik für Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Direktor: Univ.-Prof. Dr. Dr. Christian Heiß

Gutachterin: Prof. Dr. Katrin Susanne Lips

Gutachter: Prof. Dr. Dr. Hans-Peter Howaldt

Tag der Disputation: 2. März 2020

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung.....	1
1.1 Entwicklung biodegradabler Implantate.....	4
1.1.1 Interaktionen zwischen Mg-Implantaten und Gewebe	5
1.1.2 Korrosion von Mg-Implantaten	6
1.2 Biodegradable Mg-haltige Implantate für Osteosynthese.....	7
1.2.1 Freisetzung von Wasserstoff aus Mg-Implantaten.....	10
1.3 Morphologie von Röhrenknochen.....	11
1.3.1 Zelluläre Funktionen im Knochenstoffwechsel	12
1.3.2 Blutversorgung von Röhrenknochen	14
1.4 Zielstellungen.....	15
2 Material und Methoden.....	16
2.1 Tierversuche	16
2.1.1 Versuchsgenehmigung und Tierhaltung.....	16
2.1.2 Einteilung der Versuchsgruppen	17
2.1.3 Intraossäre Implantation Mg-haltiger Schrauben.....	17
2.2 Histologische Techniken und Färbungen	19
2.3 Histomorphometrie von H ₂ -Gasblasen im Knochengewebe	20
2.3.1 Histomorphometrische Messung von Distanzen	21
2.3.2 Histomorphometrische Messung von Flächen.....	23
2.4 Histochemische Methoden	28
2.4.1 Tartrat-resistente saure Phosphatase (TRAP)	28
2.4.2 Alkalische Phosphatase (ALP).....	29
2.4.3 Immunhistochemische Untersuchungen – PECAM-1.....	29
2.5 Statistische Methoden.....	31
3 Ergebnisse.....	32
3.1 Histologische Auswertung	32
3.1.1 Versuchsgruppe W4 1-mal verpresst 6 Wo.....	32
3.1.2 Versuchsgruppe W4 2-mal verpresst 6 Wo.....	33
3.1.3 Versuchsgruppe W4 1-mal verpresst 12 Wo.....	34
3.1.4 Versuchsgruppe W4 2-mal verpresst 12 Wo.....	35
3.1.5 Versuchsgruppe Mg-HA-Komposit 12 Wo.....	36
3.2 Histomorphometrie der H ₂ -Gasblasen im Knochengewebe	37

3.2.1 Messung der größten Distanzen von Gasblasen.....	37
3.2.2 Testmessung der Fläche von Gasblasen	38
3.2.3 Gasblasenfläche in Zone 3 (AOI 1,007 mm ²)	39
3.2.4 Gasblasenfläche in Zone 4 (AOI 1,282 mm ²)	40
3.2.5 Flächenmessung aller Gasblasen in der gesamten AOI (14,468 mm ²)	41
3.3 Enzymnachweise im Knochengewebe	43
3.3.1 Tartrat-resistente saure Phosphatase (TRAP)	43
3.3.2 Intergruppaler Vergleich der Häufigkeit TRAP-positiver Zellen.....	48
3.3.3 Alkalische Phosphatase (ALP).....	50
3.3.4 Intergruppaler Vergleich der Häufigkeit ALP-positiver Zellen	55
3.4 Immunhistochemischer Nachweis von PECAM-1 positiven Zellen.....	57
4 Diskussion	62
4.1 Methoden zur Messung der Degradation von Mg-Implantaten	62
4.2 Steuerung der Korrosion von Mg-Implantaten	65
4.3 Diskussion histochemischer Ergebnisse	71
5 Ausblick	73
6 Zusammenfassung.....	75
7 Summary	76
8 Abkürzungsverzeichnis	78
9 Tabellenverzeichnis	81
10 Abbildungsverzeichnis	81
11 Literaturverzeichnis	83
12 Ehrenwörtliche Erklärung	91
13 Danksagung.....	92
14 Tabellarischer Lebenslauf	93

1 Einleitung

Jährlich werden weltweit bei Millionen von Patienten Implantate zur Stabilisierung des Knochensystems, zum Ersatz von Knochen und Knorpel und zur Wiederherstellung von Funktion und Ästhetik eingesetzt. Die Indikationen sind vielfältig und implizieren Traumata, Instabilität an Gelenken und der Wirbelsäule, ossäre und kartilaginäre Erkrankungen sowie kongenitale Deformitäten. Nach aktuellen Angaben des Statistischen Bundesamtes Wiesbaden (Destatis) und dem Robert-Koch-Institut Berlin (RKI) wurden im Jahr 2017 in Deutschland 162.000 Osteosynthesen bzw. Implantationen von alloplastischem Knochenersatz vorgenommen (Destatis und RKI, 2017).

Zu diesen medizinischen Fortschritten hat die Forschung in der Vergangenheit mit profunden Erkenntnissen über das Finden und Bewerten von Einsatzmöglichkeiten stabiler und biokompatibler Werkstoffe, wie z.B. rostfreiem Stahl und Titan beigetragen (Rüedi, 1975). Damit hätte auf Grund der hervorragenden materialimmanenten Eigenschaften dieser zwei Metalle die materialrelevante Entwicklung hinsichtlich Stabilität und Biokompatibilität abgeschlossen sein können.

Das schien auch so, als es in der Medizin an bildgebenden Verfahren lediglich die „klassische“ Röntgenaufnahme gab. Das änderte sich mit dem Einsatz der Computertomografie (CT) und Magnetresonanztomografie (MRT), da Implantate aus Stahl und Titan zu Artefaktbildung und Bildstörung führten. Daraus resultierte eine der Intentionen zur Suche nach geeigneteren Werkstoffen für Implantate.

Es war ein entscheidender Meilenstein in der Entwicklung der medizinischen Implantationstechnik, als Anfang der 90iger Jahre des 20. Jahrhunderts (Jh.) Implantate, wie z.B. Pedikelschrauben, Pedikelstäbe und Cages, aus Karbon entwickelt wurden. Diese stehen seit ca. fünf Jahren für den klinischen Einsatz zur Verfügung und könnten eine wichtige Alternative zu metallischen Instrumenten werden (Kurtz und Devine 2007). Kohlenfaserverstärkte Implantate aus Polyetheretherketon (PEEK) besitzen eine Matrix aus PEEK und diese Matrix bekommt durch das Einbringen dieser Kohlefasern eine den metallischen Implantaten vergleichbare Festigkeit und Biokompatibilität (Wu et al. 2012). Zwei wesentliche Vorteile von kohlenfaserverstärktem Karbon (CF-PEEK) sind die deutliche Reduktion von Artefakten bei Bildgebung im Operationsgebiet und der im Vergleich zu Titan minimierte Shielding-Effekt (Kuchling 2011). Die Reduktion dieses Effektes bedeutet, dass im Gegensatz zu Titan der Elastizitätsmodul von CF-PEEK dem von kortikalem Knochen entspricht, so dass eine unerwünschte Lastverteilung vom stabilisierten Knochen auf benachbarte Gelenke verhindert wird.

1 Einleitung

Sind mit der hier dargestellten Entwicklung des Materials von Implantaten sehr gute Bedingungen für Ergebnisse der Erstoperation geschaffen, so können sich dennoch im postoperativen Verlauf Probleme ergeben, die sich aus dem immer höher werdenden Alter der Patienten ergeben. Seit einigen Jahren gibt es eine gravierende demografische Entwicklung in Deutschland sowie in weiteren Industrieländern dahingehend, dass ein deutlich ansteigendes Alter der Bevölkerung zu verzeichnen ist (Statistisches Bundesamt 2011). In dieser statistischen Erhebung wurde die Altersstruktur in Deutschland von 2008 mit einer Hochrechnung für das Jahr 2030 verglichen. Für das Jahr 2008 betrug der prozentuale Anteil der Bevölkerung mit einem Alter > 65 Jahre bei Männern 16,7 % und bei Frauen 20 %. Für das Jahr 2030 wurde ein Anteil bei Männern mit einem Alter > 65 Jahre von 22,3 % (Anstieg 7 %) und bei Frauen von 29 % (Anstieg 7,3 %) kalkuliert. Aus dieser Altersverschiebung werden für die Verwendung von Implantaten sukzessive neue Anforderungen an die medizinische Versorgung gestellt. Diese betreffen insbesondere die Suche nach Materialien mit folgender Indikation und Eigenschaft:

- Das Material müsste ein permanentes oder zumindest auf unbestimmte Zeit prolongiertes Verbleiben von Implantaten für den Fall ermöglichen, dass keine ausreichende Knochensubstanz im Operationsgebiet für eine dauerhafte Heilung vorhanden ist, wie es bei Patienten im höheren Alter durch Osteoporose und verzögerten Knochenersatz häufig zu erwarten ist.
- Dieses Implantationsmaterial müsste, bedingt durch seine mechanischen und biologischen Eigenschaften, eine bestimmte Zeit solange als stabiles Implantat wirken, bis eine Ersatzknochenbildung erfolgt ist. Der große Vorteil für den Patienten wäre es, dass auf Grund der sukzessiven biologischen Abbaubarkeit dieses Implantationsmaterials eine zweite Operation zur Entfernung der Implantate, mit all ihren Risiken für den Patienten, vermieden werden könnte.

Ein solches Material für Implantate zur Lösung dieser klinischen Erfordernisse könnten das Element Magnesium (Mg) oder Mg-haltige Legierungen sein, bedingt auch dadurch, dass Mg auf Grund seines natürlichen Vorkommens beim Menschen per se eine hohe Tolerabilität aufweist.

Magnesium gehört zu den Erdalkalimetallen und damit zur 2. Hauptgruppe im Periodensystem.

Mg besitzt bioaktive und osteokonduktive Eigenschaften und diese wären für eine Osseointegration von Implantaten gegenüber herkömmlichen Materialien aus Titan und auch CF-PEEK von Vorteil (Zreiqat et al. 2002; Galli et al. 2017b).

Des Weiteren gibt es aber auch seit einigen Jahren wissenschaftlich fundierte Ansätze, Mg-Legierungen als zeitweise stabile und sukzessive sich abbauende, d.h. bioresorbierbare Werkstoffe für im Körper einzusetzende Implantate zu verwenden (Witte et al. 2005; Staiger et al. 2006; Erbel et al. 2007; Castellani et al. 2011; Thormann et al. 2015).

Im Rahmen der Forschung zur Implantation von Mg-Legierungen konnte nachgewiesen werden, dass diese Werkstoffe durch Interaktionen mit umgebendem Gewebe korrodieren (Witte et al. 2008). Solchen Interaktionen unterliegen alle Materialien nach Implantation in den Organismus, so dass Art, Ausmaß und Toxizität der durch Korrosion freigesetzten Ionen, Moleküle und/oder Partikel vor klinischer Applikation bekannt und abgewogen sein müssen. Mg-Legierungen setzen metallische Ionen, Anhäufungen identischer Atome, sogenannte (sog.) Polykationen und/oder metallische Partikel frei (Vasconcelos et al. 2016).

Mit der Korrosion im Zusammenhang steht eine Freisetzung von Wasserstoffgas (H_2 -Gas). Zwischen dem Ausmaß der Korrosion und der Menge an freigesetztem H_2 -Gas besteht eine positive Korrelation, so dass mit einer Messung des Volumens der H_2 -Gasbildung der Grad der Korrosion quantitativ bestimmbar wäre (Song et al. 2005).

Die Umsetzung dieser Aufgabenstellung ist gegenwärtig nicht zufriedenstellend gelöst, da es bisher nicht gelang, eine geeignete Messmethode zu entwickeln (Witte et al. 2008; Kirkland et al. 2012). In der vorliegenden Studie wurde die Histomorphometrie als Methode für die Messung der Größe der gebildeten H_2 -Gasblasen und deren Distanzen zum Implantat eingesetzt.

1.1 Entwicklung biodegradabler Implantate

Die Intention zur Entwicklung biologisch abbaubarer Implantate ist geprägt durch die Idee, dass die Interaktion zwischen Material und Körperkomponenten eine optimale Dynamik dahingehend entwickeln kann, dass zwischen der Geschwindigkeit der Resorption eines implantierten Materials und dem Wachstum von neuem Gewebe Kongruenz besteht (Tamariz und Rios-Ramírez 2013). Das bedeutet, dass das Implantat sukzessive gegen sich neu bildenden Knochen ausgetauscht wird.

Ein erster, schriftlich belegter Hinweis auf die Verwendung von resorbierbarem Material in der Humanmedizin findet sich in einem der Hauptwerke, den 14 Büchern des „Methodus medendi“ des griechischen Arztes Aelius Galenus, auch Galenos von Pergamon genannt (Galenus 1586). Der ab 161 n. Chr. vorwiegend in Rom tätige Arzt Galenus verwendete bei verletzten Gladiatoren zum Nähen von Wunden und zur Ligatur von Arterien als Material Catgut, einen aus der Darmserosa von Tieren gedrehten, resorbierbaren Faden, der bis in die Mitte des 20. Jh. in der operativen Medizin zur Anwendung kam. In der 2. Hälfte des 20. Jh. wurde Catgut durch synthetische, resorbierbare und biokompatiblere Nahtmaterialien, bestehend aus Polylactid, Polyglykolid und Polyglykonat, ersetzt (Kulkarni et al. 1966; Singhal et al. 1988).

Der Einsatz von Magnesium als biodegradierbares Implantatmaterial erfolgte erstmals 1878 durch den amerikanischen Arzt Edward C. Huse, der Magnesiumdraht für die Ligatur von Blutgefäßen verwendete (Huse 1878). Weitere frühe Applikationen von Mg-haltigen Implantaten waren der Einsatz als Gefäßprothese, Darminterponat, Adapter von Nervenstümpfen sowie als nichtgebogene Mg-Nadel-Faden-Kombination für die Blutstillung an parenchymatösen Organen und nach Exstirpation von Hämangiomen (Payr 1900; Chlumsky 1900; Höpfner 1903).

Die anfängliche Euphorie über die Frühergebnisse bei klinischem Einsatz von Mg-haltigen Implantaten in den ersten Jahren des 20. Jh. ging schnell zurück, nachdem mit Wasserstoffgas (H_2 -Gas) gefüllte Vakuolen im Bereich von schnell korrodierenden Implantaten auffällig geworden waren. Die Mg-Implantate korrodierten allerdings sehr rasch und setzten dabei eine beunruhigend hohe Menge an H_2 -Gas frei. Die Hauptursache dafür kann gewesen sein, dass zu dieser Zeit nur Mg mit einer zu hohen Verunreinigung zur Verfügung stand.

1.1.1 Interaktionen zwischen Mg-Implantaten und Gewebe

Auf Grund von technologischen Fortschritten steht heute für die Herstellung von Mg-haltigen Implantaten hochgereinigtes Mg zur Verfügung. Die dadurch gegebenen kontrollierten mechanischen - und Degradationseigenschaften haben die experimentelle und klinische Forschung zum Einsatz komplett Mg-haltiger Implantate und Implantaten aus Mg-Legierungen in der 2. Hälfte des 20. Jh. gravierend stimuliert.

Der Grad der Biokompatibilität eines Werkstoffs ist für die Eignung zur Implantation in den menschlichen Körper eine wichtige Voraussetzung. Im Gegensatz zur angestrebten Biodegradation von Mg und Mg-Legierungen mit einem kontrollierten Abbau des Implantats und Ersatz durch körpereigenes Gewebe, reduziert bzw. verhindert eine forcierte Korrosion deren Einsatzmöglichkeiten.

Die Korrosion von Mg-haltigen Implantaten setzt sich, ohne dass die Anwesenheit von Sauerstoff erforderlich ist, aus 3 Teilschritten einer Elektrolytreaktion zusammen (Makar und Kruger 1993):

- Anodenreaktion mit Abgabe von 2 Elektronen des Mg:

$$\text{Mg} \rightarrow \text{Mg}^{2+} + 2\text{e}^{-}$$
- Kathodenreaktion mit Aufnahme von 2 Elektronen durch 2 Wassermoleküle:

$$2 \text{H}_2\text{O} + 2\text{e}^{-} \rightarrow \text{H}_2 + 2 \text{OH}^{-}$$
- Mg-Ion und 2 Hydroxidionen reagieren miteinander:

$$\text{Mg}^{2+} + 2 \text{OH}^{-} \rightarrow \text{Mg}(\text{OH})_2$$

Im Gegensatz zur Korrosion unter atmosphärischen Bedingungen basiert die Korrosion bei Implantation in den menschlichen Organismus auf der Bildung mikrogalvanischer Elemente des anodischen und kathodischen Bereichs (Lunder et al. 1993). Als Korrosionsprodukte entstehen Magnesiumdihydroxid $[\text{Mg}(\text{OH})_2]$, welches sich an der Metalloberfläche ablagert, sowie in das umliegende Gewebe diffundierender, blasenbildender Wasserstoff (H_2).

1.1.2 Korrosion von Mg-Implantaten

Differenzierende Untersuchungen der an der Korrosion von Implantaten aus Mg-Legierungen beteiligten Elemente haben gezeigt, dass bei Mg-Aluminium (Al)-Zink (Zn)-Legierungen nur wenig Al und kein Zn beteiligt sind, so dass Ende des 20. Jh. empfohlen wurde, die korrosionsbezogene Prävention auf das Element Mg zu konzentrieren (Song et al. 1999).

Versuche, die Korrosion von Mg-Legierungen durch einen kathodischen Korrosionsschutz zu hemmen, sind nicht generell effektiv, da bis zu 70 % der Metallauflösung durch eine intermetallische Korrosion bedingt sein kann (Wang 1997). Die, von Nazarov (1993) auch als anomale Selbstauflösung bezeichnete intermetallische Korrosion, wird durch die elektrochemische Korrosion initiiert und verläuft parallel zur Korrosionsform, ohne dass ein Stromfluss messbar ist (Nazarov 1993). Der entscheidende Faktor für das Auftreten einer intermetallischen Korrosion ist die parallel zur elektrolytischen Reaktion verlaufende Bildung von Magnesiumhydrit (MgH_2).

Häufig und typisch für die Korrosion von Metallen ist die charakteristische Beschaffenheit der sich häufig ausbildenden Oberflächenfilme an den Implantaten (Makar und Kruger 1993). Bei Mg-Implantaten hat diese korrosionsbedingte Oberflächenschicht eine kristalline Struktur, besitzt eine Dicke im 2-stelligen Nanometerbereich und besteht hauptsächlich aus $\text{Mg}(\text{OH})_2$.

Die Stabilität der Magnesiumhydroxidschicht von Mg lässt sich mit Hilfe eines Pourbaix-Diagramms darstellen (Pourbaix 1974). In diesen Diagrammen ist das Standardpotential eines Metalls im Verhältnis zu den pH-Werten von wässrigen Lösungen aufgetragen, die Ionen des zu untersuchenden Metalls enthalten. Damit lassen sich mit Hilfe dieser Diagramme die thermodynamischen Stabilitätsbereiche eines Metalls und seiner Verbindungen in definierten wässrigen Lösungen ablesen (Makar und Kruger 1993).

Um die Korrosionsstabilität von Mg-haltigen Implantaten zu erhöhen, wurde die Technik einer Oberflächenmodifikation von Legierungen und purem Mg in Form von Schutzbeschichtung überprüft (Zeng et al. 2008). Dazu zählen Beschichtungen mit nichtmetallischen Stoffen wie Polymere und Verdampfung von Metallen wie z.B. Nickel (Ni), Chrom (Cr), Al, hochreines Mg und synthetische Kalziumphosphate, wie z.B. das Hydroxylapatit (HA) (Salunke et al. 2011).

1.2 Biodegradable Mg-haltige Implantate für Osteosynthese

Im Mittelpunkt der Forschung der letzten Jahre bis in die Gegenwart zum Einsatz von Mg und Mg-haltigen Legierungen für Implantate standen die Verbesserung der Biokompatibilität mit kontrollierter Degradation, die Beeinflussung der Korrosion und der exzessiven Freisetzung von H_2 , sowie die Identifikation optimaler Legierungen hinsichtlich Stabilität der Implantate und Ausschluss toxischer Einflüsse auf den Patienten.

Mg-Legierungen und Mg als pures Element sind Werkstoffe, bei denen ein sehr gutes Verhältnis zwischen hoher Festigkeit und einem niedrigen Gewicht besteht. Sie besitzen sehr gute Voraussetzungen für eine Gussformung, sie sind bei Raumtemperatur verformbar (Duktilität), weisen gute Vibrations- und Stoßabsorption auf und sind nicht magnetisch und auch nicht toxisch, was sie für medizinische Indikationen, nun schon seit 140 Jahren, als interessante Materialien prädestiniert hat (Song und Atrens 1999). Als Bestandteil des Equipments für Osteosynthese ist für die Forschung der Prozess der Auflösung dieser Werkstoffe durch Korrosion in biokompatible, lösliche Fragmente kein Widerspruch in sich, obwohl es dem ursprünglich geltenden Prinzip widerspricht, dass Implantate „korrosionsbeständig“ sein sollten. Das ist dadurch begründet, dass in den letzten Jahren der Beweis erbracht werden konnte, dass z.B. Mg-Legierungen mit Al und Zirkonium (Zr) sowie mit Gadolinium (Gd) und Zn kontrolliert verzögerte Korrosion induzieren und damit die Voraussetzung für einen parallel zur retardierten Korrosion verlaufenden Austausch des Implantats gegen den Aufbau einer neuen Knochenmatrix schaffen (Witte et al. 2008). Die Eigenschaft eines biodegradablen Abbaus besitzen neben Mg eine Reihe anderer Elemente, wie die in Mg-Legierungen eingesetzten Metalle Al, Zn, Gd, Mangan (Mn) und Eisen (Fe), jedoch ist Mg gegenüber diesen Elementen das Metall mit der geringsten Toxizität (Zengh et al. 2014). Bei einem Vergleich des NOAEL (No Observed Adverse Effect Level), der höchstmöglichen Dosis ohne verifizierbare Schädigung, betrug dieser bei Mg im Mittel 360 Milligramm pro Tag (mg/d), von Fe 10 mg/d und von Zn 9,5 mg/d (Trumbo et al. 2002).

Eine weitere positive Eigenschaft von Mg und Mg-Legierungen ist die stimulierende Wirkung auf die osseale Formation, wobei sie, im Gegensatz zu Polymeren, keine ausgeprägte Entzündung induzieren. 18 Wochen (Wo) nach Implantation eines Mg-haltigen Marknagels in den Femurknochen von Meerschweinchen findet sich im Gegensatz zu einem Polymer eine ausgeprägte endostale und periostale Ossifikation (Witte et al. 2005).

Basierend auf den industriell bereits entwickelten Mg-Legierungen bestanden die ersten, auf ihre Biokompatibilität und Degradabilität biomedizinisch getesteten Materialsysteme,

1 Einleitung

aus Mg und den Hauptkomponenten Al und Zn, sowie dem vorwiegend aus Komponenten der Seltenen Erden (RE - rare earth elements) und weiteren Metallen wie z.B. Yttrium (Y), Lanthan (La), Zr und Gd bestehenden WE-System (Legierung aus Mg und mehreren RE).

- Die Mg-Al-Zn-Legierung AZ31 besteht anteilmäßig aus 96 Gewichtsprozenten (Gew-%) Mg, 2,5 - 3,5 Gew-% Al, 0,7 – 1,3 Gew-% Zn, 0,2 Gew-% Mn und < 0,05 Gew-% Silizium (Si).
- Die Legierung WE43 setzt sich zusammen aus 93,6 Gew-% Mg, 4 Gew-% Y, 2,25 Gew-% Neodym (Nd) und 0,15 Gew-% Zr.

Auf Grund der sehr guten Eigenschaften hinsichtlich Biokompatibilität und Osteokonduktivität, sowie fehlenden Entzündungszeichen bei in-vivo-Testungen, wurde im Jahr 2013 ein Mg-haltiges Implantat, die Kompressionsschraube MAGNEZIX® (Syntellix AG, Hannover, Deutschland), bestehend aus einer Legierung mit ähnlicher Zusammensetzung wie WE43, nach EU-weiter Zulassung erstmals klinisch erprobt (Windhagen et al. 2013).

Bereits vor dieser klinischen Erstanwendung in der Frakturbehandlung wurden vaskuläre Stents, hergestellt aus der Mg-Legierung WE43, bei kardiovaskulären Interventionen seit etwa 20 Jahren vielfach mit sehr guten Ergebnissen hinsichtlich Funktion und Resorption eingesetzt (Chan und Moliterno 2001; Di Mario et al. 2004; Erbel et al. 2007).

Ein weiteres, in Bezug auf Biokompatibilität und Osteokonduktivität von WE43 vergleichbares, Mg-haltiges Implantatmaterial wurde mit einer Legierung, bestehend aus 94 Gew-% Mg, 5 Gew-% Kalzium (Ca) und 1 Gew-% Zn, entwickelt (Lee et al. 2016). Der kontrollierte Abbau dieser Mg-Ca-Zn-Legierung induziert die Bildung einer Knochenmatrix an der abgebauten Grenzschicht der Legierung und initiiert damit eine Knochenneubildung. Nach Implantation von Mg-Ca-Zn-Kompressionsschrauben zur Reposition von frakturierten Handwurzelknochen bei 53 Patienten konnte in einer Studie von Lee et al. (2016) gezeigt werden, dass 12 Monate postoperativ ein vollständiger Ersatz des biologisch degradierten Mg-Implantats durch neuen Knochen erfolgt war (Lee et al. 2016).

Analysen hinsichtlich geeigneter Komponenten von Mg-Legierungen haben gezeigt, dass der Zusatz von zu RE gehörenden Elementen eine höhere Festigkeit, eine Verfeinerung der Korngrößen und damit eine kontrolliertere Degradation der Implantate bewirkt (Wang et al. 2006; Thormann et al. 2009).

Eine, auf Grund dieser Erkenntnisse intensiv untersuchte Mg-Legierung, ist die Legierung LAE442, deren Zusammensetzung aus 90 Gew-% Mg, 4 Gew-% Lithium (Li), 4 Gew-% Al und 2 Gew-% RE besteht.

Das Element Li der Legierung LAE442 wird beim Menschen über denselben Transportweg wie Natrium (Na) per Diurese ausgeschieden und auf Grund einer möglichen Interkompetition könnte Li nephrotoxisch wirken (Grünfeld und Rossier 2009). In einer in-vitro-Studie wurde bei Untersuchungen zur Korrosion einer Mg-Li-Ca-Legierung jedoch in einem Zytotoxizitätsassay nachgewiesen, dass selbst bei einem Li-Gehalt von 10 Gew-% in einem Kulturmedium keine Zelltoxizität an murinen Zelllinien existierte (Cui et al. 2017). Des Weiteren werden auf Grund einer nachgewiesenen geringen, korrosionsbedingten Implantatdegradation von lediglich 0,013 Millimeter (mm) bis 0,025 mm pro Jahr die Freisetzungsraten für die Elemente einer stranggepressten Legierung LAE442 nicht als Risikofaktor für eine Li-induzierte Toxizität angesehen (Ullmann et al. 2013).

Ein weiteres Element der Legierung LAE442 ist Al. Dieses Element dient der Erhöhung des Korrosionswiderstands und damit der Stabilität von Implantaten (Hort et al. 2010). Al kann bei systemischen Konzentrationen von > 5 Millimol pro Liter (mmol/L) neurotoxisch wirken (Altmann et al. 1989). In der Studie von Altmann et al. (1989) konnte des Weiteren nachgewiesen werden, dass Plasma-Al-Spiegel zwischen 1,5 und 2,2 mmol/L eine um 18% höhere Mortalitätsrate als jene mit niedrigeren Aluminiumwerten hatten.

Ausgehend davon, dass Al als Bestandteil von Legierungen für Implantate lediglich in Konzentrationen von maximal 1 – 9 Gew-% eingesetzt wird, werden toxische Werte im Blut nicht erreicht.

Die Legierung LAE442 enthält 2 Gew-% RE und deren Zusammensetzung ließ mögliche negative und auch positive Auswirkungen einzelner Elemente der RE nicht exakt zuordnen.

RE-Elemente wie Cerium (Ce), Lutetium (Lu), La und Praseodymium (Pr) zeigen im Gewichtsbereich von bereits 2 Gew-% toxische Auswirkungen, so dass sie für den klinischen Bereich nicht einsetzbar sind (Brar et al. 2008; Feyerabend et al. 2010).

Neue, erfolgversprechende Entwicklungen hinsichtlich des Anteils an RE von Mg-Legierungen mit dem Nachweis einer Senkung der Korrosionsrate waren die Beimischung von Nd zur Legierung LANd442, die zusätzliche Beschichtung der Metalloberfläche mit Mg-Fluorid (Seitz et al. 2011) und die Reduzierung von Elementen in der Legierung W4 mit einem Anteil von 96 Gew-% Mg und 4 Gew-% Y (Bobe et al. 2013).

In den von Bobe et al. (2013) durchgeführten in-vitro- und, mit einer Dauer von 12 Wochen (Wo) vorgenommenen in-vivo-Untersuchungen, wurde bei Verwendung der Legierung W4 eine sehr gute Knochenneubildung und keine Gasformation nachgewiesen (Bobe et al. 2013). Die W4-Legierung eignet sich auf Grund des hohen Mg-Anteils und

der alleinigen Beimengung des RE-Elements Y sehr gut für die Formung von Implantaten. Bei Wärmezufuhr wird W4 knetbar und lässt sich mit dem Strangpressverfahren in bestimmte Formteile bringen (Swiostek 2008).

Ein in der Orthopädie und in der Zahn-Kieferchirurgie bereits etabliertes Material zur Knochensubstitution und Oberflächenbeschichtung von metallischen Implantaten sind synthetische Kalziumphosphate, wie z.B. HA, welches in den letzten Jahren auch als Beschichtungsmaterial für Mg eingesetzt wurde (Charyeva et al. 2015). Untersucht wurde dieses Komposit auf die Möglichkeit einer verbesserten Biokompatibilität, Osseointegration und Osteokonduktivität besonders intensiv, da HA auf Grund seiner chemischen Zusammensetzung der mineralischen Knochenmatrix des Menschen ähnelt (Ratna et al. 2014; Sartori et al. 2014).

1.2.1 Freisetzung von Wasserstoff aus Mg-Implantaten.

Die korrosionsbedingte, möglicherweise erhebliche Freisetzung von Wasserstoff bei Implantation Mg-haltiger Materialien durch einen kontrollierenden Einfluss auf die Korrosion zu bewirken, ist für die klinische Anwendung von Mg-Werkstoffen eminent und gegenwärtig nicht optimal gelöst (Kuhlmann et al. 2013, Brady et al. 2017)

Zum einen liegt ein Teil an gelöstem H_2 in wässriger Lösung des umgebenden Gewebes vor und kann erst gemessen werden, nachdem das technische Equipment in Form eines amperometrischen H_2 -Gas-Mikrosensors zur Verfügung steht, mit dessen Hilfe H_2 -Gas-Messungen in wässrigem Medium möglich sind. Zum anderen wird die Menge der H_2 -Freisetzung durch Temperatur und atmosphärischen Druck beeinflusst, so dass Vergleiche nur unter Berücksichtigung dieser Angaben möglich sind (v.d.Höh et al. 2009).

Korrosionsbedingtes H_2 lagert sich im umgebenden Gewebe eines Implantats nur ab, wenn die freigesetzte Gasmenge die Kapazität des Abtransports per diffusionem in die Kapillaren übersteigt, wobei sich dann in Implantatnähe Gasbläschen bilden können. In-vivo-Korrosionsuntersuchungen haben bei 4 differenten Mg-Implantaten bereits in der ersten postoperativen Woche palpatorisch und radiologisch verifizierbare subkutane Gasblasen nachweisen können (Witte et al. 2005). Des Weiteren konnte in diesen Untersuchungen gezeigt werden, dass die subkutanen Gasblasen bis maximal 3 Wochen nachweisbar sind.

Die korrosionsinduzierte Freisetzung von H_2 -Gas in das umgebende Gewebe ist bereits seit dem Jahr 1938 bekannt, jedoch konnten auf Grund mangelnder technischer Voraussetzungen die Zusammensetzungen und Konzentrationen des gebildeten Gases nicht exakt bestimmt werden (McBride 1938). So enthielten Gasblasen

nach den Messungen von McBride (1938) mehr als 80 % Stickstoff (N_2) und lediglich etwas mehr als 7 % H_2 .

In einer neueren in-vivo-Untersuchung wurden Mäusen Mikroplättchen, bestehend aus einer Legierung von Mg und den Seltenen Erden Y, Gd, Nd und Dysprosium (Dy) subkutan (s.c.) implantiert und die Konzentrationen von H_2 -Gas in Gasblasen mit einem amperometrischen H_2 -Sensor und mit massenspektrometrischen Messungen bis 10 Tage postoperativ bestimmt (Kuhlmann et al. 2013). Dabei zeigten sich bereits am 1. postoperativen Tag nur geringe Konzentrationen von H_2 -Gas mit kontinuierlicher Abnahme per diffusionem in das umgebende Gewebe, wobei am 3. Tag nach Versuchsbeginn kein H_2 -Gas mehr nachweisbar war. Im Rahmen dieser in-vivo-Untersuchungen von Kuhlmann et al. (2013) wurde den Mäusen H_2 -Gas s.c. injiziert und bereits eine Stunde post injectionem waren weniger als 10 % des injizierten H_2 -Gases nachweisbar. Damit war der Beweis für eine extrem rasche Verteilung von H_2 -Gas im Gewebe, bedingt durch einen hohen Konzentrationsgradienten der Gasblase gegenüber dem umgebenden Gewebe, erbracht.

Dass die H_2 -Anhäufung im Gewebe lokale (Alteration der Knochenstruktur) und systemische (Embolie, Hypotonie) Auswirkungen hat (Staiger et al. 2006; Yoshikawa und Naito 2011) und bei gravierender subkutaner Ansammlung eine Punktion der gebildeten Gasblasen indiziert sein kann (Staiger et al. 2006), steht in deutlichem Widerspruch zu den Ergebnissen der in-vivo-Untersuchungen von Kuhlmann et al. (2013); aus diesem Grund sind weitere Forschungen zu dieser Thematik erforderlich.

1.3 Morphologie von Röhrenknochen

In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Implantation von Knochenschrauben in den Femur von Ratten, so dass im Folgenden morphologisch-relevante Aspekte von langen Röhrenknochen dargelegt werden. Von Relevanz sind dabei auch die Einflüsse auf die Durchblutung der betroffenen ossären Regionen und die Auswirkungen auf die Remodellierung der Knochenregionen.

Zu den mechanischen Funktionen von Röhrenknochen gehören Stabilitäts- und Stützfunktion für den Körper, Lokomotion und eine Schutzfunktion für das Knochenmark. Hinsichtlich der metabolischen Funktion des Knochens dominiert die Regulation des Kalzium- und Phosphathaushalts (Tröltzsch et al. 2016).

Die Bildung von Röhrenknochen erfolgt über die chondrale Ossifikation, bei der zunächst eine chondrale Schablone entsteht. Diese wird sukzessive, von der Diaphyse beginnend, in Form von perichondraler Ossifikation durch Knochen ersetzt, wobei ein schmaler Saum zwischen Diaphyse und Epiphyse verbleibt. Parallel dazu erfolgt eine enchondrale, säulenförmige Ossifikation in der Wachstumsfuge und diese „verschiebt“ die Epiphysenfugen solange nach kaudal und kranial, bis der postnatale Wachstumsvorgang des Röhrenknochens abgeschlossen ist (Rohen 1998; Baron 2000; Clarke 2008).

1.3.1 Zelluläre Funktionen im Knochenstoffwechsel

Aufgaben zellulärer Bestandteile des Knochens betreffen Knochenaufbau, Knochenerhaltung und –reparation sowie Knochenresorption. Diese Vorgänge spielen in der hier vorliegenden Studie eine eminente Bedeutung, da die Implantation von Knochenschrauben in Röhrenknochen osteolytische und osteogenetische Vorgänge induziert.

Die für die Knochensynthese dominierenden Zellen des Knochens sind die Osteoblasten, die sich unter dem Einfluss von mehreren Wachstumsfaktoren aus multipotenten Stammzellen entwickeln (Owen 1988; Pittenger et al 1999).

Insulinähnliche Wachstumsfaktoren (IGFs), Wachstumshormon (GH) und Kalzitinin stimulieren die Osteoblastenbildung und damit das Wachstum von Röhrenknochen. In diesem Wachstumsprozess steht am Anfang der Aufbau des Osteoids, d.h. der organischen Matrix des Knochens, das zu 90 % aus Kollagen besteht und wichtige Enzyme wie z.B. alkalische Phosphatase (ALP) und das Hormon Osteocalcin enthält (Saffar et al. 1997, Baron 2000).

Die ALP ist in der Membran von Osteoblasten lokalisiert und steuert für die Osteogenese die Mineralisierung des Knochens. Osteocalcin, mit der chemischen Bezeichnung „bone gamma-carboxyglutamic acid-containing protein“, ist ebenfalls ein spezifischer Marker für Osteoblasten und beeinflusst positiv die Knochenmineralisierung und die Angiogenese (Cantatore 2005).

Zunehmend erfolgen während des Wachstumsprozesses von Röhrenknochen eine Mineralisierung des Osteoids durch Aufnahme von Kalziumphosphat und die Bildung von HA. Das dafür benötigte Ca und Phosphat kommt aus Osteoblasten und wird über Vesikeltransport zum Osteoid gebracht (Baron 2000; Clarke 2008). Der reife Röhrenknochen besteht zu 60 – 70 % aus anorganischem HA, ca. 20 – 40 % aus organischem Osteoid, 5 – 10 % aus Wasser und ca. 3 % aus Fetten und zellulären Bestandteilen (Clarke 2008).

Während dieses Reifeprozesses richten sich kollagene Fasern radiär und parallel aus und unter kontinuierlicher Knochenapposition reifen Osteoblasten zu Osteozyten (Rohen

und Lütjen-Drecoll 1996; Su et al. 2003). Deren Funktion liegt in der Unterstützung der Ernährung des Knochens. Sie steuern funktionell erforderliche konstruktive bzw. destruktive Prozesse (Rocheffort et al. 2010). Histomorphologisch bilden die Osteozyten über Zellfortsätze eine komplexe Zell-Zell-Vernetzung (gap junctions), vergleichbar als Form eines funktionellen Synzytiums. Diese Funktion könnte in der Fortleitung mechanischer Stimuli in das Innere des Knochens bestehen (Clarke 2008; Datta et al. 2008; Rocheffort et al. 2010).

Auf der Basis dieser Vernetzung verfügen Osteozyten über eine hohe mechanosensitive Eigenschaft und die Fähigkeit zur Mechanotransduktion, wobei biophysikalische Kraft in zelluläre Antwort transformiert wird (Duncan und Turner 1995). Die Mechanotransduktion induziert eine Umwandlung von mechanischer Belastung in elektrische bzw. chemische Signale. Auf der Basis dieser Signale werden Botenstoffe freigesetzt, die auf- bzw. abbauende Prozesse wie Proliferation, Zelldifferenzierung oder Zelltod einleiten (Ghazi et al. 1998).

Neben den Osteozyten stellen Osteoklasten in Röhrenknochen eine wesentliche Zellgruppe dar. Sie entstehen aus monozytären Progenitorzellen des Knochenmarks der Röhrenknochen und die Reifung der Osteoklasten wird durch Freisetzung von Botenstoffen, wie z.B. dem Receptor Activator of Nuclear Factor kappa-B Ligand (RANK-L) und Osteoprotegerin (OPG), vermittelt (Baron 2000).

Osteoklasten sind mehrkernige Riesenzellen, und ihre typische Lokalisation befindet sich an der Oberfläche von Röhrenknochen in Vertiefungen, die nach dem englischen Arzt John Howship als Howship-Lakunen benannt wurden (Howship 1817).

Die wesentliche Funktion der Osteoklasten ist der Abbau von Knochensubstanz, wobei die Osteoklasten eine dominierende Rolle bei der Demineralisierung von Knochen besitzen (Rohen 1996). Differenziert und aktiviert werden multinukleäre Osteoklasten durch die Bindung des an der Oberfläche von Osteoblasten exprimierten molekularen Botenstoffs RANK-L an den auf der Oberfläche von Osteoklasten exprimierten Rezeptor RANK. Dieses molekulare System führt zu einer Stimulation der Knochenresorption (Khosla 2001). Dagegen führt eine Bindung von OPG an RANK-L zu einer Inhibition der Osteoklastogenese und des Knochenabbaus (Boyle et al. 2003).

Eingeleitet wird die Osteolyse durch eine Sekretion von Protonen aus den Osteoklasten und der daraus resultierende sinkende pH-Wert induziert die chemische Entkalkung anorganischer Knochensubstanzen (Saffar et al. 1997). Der Abbau von organischer Matrix wird über lytische Enzyme (Proteinasen) und Kathepsin realisiert (Hadjidakis und Androulakis 2006).

1 Einleitung

Ein wesentlicher Parameter des Knochenabbaus ist die tartratresistente saure Phosphatase (TRAP). Sie zählt zur Gruppe der Metalloproteinasen und TRAP wurde als Isoenzym 5 der sauren Phosphatase spezifiziert. TRAP wird in Makrophagen und Osteoklasten gebildet und kann als ein Äquivalent der Aktivität dieser Zellen gewertet werden (Minkin 1982; Halleen et al. 2006). So konnte in einer experimentellen Studie bei Kulturen von Osteoklasten nachgewiesen werden, dass eine Inhibition durch TRAP-Antikörper die resorptive Funktion von Osteoklasten aufhob (Zaidi et al. 1989).

Ossäre Körperteile unterliegen permanent einer synergistischen Funktion von Osteoblasten und einer antagonistischen Wirkung von Osteoklasten.

Dieser Prozess der Interaktion von Osteogenese und Osteolyse wird als „Bone Remodeling“ bezeichnet und dieser Prozess impliziert restaurative und adaptive Reaktionen auf Abnutzung und externe Stimuli wie z.B. Belastung und Immobilität (Frost 1990; Ralston 1997). Bei Implantation von metallischen Knochenschrauben in einen Röhrenknochen, wie es in der vorliegenden Studie erfolgte, wurde für die funktionelle Einheit von Interaktionen der Osteoblasten und Osteoklasten zur Induktion von Osteogenese bzw. Osteolyse der Terminus „Basic multicellular unit“ (BMU) geprägt (Jilka 2003).

1.3.2 Blutversorgung von Röhrenknochen

Die Versorgung von Röhrenknochen mit Blut erfolgt über Aa. nutriciae, die im Bereich der Metaphyse transossal in den Markraum verlaufen. Im Knochenmark gehen die Ernährungsarterien in ein sinusoidales Netzwerk über, das aus den Kapillarformen Typ-H und Typ-L besteht. Diese Kapillartypen unterscheiden sich hinsichtlich der Stärke der Expression des Thrombozyten-Endothelzellen-Adhäsionsmolekül-1 (PECAM-1), indem die Typ-H Kapillaren PECAM-1 im Gegensatz zu Typ-L wesentlich intensiver exprimieren (Sivaraj und Adams 2016). Typ-H Kapillaren sind vorwiegend im Bereich der Metaphyse von Röhrenknochen lokalisiert, während Typ-L Kapillaren in der Mitte des Knochenmarks einen Zentralsinus formieren, der dem venösen Abtransport dient (Kusumbe et al. 2014).

PECAM-1, auch als Cluster of differentiation 31 (CD31) in der Literatur ausgewiesen, ist sowohl ein Marker als auch ein Stimulator für die Sprossung von Kapillaren (Angiogenese) aus einem bestehenden Kapillarsystem (Newman 1997; Rubio et al. 2000). Diese Eigenschaften von PECAM-1 sind daher für Untersuchungen zur Regeneration von Knochengewebe im Zusammenhang mit dem Einsetzen von Implantaten geeignet.

1.4 Zielstellungen

Das Ziel der vorliegenden Studie bestand darin, nach Implantation von Knochenschrauben in den distalen Femur von Ratten anhand von histologischen Schnittserien der Implantatregion eine Aussage zu treffen, welches Implantat die höchste Biokompatibilität besitzt. Bei den eingesetzten Implantatmaterialien handelte es sich um 1-mal und 2-mal verpresste W4-Legierungen und um Magnesium-Hydroxylapatit (Mg-HA)-Komposit.

Folgende Fragen standen im Vordergrund:

- 1) Bei welchem der eingesetzten Materialien kam es aufgrund von Korrosion innerhalb der Beobachtungszeiten von 6 bzw. 12 Wo zur intensivsten Bildung von H₂-Gas?
- 2) Konnten mittels TRAP-Färbung 6 bzw. 12 Wo nach Implantation von W4 1-mal verpresst, W4 2-mal verpresst und Mg-HA-Komposit zeitliche und implantatspezifische Unterschiede hinsichtlich der Häufigkeit von Osteoklasten im Implantatbett nachgewiesen werden?
- 3) Waren nach einer ALP-Färbung 6 bzw. 12 Wo nach Implantation der 3 genannten Implantate zeitliche und materialbezogene Unterschiede in Bezug auf die Häufigkeit des Nachweises von Osteoblasten vorhanden?
- 4) Zeigten sich anhand des Nachweises von PECAM-1 6 bzw. 12 Wo nach Implantation der 3 Magnesiumwerkstoffe Unterschiede in der Häufigkeit von Endothelialzellen und damit in der Angiogeneese?

Die Ergebnisse der hier formulierten Zielstellungen könnten für die Weiterentwicklung der operativen Stabilisierung des Knochensystems einen wichtigen Beitrag liefern, indem 3 biokompatible Magnesiumwerkstoffe dahingehend verglichen werden, inwieweit sie hinsichtlich Stabilität und Degradation für einen klinischen Einsatz geeignet sind.

2 Material und Methoden

In der vorliegenden Arbeit wurden Untersuchungen zur in-vivo-Degradation von 1-mal und 2-mal verpressten magnesiumhaltigen W4-Legierungen und Mg-HA-Komposit an Ratten vorgenommen. Mit diesen Untersuchungen sollte nachgewiesen werden, ob die Bestimmung des Ausmaßes der H₂-Freisetzung bei Degradation der Implantate eine quantitative Messung der Intensität der Degradation zulässt.

Dieses Forschungsvorhaben war Teil eines im Auftrag des Hessischen Wissenschaftsministeriums durch die Hessen-Agentur GmbH (HA, Wiesbaden) unterstützten Projekts „Magnesiumlegierungen als resorbierbare Implantatmaterialien“ HA-Projekt Nr.: 182/ 09-12.

2.1 Tierversuche

2.1.1 Versuchsgenehmigung und Tierhaltung

Der Antrag von Frau Dr. E. Dingeldein (aap Biomaterials GmbH, Dieburg, Deutschland) auf Genehmigung von in-vivo-Tests nach § 8 des Tierschutzgesetzes in der Fassung der Bekanntmachung vom 18. Mai 2006 (Bundesgesetzblatt 1, S. 1206) zur Durchführung von wissenschaftlichen Versuchen an Ratten für das Versuchsvorhaben „Degradation von Magnesiumkompositen in vivo in der Ratte“ wurde am 27. Juli 2010 durch das Regierungspräsidium Darmstadt genehmigt (Genehmigungs-Nr.: D 20/01).

Alle mit den Versuchstieren verbundenen Abläufe wie Tierhaltung, Narkose und Operationen sowie postoperative Nachsorge erfolgten in der Zentralen Forschungseinrichtung (Haus 67) des Fachbereichs Medizin der Goethe-Universität Frankfurt am Main.

Wasser stand den Tieren ad libidum zur Verfügung und an Trockenfutter, bestehend aus Getreide, Sämereien und Trockengemüse, bekamen die Ratten die Menge eines Esslöffels pro Tag.

Die Operationen und Narkosen erfolgten durch erfahrene Tierärzte und Orthopäden/ Unfallchirurgen.

Nach Abschluss der Tierversuche wurden die Tierproben für die histologische Auswertung dem Labor für experimentelle Unfallchirurgie der Klinik und Poliklinik für Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Verfügung gestellt.

2.1.2 Einteilung der Versuchsgruppen

Als Versuchstiere wurden 31 männliche Ratten (Sprague-Dawley, Fa. Janvier, Le Genest-Saint-Isle, Frankreich) mit einem Gewicht von 250-280 Gramm (g) und einem Alter von 14-16 Wo verwendet. Bei vier Tieren waren die Schnitte zerfallen, so dass sie für die histologische Auswertung nicht zur Verfügung standen.

In Abhängigkeit von dem Magnesiumwerkstoff und des postoperativen Entnahmezeitpunktes des implantattragenden Knochenabschnitts konnten von insgesamt 27 Versuchstieren fünf Versuchsgruppen mit Standzeiten von 6 bis 12 Wo gebildet werden:

W4 1-mal verpresst 6 Wo (Gruppe 1)

Einsatz eines Implantats bestehend aus 1-mal verpresster W4-Legierung (Mg 96 Gew-%; Y 4 Gew-%) und Probenentnahme 6 Wo nach Implantation (n = 5 Tiere);

W4 2-mal verpresst 6 Wo (Gruppe 2)

Einsatz eines Implantats bestehend aus 2-mal verpresster W4-Legierung und Probenentnahme 6 Wo nach Implantation (n = 6 Tiere);

W4 1-mal verpresst 12 Wo (Gruppe 3)

Einsatz eines Implantats bestehend aus 1-mal verpresster W4-Legierung und Probenentnahme 12 Wo nach Implantation (n = 6 Tiere);

W4 2-mal verpresst 12 Wo (Gruppe 4)

Einsatz eines Implantats bestehend aus 2-mal verpresster W4-Legierung und Probenentnahme 12 Wo nach Implantation (n = 5 Tiere);

Mg-HA-Komposit 12 Wo (Gruppe 5)

Einsatz eines Implantats bestehend aus Mg-HA-Komposit (Mg- HA 30 Gew-%) und Probenentnahme 12 Wo nach Implantation (n = 5 Tiere).

2.1.3 Intraossäre Implantation Mg-haltiger Schrauben

Für die Degradationsuntersuchungen wurden als Implantate Knochenschrauben verwendet, die aus den beschriebenen drei differenten Magnesiumwerkstoffen gefertigt

2 Material und Methoden

worden waren. Die Abmessungen der Schrauben hatten einen Durchmesser ($\varnothing$) von 2,1 mm und eine Länge (L) von 3 mm. Die Schrauben wurden von der Firma aap Biomaterials GmbH (Dieburg, Deutschland) hergestellt. Die gewählte Größe der Knochenschrauben gewährleistete, dass sich für die Tiere während des Versuchsverlaufs einerseits keine nachweislichen Beeinträchtigungen ergaben und andererseits die Stabilität des Femurknochens nicht gefährdet wurde.

Narkose:

Die Operationen für die Implantation der Knochenschrauben erfolgten in Allgemein-anästhesie. Diese wurde mittels intraperitonealer (i.p.) Applikation eines Narkose-Analgetikum-Cocktails, bestehend aus Ketaminhydrochlorid – 25 mg/ 250 g Körpergewicht (KG), Parke-Davis GmbH, Berlin, Deutschland), Xylocain – 2,5 mg/ 250 g KG (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) und Midazolam – 0,25 mg/ 250 g KG (ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland) durchgeführt.

Vor Beginn der Operation wurde auf die Cornea der Augen 5 %ige Bepanthen-Salbe® (Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Deutschland) appliziert, um eine Dehydratation während der Operation zu vermeiden.

Operation:

Die Operation erfolgte in Rückenlage der Tiere an der rechten Hinterpfote im Bereich der Regio femorotibialis. Dazu waren die Vorder- und Hinterpfoten durch Bandschlaufen fixiert und geringfügig gespreizt, wodurch ein guter Zugang für die Freilegung des Epicondylus medialis femoris und Implantation der Knochenschrauben ermöglicht wurde.

Vor Beginn der Operation wurde das Operationsgebiet im Bereich von distalem Femur bis proximal der Tibia rasiert und die jetzt freiliegende Haut 3-mal für 5 Min mit Cutasept F-Lösung® (Paul Hartmann AG, Heidenheim, Deutschland) desinfiziert.

Die Operation begann mit einem Querschnitt von 1 cm L über dem tastbaren medialen Kondylenhöcker und nachfolgender Durchtrennung der subkutanen Faszie. Unter Distension der Wunde konnte danach unter Schonung des Ligamentums collaterale tibiale die Freilegung des medialen Kondylus und die Schlitzung des Periosts an der Prominenz des Kondylenhöckers vorgenommen werden. In Vorbereitung auf das Einbringen der Knochenschraube wurde mit einem Knochenbohrer (Hipp medical AG, Kolbingen, Deutschland), am medialen Kondylenhöcker beginnend und in transversaler Richtung

zum lateralen Kondylus verlaufend, ein Bohrloch mit den Abmessungen Ø 2 Millimeter (mm) und L 3 mm gesetzt.

In das Bohrloch dieser Größe konnten Knochenschrauben eingebracht werden, ohne dass eine Gefahr bestand, die Kondylenstruktur aufzubrechen.

Nach Spülung der Wunde mit isotonischer Kochsalzlösung (Fresenius SE & Co. KGaA, Bad Homburg, Deutschland) zur Entfernung der bei der Bohrung entstandenen Knochenteilchen erfolgte der schichtweise Wundverschluss durch Einzelknopfnähte mit 4–0 Vicryl (Ethicon Johnson, Miami, USA) von Faszie und Haut. Danach wurden eine erneute Wunddesinfektion und eine Wundversiegelung mit Sprühpflaster (Beiersdorf AG, Hamburg, Deutschland) vorgenommen. Nach Ausleitung der Narkose mit Extubation in der Aufwachphase folgte eine Nachbeobachtungszeit von 2 Stunden (Std) und danach bei unauffälligem Verhalten der Versuchstiere die Rückführung in den Tierhaltungsbereich.

Entnahme der Knochenpräparate und Tötung der Versuchstiere:

Entsprechend der bei der Versuchsplanung festgelegten Standzeiten erfolgten die Entnahmen der femoralen Kondylen-Schrauben-Segmente und Tötung der Versuchstiere nach folgendem Algorithmus:

Standzeit 6 Wo: Gruppen W4 1-mal verpresst; W4 2-mal verpresst,

Standzeit 12 Wo: Gruppen W4 1-mal verpresst; W4 2-mal verpresst; Mg-HA-Komposit

Vor der Entnahme der Kondylen-Schrauben-Segmente wurde eine Injektionsnarkose mit Ketaminhydrochlorid und Xylacid bis zum Eintritt des irreversiblen Atemstillstands vorgenommen.

Anschließend erfolgten unter sterilen Bedingungen die Enukleation des kondylentragenden Femurs mit Entfernung aller bindegewebigen Gelenkanteile und danach die Resektion des implantattragenden distalen Femurabschnitts.

2.2 Histologische Techniken und Färbungen

Nach Entnahme wurden die ossären Präparate für 18 Std in 4 %igem phosphatgepuffertem Paraformaldehyd (pH 7,4) fixiert (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) und danach in Paraffin für histologische Paraffinschnitte oder für die Anfertigung von Knochenschliffen in Technovit-9100® (Heraeus Kulzer GmbH, Wehrheim, Deutschland) eingebettet.

Nach erfolgter Fixation wurden die ossären Präparate mit 0,1 Molarität (M) Phosphatpuffer zur Entfernung des Fixationsmediums gewaschen und in Vorbereitung auf die Einbettung in Paraffin mit 10 %iger Äthylendiamintetraessigsäure (EDTA) pH 8,0; Sigma-Aldrich Chemie Holding GmbH, Taufkirchen, Deutschland) für die Dauer von 21 Tagen in 3,5 Mol Trispuffer (pH 7,4, Sigma-Aldrich) dekalzifiziert. Nach der Entkalkung wurden die Präparate in einer prozentual aufsteigenden Äthanol-Reihe von 70 %, 80 %, 90 %, 96 % und 100 % dehydriert (Carl Roth GmbH; Karlsruhe, Deutschland), mit Xylol (Sigma-Aldrich) zur Entfernung von Resten des Alkohols 3-mal gesättigt und in Paraffinblöcke für die Anfertigung histologischer Schnitte eingebettet. Vor Einbettung in Paraffin erfolgte noch die vorsichtige Entfernung der Implantate bzw. der Implantatfragmente.

Mit einem Rotationsmikrotom (RM 2155, Leica, Bensheim, Deutschland) wurden paraffineingebettete histologische Schnitte mit einer Dicke von 4 bis 5 Mikrometer (μm) angefertigt und nach Deparaffinierung erfolgte sowohl eine Hämatoxylin-Eosin (HE)- als auch eine Toluidinblau (TB)-Färbung der Schnitte (Shandon Scientific Ltd, Runcorn, England). Abschließend wurden die Gewebeschnitte mit Deckgläschen auf den Objektträgern mittels Eukitt (Sigma-Aldrich) abgeklebt.

Die Technik der Einbettung der ossären Präparate in Technovit-9100[®] (Heraeus Kulzer GmbH) erfolgte nach einem von der Firma Kulzer GmbH angefertigten Laborprotokoll. Nach Einbettung wurden Knochenschliffe von 25 μm Dicke mit dem EXAKT-Knochenschliffsystem 400 CS (Heraeus Kulzer GmbH) angefertigt. Die Knochenschliffe wurden anschließend mit TB gefärbt.

Für die Färbung mit TB wurden die Knochenschliffe für 40 Min zunächst in 20 %igem Wasserstoffperoxid gebeizt und nachfolgend in einer TB-Lösung mit einem pH-Wert von 4,5, bestehend aus Natrium-Tetraborat (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland), Pyronin G (Merck KGaA) und TB (AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland) für 1 Min gefärbt. Nach Spülung mit destilliertem Wasser (Aqua dest) erfolgte eine Dehydrierung über die beschriebene aufsteigende Alkoholreihe (Carl Roth) und nachfolgend ein 2-maliges Eintauchen für je 5 Min in Xylol (Sigma-Aldrich) zur Deparaffinierung der Knochenschliffe.

2.3 Histomorphometrie von H₂-Gasblasen im Knochengewebe

Mit histomorphometrischen Methoden konnte die Freisetzung von Wasserstoffgas 6 und 12 Wo nach Implantation von Schrauben aus Mg-haltigem Material quantitativ ermittelt werden. In Vorbereitung auf die histomorphometrischen Messungen wurden aus festgelegten Flächen der Gewebeschnitte, in denen sich das Defektzentrum der ursprünglich

implantierten Schraube und die für die Fragestellungen relevanten peripheren Gewebeteile befinden mussten, Aufnahmen von Rastern aus der zu untersuchenden Region mit der hochauflösenden 12-Megapixel-Kamera DC 500 (Leica Camera AG, Wetzlar, Deutschland) angefertigt.

Diese Aufnahmen wurden über das Blickfeld eines Objektivs des Lichtmikroskops Zeiss Axioplan 2 (Carl Zeiss Mikroskopie, Jena, Deutschland) mit einer 5-fachen Vergrößerungsstärke angefertigt und 233 Pixel entsprachen einer Länge von 0,5 mm und 233 x 233 Pixel damit einer Fläche von 0,25 mm².

Mit dem Bildverarbeitungsprogramm Adobe Photoshop CS3 Extended (Ströer Media Brands, Berlin, Deutschland) konnten die Rasteraufnahmen zu einem Gesamtbild zusammengesetzt und mit der computergesteuerten Begleitsoftware von Adobe Photoshop CS6 Extended die zu messenden Flächen in mm² angegeben und in die histologischen Bilder eine maßstabsgerechte Skalierung eingefügt werden.

2.3.1 Histomorphometrische Messung von Distanzen

Zu den in dieser Arbeit erhobenen Daten zählte die Messung der Distanz zwischen dem angenommenen Mittelpunkt des durch das Implantat bedingten Knochendefektes und dem Mittelpunkt des am weitesten distal gelegenen H₂-gefüllten Vesikels.

Aus Gruppe 1 sind 6 Wo postoperativ das korridierte Implantat (Imp) und im periimplantären Granulations- und Spongiosagewebe ein H₂-gefülltes Vesikel (→) beispielhaft dargestellt (Abb. 1).

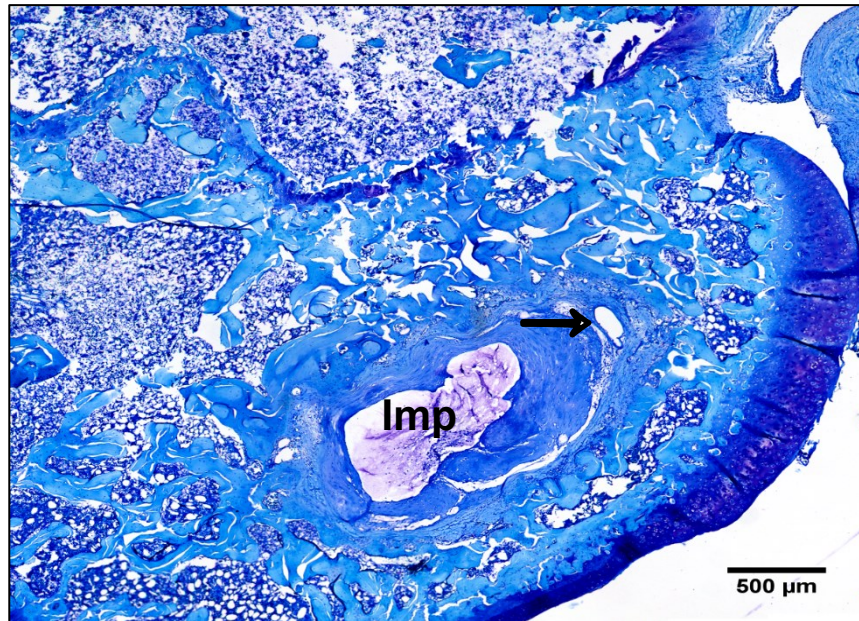


Abb.1: Gruppe W4 1-mal verpresst 6 Wo, H₂-Gasblase (→) im Granulationsgewebe nahe dem ursprünglichen Implantat (Imp), Paraffin, TB-Färbung.

Als Voraussetzungen für ein veritables Messresultat wurden definiert:

- Eine Fläche der H₂-gefüllten Vesikel von $\geq 0,003 \text{ mm}^2$,
- Sichere Abgrenzung des am weitesten distal gelegenen Vesikels von anderen Hohlräumen in der Umgebung,
- Komplette vorhandene Randzonen des Messobjektes für eine korrekte Identifikation des Hohlraummittelpunktes.

Für die Messungen von Strecken in den histologischen Bildern wurde in den kreisförmigen Querschnitt des Schraubenkanals ein zweidimensionales kartesisches Koordinatensystem mit dem durch die Kreuzung von Abszisse und Ordinate gebildeten Mittelpunkt projiziert (Abb. 2).

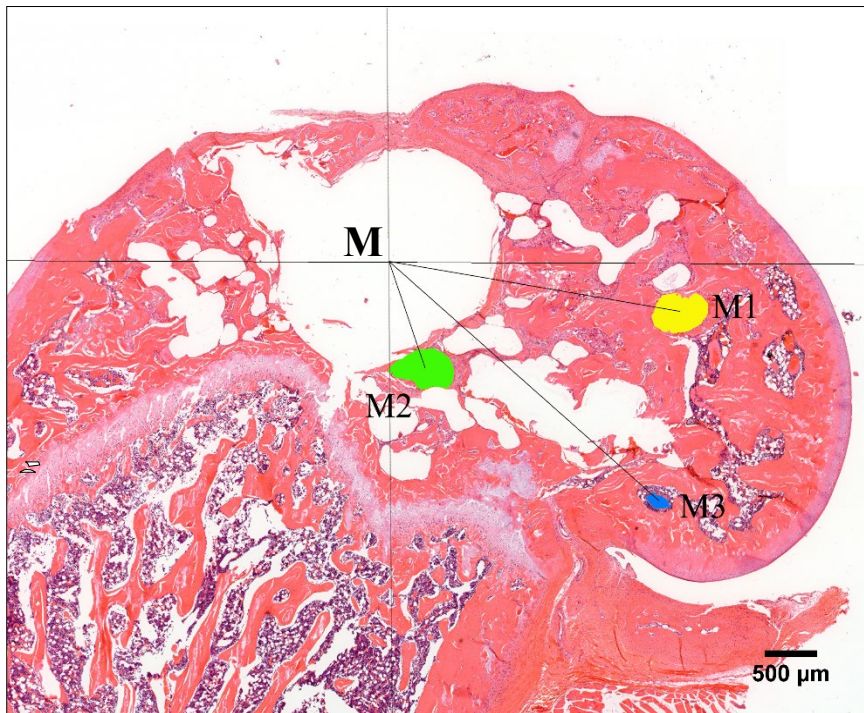


Abb. 2: Gruppe W4 2-mal verpresst 6 Wo, Darstellung des Mittelpunktes (M) im Knochendefekt und der Distanzstrecken M1-M3 zu H₂-Gasblasen, Paraffin, HE-Färbung.

In der Abb. 2 sind das Koordinatenkreuz für die Bestimmung des Mittelpunktes im Knochenkanal und 3 Vektoren (M1-M3) für die Distanzen zu den am nächsten (D1) und am weitesten (D3) entfernten H₂-Vesikeln dargestellt. Die Distanzlänge wurde mittels der Software von Adobe Photoshop CS6 Extended berechnet.

2.3.2 Histomorphometrische Messung von Flächen

Die histomorphometrische Flächenmessung der im peripheren Bereich des Knochenkanals gebildeten H₂-Gasblasen wurde mit drei methodischen Schritten vorgenommen.

Messmethode 1 – Testmessung in einer definierten AOI

Im ersten Teil erfolgte eine Testmessung im Bereich einer Area of Interest (AOI). Dafür wurde, abgeleitet von der Fläche des Querschnitts des Schraubenkanals, eine kreisförmige Fläche von $2,468 \text{ mm}^2$ in das histologische Bild projiziert.

Die Fläche der AOI tangiert den Mittelpunkt des Querschnitts des Knochenkanals und bedeckt einen Teil des Knochendefekts (grün markiert) sowie Teile der Spongiosa (rot markiert) und der darin befindlichen Gasbläschen (gelb markiert).

Die Gesamtfläche der gebildeten Gasbläschen in der AOI ergibt sich aus der Subtraktion der grün und rot markierten Flächenanteile (Abb. 3).

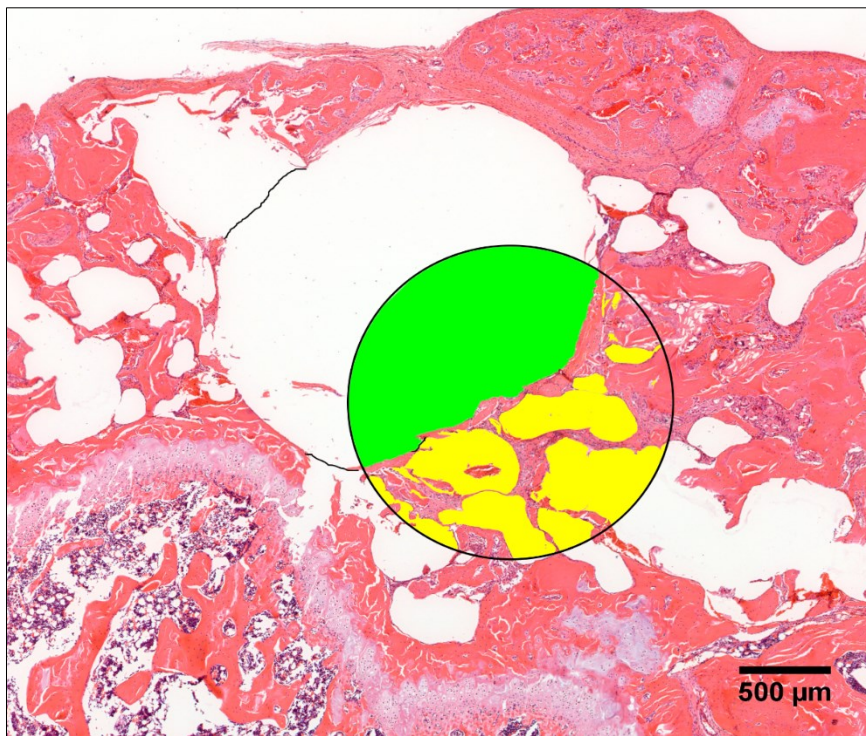


Abb. 3: Gruppe W4 2-mal verpresst 6 Wo, Berechnung der Fläche der in der AOI vorhandenen H_2 -Gasblasen, Paraffin, HE-Färbung.

Messmethode 2 – Fläche der Gasblasen in den Zonen 3 und 4:

Im zweiten Teil der histomorphometrischen Messungen wurden die AOIs in einen, dem knöchernen Defekt entsprechenden zentralen Kreis (gelb markiert) und in drei um den Defektbereich konzentrisch gruppierte Ringzonen gegliedert (grün-, blau und schwarz markiert). Die Fläche der Quadranten waren Sektoren, beginnend vom Mittelpunkt der Defektzone (gelb markiert) und bis zur periphersten Ringzone (schwarz markiert) reichend (Abb. 4).

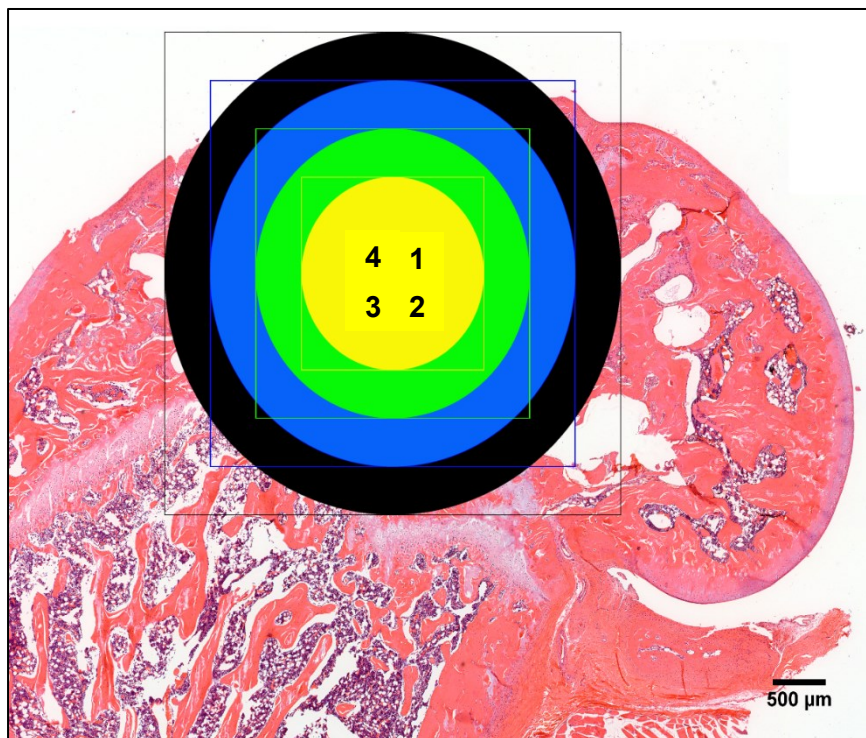


Abb. 4: Gruppe W4 2-mal verpresst 6 Wo, Meßbereiche, gegliedert in eine zentrale Kreiszone und 3 Ringzonen sowie 4 Quadranten (1-4), Paraffin, HE-Färbung.

Messungen der H₂-Gasblasen erfolgten nur in den 4 Quadranten der Ringzonen 3 und 4, da diese Ringzonen überwiegend das Kriterium erfüllten, außerhalb der Defektzone und innerhalb der Gewebeschnitte zu liegen.

2 Material und Methoden

Das traf für die Ringzone 3 auf alle 27 Versuchstiere und für die Ringzone 4 auf 26 von 27 Versuchstieren zu (Abb. 5).

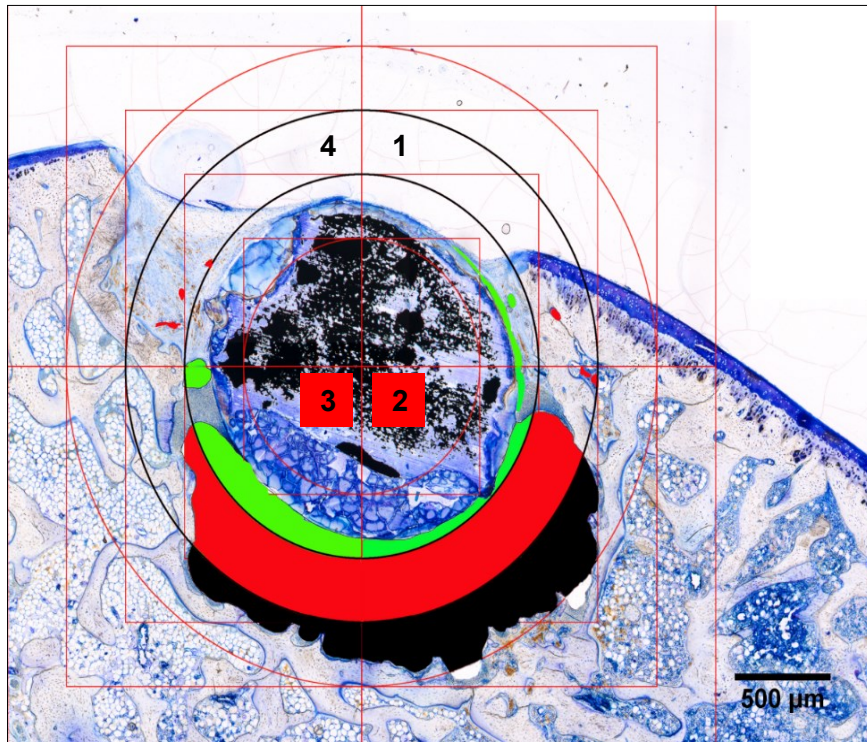


Abb. 5: Gruppe W4 2-mal verpresst 12 Wo, die Quartale 2 und 3 bilden optimale AOI der Ringzonen 3 (rot) und 4 (schwarz), Technovit, TB-Färbung.

In Abb. 5 sind die differenzierten Messmöglichkeiten in Abhängigkeit zur optimalen Flächenerfassung dargestellt. Während die Quartale 1 und 4 sowohl im Bereich der Ringzonen 3 und 4 als auch der Defektzone keine Messung von H_2 -Gasblasen ermöglichen, stellen die Quartale 2 und 3 optimale Messbereiche dar.

Messmethode 3 – Gesamtfläche aller Gasblasen:

In einem dritten Teil der Messungen wurden die Flächen aller vorhandenen H₂-Gasblasen im peripheren Bereich der Defektfläche ermittelt.

Für diese Messungen wurde für die AOI der Radius von 1,05 mm auf 2,15 mm erweitert, so dass sich eine Gesamtfläche von 14,468 mm² für die Defektfläche und für die periphere AOI ergab (Abb. 6).

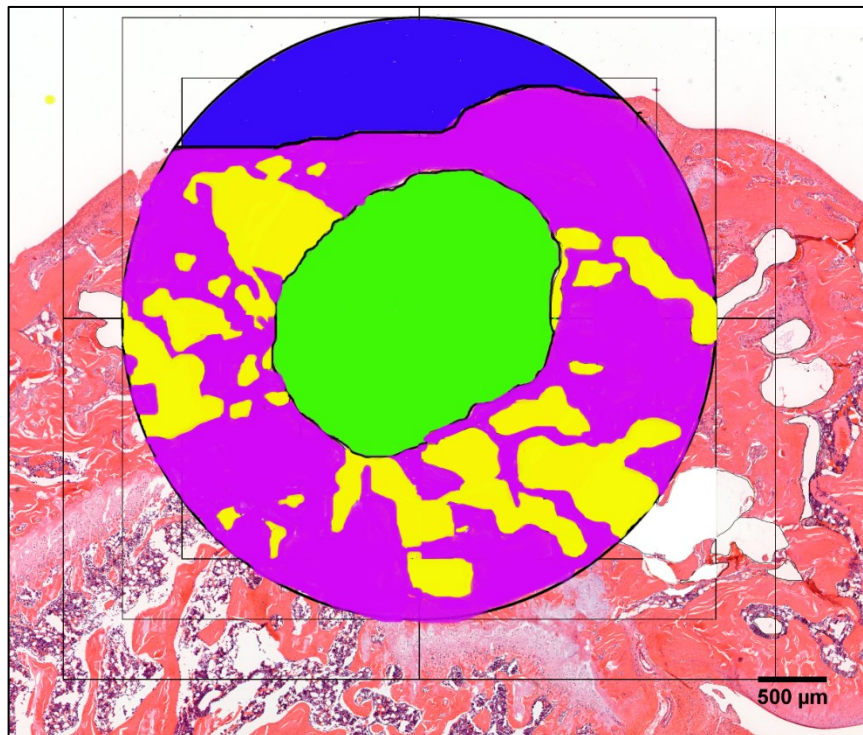


Abb. 6: Gruppe W4 2-mal verpresst 6 Wo, Messung aller H₂-Gasblasen peripher des Defektbereichs durch Erweiterung der AOI, Paraffin, HE-Färbung.

Die Fläche aller H₂-gefüllten Vesikel peripher des Schraubenkanals ergab sich aus der Subtraktion der Fläche des Schraubenkanals (grün markiert), einer eventuell vorhandenen Fläche außerhalb des Gewebeschnittes (blau markiert) und des in der AOI befindlichen Knochen- und Bindegewebes (lila markiert) von der Gesamtfläche von 14,468 mm², bestehend aus Defektbereich und peripherer AOI.

2.4 Histochemische Methoden

Für den Nachweis von Stoffwechselreaktionen und den morphologischen Umbau im umgebenden Knochengewebe nach Implantation von Mg-haltigen Schrauben in den medialen Kondylenbereich von Ratten wurden enzymhistochemische Methoden zum Nachweis von Phosphatasen und eine immunhistochemische Methode zum Nachweis des Zelloberflächenproteins PECAM-1, das als Marker für die Neogenese von Blutgefäßendothelien gilt, im Operationsbereich vorgenommen. Hinsichtlich der Anzahl der Zellen mit positivem Nachweis von Phosphatasen wurde eine semiquantitative Bestimmung in Form eines Scorings vorgenommen. Der Nachweis von Phosphatasen wurde nach folgender Graduierung differenziert:

- ▶ Keine positiven Zellen nachweisbar – Scorewert 0
- ▶ Geringe Anzahl positiver Zellen nachweisbar – Scorewert 1
- ▶ Vermehrte Anzahl positiver Zellen nachweisbar – Scorewert 2

2.4.1 Tartrat-resistente saure Phosphatase (TRAP)

TRAP wird in Osteoklasten produziert und ist ein Indikator für Osteolyse. Der Nachweis von TRAP in Osteoklasten, aber auch in Chondroklasten, Makrophagen und Monozyten erfolgt über eine granuläre Rotfärbung des Zellplasmas.

Die ossären Paraffinschnitte wurden in einem ersten Schritt mittels Xylol (Sigma-Aldrich) deparaffiniert und in einer absteigenden Alkoholkonzentrationsreihe von 100 % bis 70 % (Carl Roth GmbH) hydriert. Nachfolgend wurden die Gewebeschnitte für 10 Min in 0,1 M Azetatpuffer (Sigma-Aldrich) mit einem pH-Wert von 5,2 zur Entfernung von Alkoholresten eingelegt.

Für die Färbung des Zytoplasmas TRAP-positiver Zellen wurden 35 mg Naphthol-Anilidsäure-Tartrat-resistentes-Phosphat (Sigma-Aldrich), 125 Mikroliter (µl) *N-N*-Dimethylformamid, (Sigma-Aldrich), 57,5 mg Di-Natriumtartrat-Dihydrat (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) und 35 mg Echtrotsalz (Sigma-Aldrich) in 25 ml Na-Azetatpuffer (pH-Wert 5,2) gelöst.

Die Gewebeschnitte wurden mit dieser Lösung versetzt und anschließend für 30 Min in einem Brutschrank (Hapro Industriegeräte GmbH, Solingen, Deutschland) bei 37 °C inkubiert. Nach Spülung der Schnitte in Aqua dest. folgte für 30 Min eine HE-Färbung (Shandon Scientific Ltd, Cheshire-County, England). Danach wurden eine schrittweise Dehydrierung der Gewebeschnitte mit ansteigenden Alkoholkonzentrationen von 37 % bis 100 % sowie eine Deparaffinierung durch 2-maliges Einlegen für je 5 Min in Xylol

(Sigma-Aldrich) vorgenommen. Mittels Glycerin-Gelatine von Kaiser (Merck KGaA) wurden Deckgläschen auf den Präparaten fixiert und diese klebende Gelatine härtet bei Zimmertemperatur in 24 Std aus.

2.4.2 Alkalische Phosphatase (ALP)

Die ossären Paraffinschnitte wurden zunächst mittels Xylol (Sigma-Aldrich) deparaffiniert und in einer abnehmenden Reihe an Alkoholkonzentration von 100 % bis 70 % (Carl Roth GmbH) hydriert. Danach wurden die Gewebeschnitte zur ALP-Färbung mit zwei Komponenten zur Blaufärbung des Zellplasmas der Osteoblasten inkubiert. Bei den zwei Färbekomponenten handelte es sich um die Substanzen Phosphatasesubstrat 5-Bromo-4-Chloro-Indolyl-Phosphat (BCIP) und Nitro-Blau-Tetrazoliumsalz (NBT) der Firma SerCare (Milford, USA). Die Inkubationszeit in einem Brutschrank betrug 45 Min bei 37 °C. Anschließend wurden die Schnitte 2-mal in Aqua dest. zur Entfernung der Färbesubstrate gesäubert und danach mit dem Färbesubstrat Kernechtrot (Carl Roth) zur Rotfärbung der Zellkerne bedeckt und für 15 Min bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Nach erneuter Spülung der Objektträger unter fließendem Leitungswasser wurden die Gewebeschnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe von 70 % bis 100 % entwässert, danach der Alkohol mit 2-maliger Spülung von je 5 Min in Xylol entfernt und die Präparate auf den Objektträgern mit Deckgläschen, unter Verwendung des Kunstharzes DePex (Serva Electrophoresis GmbH) gedeckelt.

2.4.3 Immunhistochemische Untersuchungen – PECAM-1

PECAM-1 ist ein Protein, das zur Gruppe der Immunglobuline gehört, und es wird vorwiegend auf der Oberfläche von Endothelzellen, Monozyten, neutrophilen Granulozyten und Thrombozyten exprimiert (Newman et al. 1990). Das Vorkommen an Endothelzellen prädestiniert PECAM-1 als indirekten Nachweis einer Einsprossung von Gefäßendothelien in den Spongiosabereich des Femurs und wurde daher als Marker dieses morphologischen Vorgangs in die Arbeit aufgenommen.

Für den immunhistochemischen Nachweis von PECAM-1 wurden die Paraffinschnitte zunächst mit 2-maliger und jeweils 10-minütiger Einwirkzeit von Xylol (Sigma-Aldrich) deparaffiniert und danach in einer deszendierenden Alkoholreihe von 100 %, 96 %, 80 % (je 2-mal 5 Min) und 70 % 1-mal 5 Min (Carl Roth GmbH) rehydriert.

Zum Nachweis von PECAM-1 erfolgte zunächst eine Vorbehandlung der Gewebeschnitte mit Trispuffer (pH 7,4) in einem Wasserbad von 95 °C für 20 Min. Nach einer

2 Material und Methoden

Abkühlungsphase von 15 Min wurden die Schnitte für 3-mal 5 Min in Trispuffer gespült. Danach wurde das Serum Rabbit-Immunglobulin-Fraction (Dako Cytomation GmbH, Hamburg, Deutschland) in einer Verdünnung von 1:1000 in 1%igem Trispuffer-Rinderserumalbumin (BSA, Sigma-Aldrich) auf die Schnitte pipettiert und für 20 Min in einer feuchten Kammer eines Brutschranks (Hapro Industriegeräte GmbH) bei 37 °C inkubiert. Das BSA mindert unspezifische Bindungen von Primärantikörpern an freien reaktiven Gewebsantigenen.

Die weiteren Inkubationen erfolgten in einem befeuchtbaren Brutschrank bei 37 °C und pro Objektträger wurden 150 µl Inkubat aufpipettiert. Die Inkubation mit dem Primärantikörper PECAM-1, CD31 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA) erfolgte verdünnt im Verhältniss 1:50 mit Trispuffer-BSA für 30 Min und für die Inkubation mit biotinyliertem anti-Ziegen Sekundärantikörper (Dako Cytomation GmbH) verdünnt im Verhältnis 1:800 mit 3 %igem Trispuffer-BSA ebenfalls für 30 Min. Nach beiden Inkubationen erfolgte je ein 3-maliges Waschen in Trispuffer (pH 7,4).

Anschließend wurden die Schnitte mit dem Streptavidin-Biotin-Peroxidase-Komplex (Dako Cytomation GmbH) für 30 Min bei Raumtemperatur inkubiert und mittels Nova-Red Substrat-Kit (Vector, Wertheim-Bettingen, Deutschland) für Peroxidase sichtbar gemacht. Zur besseren Kontrastierung erfolgte noch eine Gegenfärbung mit Hämalaun (Morphisto-GmbH, Frankfurt/M, Deutschland).

Die immunhistochemischen Schnitte wurden mit dem Fotomikroskop Axioplan-2 (Carl Zeiss) vergrößert und mit der Digitalkamera Leica DC 500 (Leica Camera AG) dokumentiert.

2.5 Statistische Methoden

Die Statistik zu vergleichenden Daten histomorphometrischer Ergebnisse der Distanzmessung zwischen H₂-Gasblasen und dem Defektmittelpunkt sowie der Messungen von Flächen-Volumen-Relationen der Gasblasen wurden mit der Statistiksoftware SPSS 24 (Statistical Package for the Social Sciences) der Firma IBM (IBM Deutschland GmbH, Ehningen, Deutschland) vorgenommen.

In der einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA – analysis of variance) wurde ein Alpha-niveau von unter fünf Prozent festgelegt, so dass ein p-Wert von $p < 0,05$ als statistisch signifikant deklariert werden konnte. Fand sich in der Varianzanalyse ein signifikanter Unterschied in den Versuchsgruppen, erfolgte im Weiteren der intergruppalen Vergleich. Hierzu wurde der Posthoc-Test FISHER (Least Significant Difference-LSD) unter Berücksichtigung der Alphafehlerkumulierung verwendet.

Die graphische Darstellung erfolgte über Boxplots. Bei der graphischen Abbildung von Boxplots wurden fünf statistisch relevante Berechnungen (Quantile) für eine Gruppe in der nachfolgenden Weise dargestellt:

- Minimum (0 %-Quantil),
- 25 %-Quantil,
- Median (50 %-Quantil),
- 75 %-Quantil,
- Maximum (100 %-Quantil).

Signifikanzniveaus von $p < 0,05$ wurden als statistisch signifikant (*) und Niveaus von $p < 0,01$ als statistisch hochsignifikant (**) deklariert.

3 Ergebnisse

3.1 Histologische Auswertung

Im ersten Teil der histologischen Analyse wurde die Genauigkeit der Identifikation von H_2 -Gasblasen in allen Gewebeschnitten der 5 Versuchsgruppen überprüft. Im Folgenden ist ein Gewebeschnitt für jede Gruppe beispielhaft dargestellt.

3.1.1 Versuchsgruppe W4 1-mal verpresst 6 Wo

In der Gruppe mit Implantaten aus 1-mal verpresster W4-Legierung und einer in situ Verweildauer von 6 Wo ist in der histologischen Darstellung der kondyläre Implantatbereich dargestellt, umgeben von zwei kranialen Gasblasen und mehreren Gasblasen rechts lateral (Abb. 7).

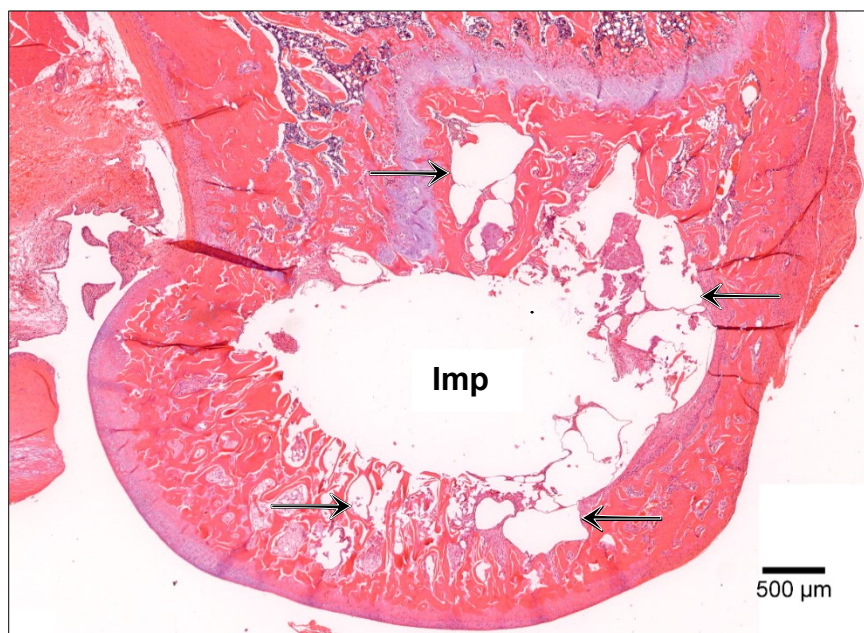


Abb. 7: Gruppe W4 1-mal verpresst 6 Wo, intraossäre periimplantäre (Imp) H_2 -Gasblasen ($\rightarrow \leftarrow$), HE-Färbung.

Die Gasblasen liegen teilweise separiert vom ehemaligen Implantat im Kondylenbereich, teilweise befinden sie sich eng anliegend im periimplantären Knochengewebe beziehungsweise (bzw.) im Bereich des Knochenmarks.

3.1.2 Versuchsgruppe W4 2-mal verpresst 6 Wo

In der Versuchsgruppe W4 2-mal verpresst 6 Wo sind Knochenschrauben implantiert worden, bei denen die Entnahme von Proben für die histologische Untersuchung 6 Wo nach Implantation erfolgte.

Im Vergleich zu den histologischen Analysen der Versuchsgruppe W4 1-mal verpresst 6 Wo, ergaben sich in der Versuchsgruppe W4 2-mal verpresst 6 Wo differente Befunde: Bei allen fünf Versuchstieren zeigten sich in der Metaphyse gegenüber der Gruppe W4 1-mal verpresst größere H_2 -Gasblasen mit Durchmessern bis zu 1 mm (Abb. 8).

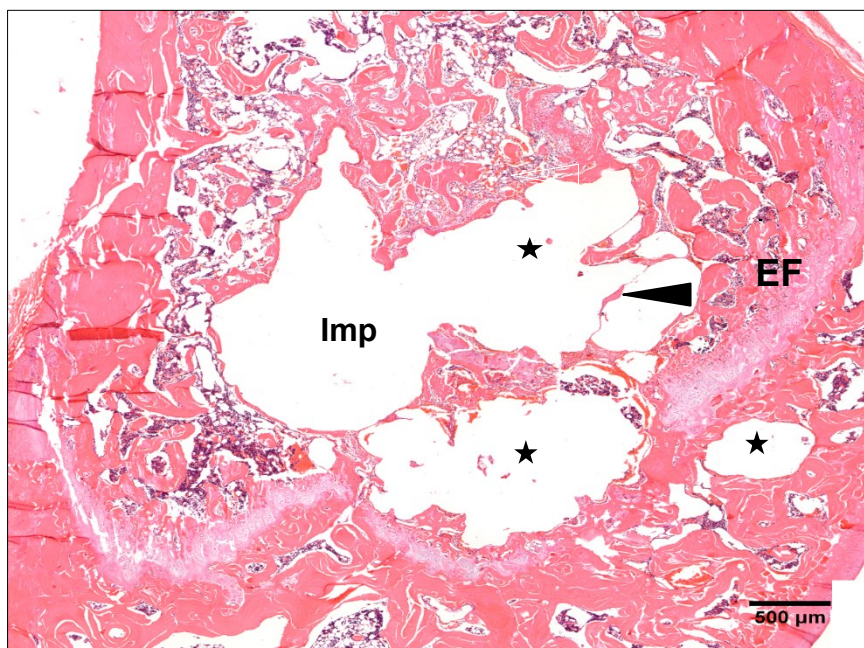


Abb. 8: Gruppe W4 2-mal verpresst 6 Wo, große Gasblasen () mit Septierung (◄) am ursprünglichen Implantat (Imp), die Gasblase durchbricht teilweise die Epiphysenfuge (EF), HE-Färbung.

Die Gasblasen liegen dicht an der Epiphysenfuge und durchbrechen diese teilweise. Es stellen sich bindegewebige Einsprossungen in die H_2 -Gasblasen dar und die Gasblasen sind teilweise von Granulationsgewebe umgeben. Im Randbereich des Implantatlagers zeigt sich ebenfalls Granulationsgewebe als Vorläufer für neues Knochenwachstum.

3.1.3 Versuchsgruppe W4 1-mal verpresst 12 Wo

In der Versuchsgruppe mit implantierten Knochenschrauben, gefertigt aus 1-mal verpresster W4-Legierung, betrug die in situ Verweildauer 12 Wo. In der histologischen Darstellung ist der kondyläre Implantatbereich abgebildet (Abb. 9).

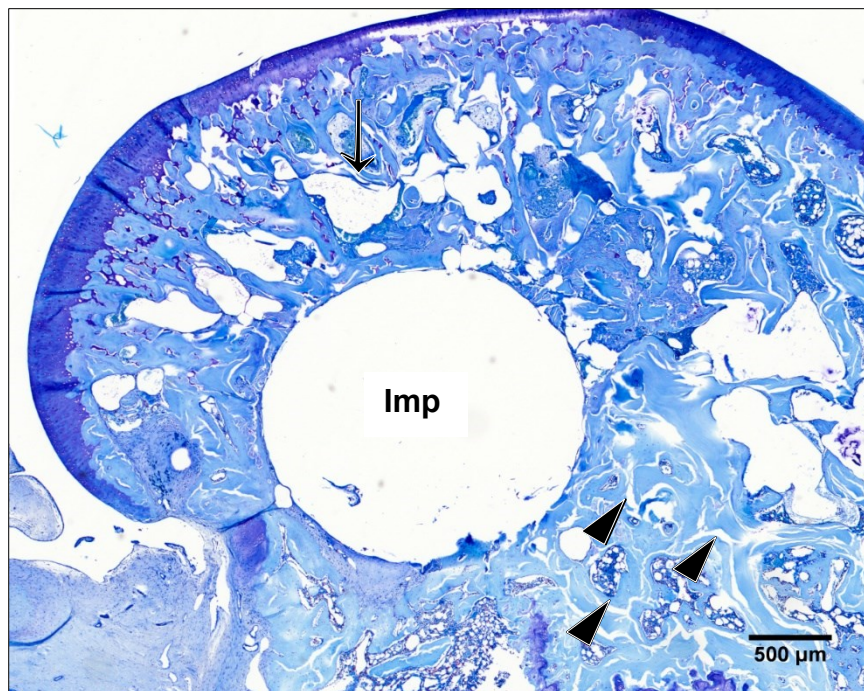


Abb. 9: Gruppe W4 1-mal verpresst 12 Wo, intraossäre, periimplantäre (Imp) H₂-Gasblasen (→ ←) und diffuse ossäre Lokalisation von H₂ (►), TB-Färbung.

In Abb. 9 sind zahlreiche Gasblasen im kranialen haubenförmigen Bereich des Implantatlagers lokalisiert. Einzelne H₂-Gasblasen befinden sich im Gegensatz zu der Versuchsgruppe 1 weiter entfernt vom Implantatlager. Zusätzlich stellt sich durch die teilweise diffuse H₂-Verteilung ein aufgelockertes Knochengefüge dar. Die H₂-Gasblasen differieren im Ausmaß der Durchmesser von < 20 µm bis 250 µm. Teilweise haben sich kleinere H₂-Blasen bereits im subkortikalen Bereich der Kondylen gebildet.

3.1.4 Versuchsgruppe W4 2-mal verpresst 12 Wo

In dieser Versuchsgruppe wurden Knochenschrauben implantiert, die aus einer 2-mal verpressten W4-Legierung hergestellt waren. Die Entnahme der Implantate für die histologische Untersuchung erfolgte 12 Wo postoperativ.

In der nachfolgenden Abbildung ist ein Knochenschliff, gefärbt mit Toluidinblau dargestellt. Das Implantat (schwarz gefärbt) ist noch im Implantatkanal vorhanden und zeigt ausgeprägte Zeichen der Degradation (Abb. 10).

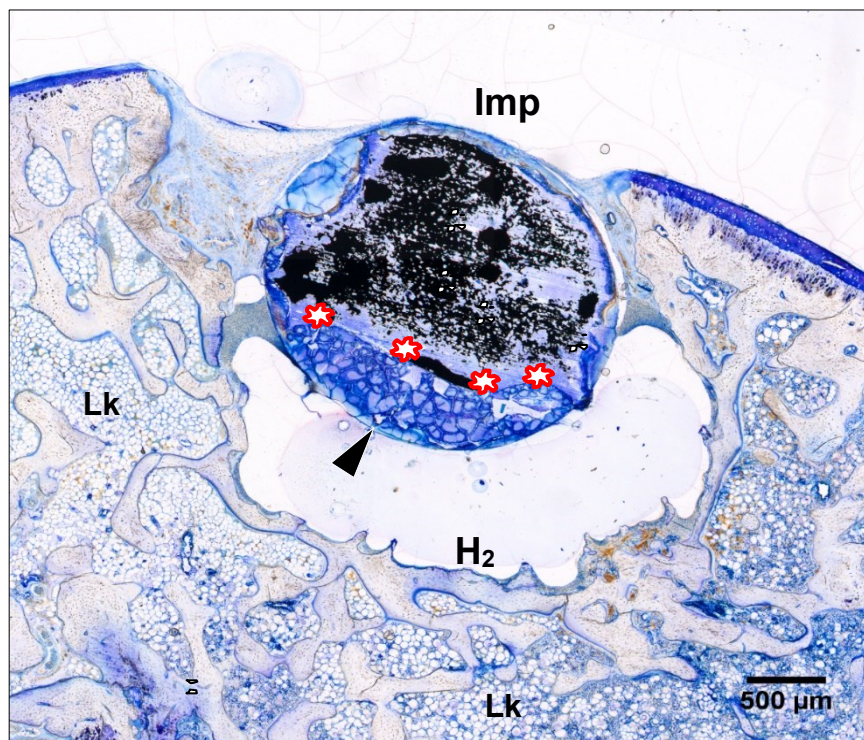


Abb.10: Gruppe W4 2-mal verpresst 12 Wo, Degradation () von ★nplantatmaterial (Imp) und Knochenneubildung (►) finden gleichzeitig statt. Zwischen Implantat und Lagerknochen (Lk) hat sich eine große Gasblase (H₂) gebildet, TB-Färbung.

12 Wo nach Implantation waren sowohl die Degradation der W4 2-mal verpressten Implantate als auch die Osteoneogenese bereits fortgeschritten. Die periimplantäre H₂-Gasblase in Abb. 10 weist einen Durchmesser von mehr als 2 mm auf. Die rotmarkierte Sternchenkette entspricht der Grenzschicht zwischen degradierendem Implantat (schwarz) und TB-gefärbten, neugebildeten Osteoblasten.

3.1.5 Versuchsgruppe Mg-HA-Komposit 12 Wo

In der folgenden Versuchsgruppe wurden Knochenschrauben aus Mg-HA-Komposit implantiert und die Entnahme der Knochen-Implantat-Präparate erfolgte bei allen Versuchstieren 12 Wo postoperativ.

Nach einer Versuchsdauer von 12 Wo zeigte sich, dass bei den Komposit-Implantaten eine Degradation nachzuweisen war und in diesem Bereich eine ausgeprägte Osteoneogenese im Defektbereich stattgefunden hatte (Abb. 11).

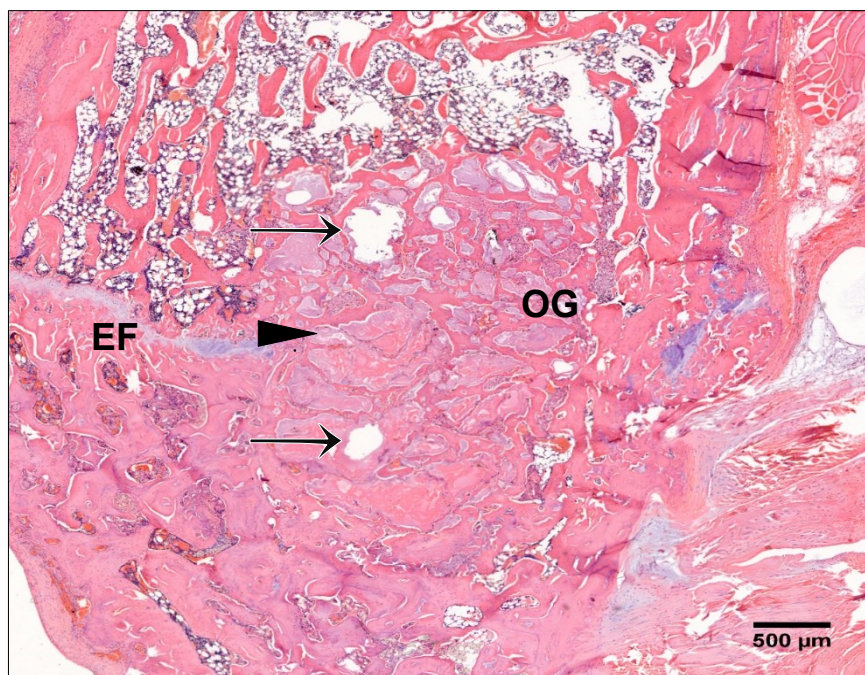


Abb. 11: Gruppe Mg-HA-Komposit 12 Wo, an den Kompositfragmenten weist die bläuliche Färbung (►) Osteoneogenese (OG) nach, wenige H₂-Gasblasen (→) haben sich gebildet, HE-Färbung.

In der Abbildung 11 ist auch zu erkennen, dass das Kompositimplantat die Epiphysenfuge (EF) durchsetzt hat und dass es im Defektzentrum zu einer ausgeprägten Osteoneogenese gekommen ist. In dieser Region sind noch Anteile des degradierten Kompositmaterials sichtbar und H₂-Gasblasen sind lediglich in geringer Anzahl vorhanden.

3.2 Histomorphometrie der H₂-Gasblasen im Knochengewebe

3.2.1 Messung der größten Distanzen von Gasblasen

Die Entfernung der H₂-Gasblasen vom angenommenen Mittelpunkt des Implantats kann als Maßstab für die Intensität der Degradation der Implantate gewertet werden. Um Differenzen im Ausmaß der Degradation zu verifizieren, erfolgte in den 5 Versuchsgruppen die Messung der Distanz zwischen Implantatlager und der am weitesten entfernt identifizierten H₂-Gasblase (Abb. 12).

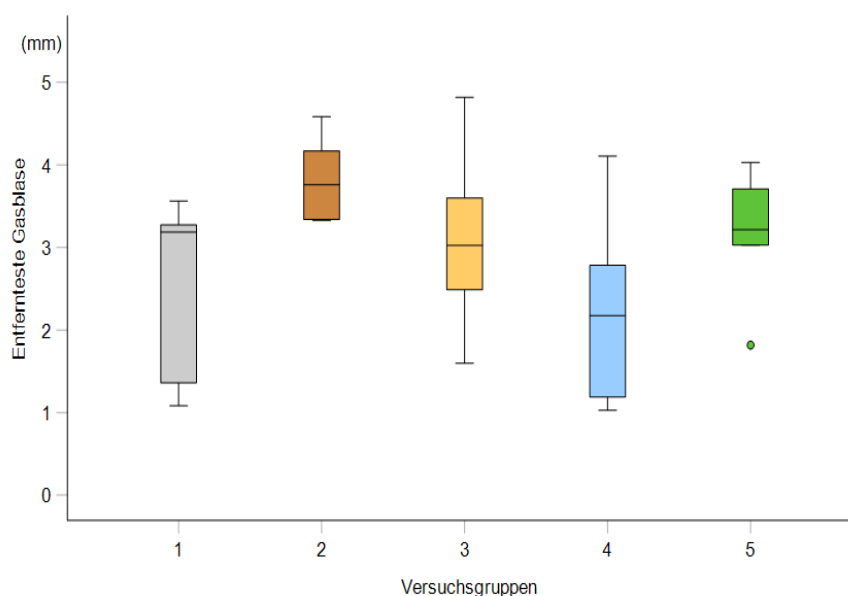


Abb. 12: Boxplot-Darstellung der am weitesten entfernten H₂-Gasblasen (mm) in den 5 Versuchsgruppen, (1) Gruppe W4 1-mal verpresst 6 Wo, (2) Gruppe W4 2-mal verpresst 6 Wo, (3) Gruppe W4 1-mal verpresst 12 Wo, (4) Gruppe W4 2-mal verpresst 12 Wo und (5) Gruppe Mg-HA-Komposit 12 Wo, Ausreißer

Die am weitesten entfernten H₂-Gasblasen in den 5 Versuchsgruppen wiesen eine Schwankung zwischen 1,03 mm bis 4,82 mm auf und die Datenverteilung der mittleren Beobachtungen der Quantile von 25 % bis 75 % zeigte Schwankungen zwischen 2,17 mm (W4 2-mal verpresst 12 Wo) bis zu 3,76 mm (W4 2-mal verpresst 6 Wo).

In den Versuchsgruppen W4 2-mal verpresst 12 Wo und W4 1-mal verpresst 12 Wo fanden sich konstante weiteste Entfernungen von Gasblasen zwischen 4,5 bis 4,8 mm. In der Versuchsgruppe Mg-HA-Komposit 12 Wo lag die weiteste Distanz bei 4,03 mm, wobei auch ein Ausreißer mit einer geringen maximalen Entfernung von 1,75 mm vorhanden war.

Statistisch signifikante Unterschiede konnten hinsichtlich der weitesten Distanzen von Gasblasen zwischen den 5 differenten Versuchsgruppen nicht nachgewiesen werden.

3.2.2 Testmessung der Fläche von Gasblasen

In Vorbereitung auf die Messung der H₂-Gasblasenflächen in den Zonen 3 und 4 sowie der Messung der Gesamtfläche aller Gasblasen in den Versuchsgruppen 1 bis 5 erfolgte zunächst eine Testmessung zum prozentualen Anteil von H₂-Gasblasen innerhalb einer definierten AOI mit einer Fläche von 2,468 mm² (Abb. 13).

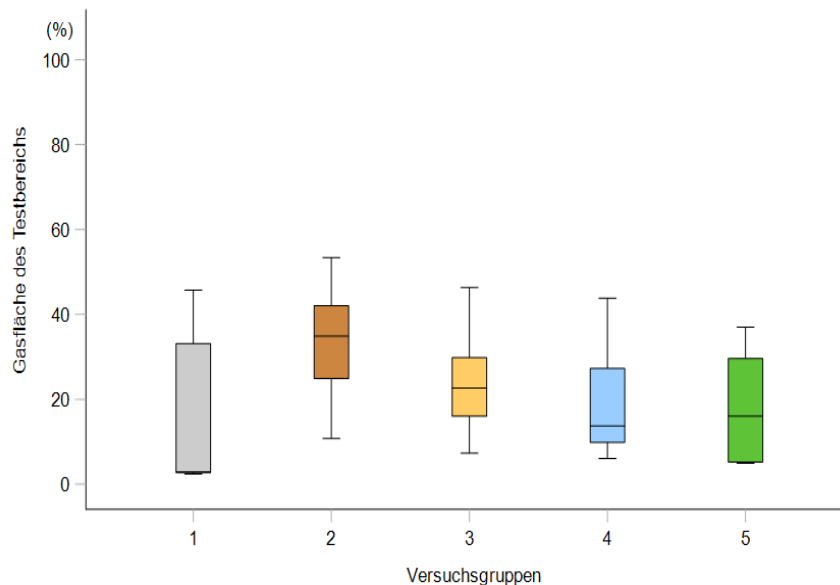


Abb. 13: Boxplot-Darstellung der Testmessung der Fläche von H₂-Gasblasen in den 5 Versuchsgruppen, (1) Gruppe W4 1-mal verpresst 6 Wo, (2) Gruppe W4 2-mal verpresst 6 Wo, (3) Gruppe W4 1-mal verpresst 12 Wo, (4) Gruppe W4 2-mal verpresst 12 Wo und (5) Gruppe Mg-HA-Komposit 12 Wo.

Bei dieser Testmessung des Anteils der Gasblasen in einer definierten AOI von 2,468 mm² bestanden große Differenzen in den mittleren Beobachtungen zwischen 2,9 % (W4 1-mal verpresst 6 Wo) bis 35 % (W4 2-mal verpresst 6 Wo) der Flächen und geringere Abweichungen in den kleinsten und größten Beobachtungen. Ausreißer traten in den Gruppen nicht auf.

3.2.3 Gasblasenfläche in Zone 3 (AOI 1,007 mm²)

Die AOI zur Messung der Gasblasenfläche in Zone 3 in einem Quadranten betrug 1,007 mm². Die mittleren Beobachtungen (25 – 75 %) des Anteils der Gasblasen an der Gesamtfläche zeigten Unterschiede zwischen 8 % in Versuchsgruppe W4 2-mal verpresst 12 Wo und 23,4 % in Gruppe W4 2-mal verpresst 6 Wo (Abb. 14).

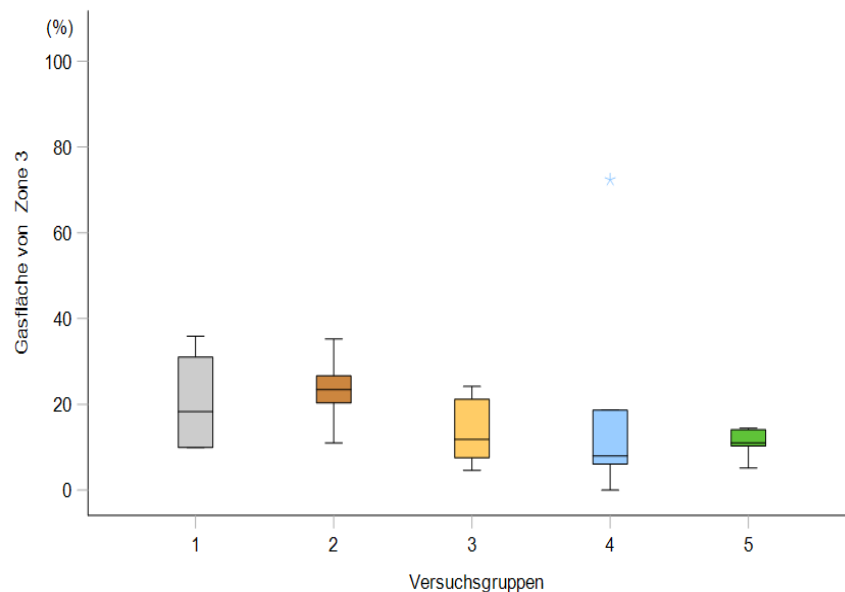


Abb. 14: Boxplot-Darstellung der Gasblasenfläche der 5 Versuchsgruppen in Zone 3, (1) Gruppe W4 1-mal verpresst 6 Wo, (2) Gruppe W4 2-mal verpresst 6 Wo, (3) Gruppe W4 1-mal verpresst 12 Wo, (4) Gruppe W4 2-mal verpresst 12 Wo und (5) Gruppe Mg-HA-Komposit 12 Wo. In Gruppe 4 befand sich ein Ausreißer (*) mit einer Gasfläche von 75 %.

Die mittleren Beobachtungen der Quantile 25 % bis 75 % der Versuchsgruppen W4 1-mal und 2-mal verpresst 6 Wo lagen gegenüber den übrigen 3 Versuchsgruppen mit einer Standzeit von 12 Wo höher, jedoch waren die größten und kleinsten Beobachtungen in Gruppe 2 (W4 2-mal verpresst 6 Wo) in einem extensiveren Streubereich. Die Unterschiede zwischen den Gasflächen der Gruppen 1 und 2 im Verhältnis zu den Gasflächen der Gruppen 3, 4 und 5 waren nicht signifikant ($p = 0,051$).

Allerdings bestand unter Berücksichtigung des p-Wertes, der nahe des statistisch signifikanten Wertes von $p < 0,05$ lag, ein statistisch tendenzieller Unterschied. Ausreißer waren bei Analyse der Gasflächen von Zone 3 nicht vorhanden.

3.2.4 Gasblasenfläche in Zone 4 (AOI 1,282 mm²)

Die AOI zur Erfassung der Gasblasenfläche in Zone 4 in einem Quadranten betrug 1,282 mm². Bei dem Vergleich der mittleren Gasblasenfläche (25 – 75 %) in Zone 4 fanden sich Schwankungen im Beobachtungsbereich Median von 2,5 % in der Versuchsgruppe W4 2-mal verpresst 12 Wo und 21,3 % in der Gruppe W4 2-mal verpresst 6 Wo (Abb. 15).

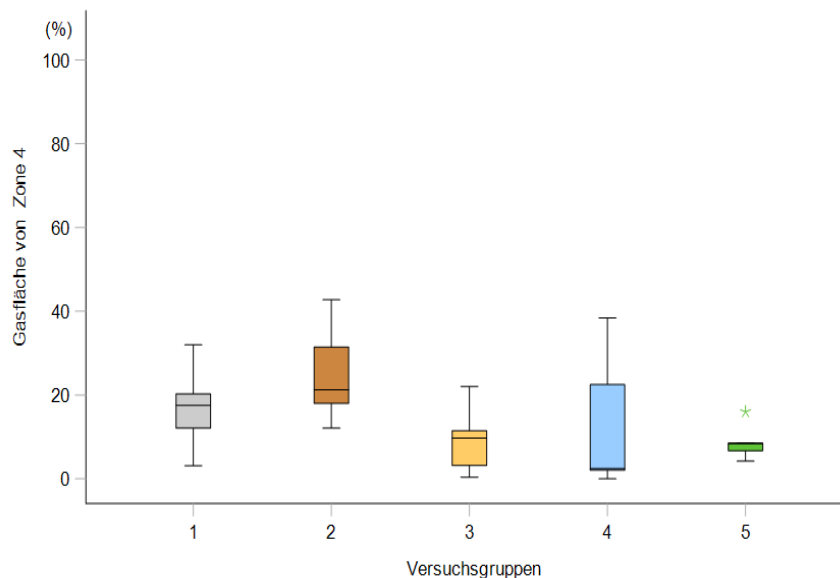


Abb.15: Boxplot-Darstellung der Gasblasenfläche der 5 Versuchsgruppen in Zone 4, (1) Gruppe W4 1-mal verpresst 6 Wo, (2) Gruppe W4 2-mal verpresst 6 Wo, (3) Gruppe W4 1-mal verpresst 12 Wo, (4) Gruppe W4 2-mal verpresst 12 Wo und (5) Gruppe Mg-HA-Komposit 12 Wo. Ein Ausreißer (*) fand sich in Gruppe 5.

Die 50 %-Mediane der Versuchsgruppen W4 1-mal verpresst 6 Wo und W4 2-mal verpresst 6 Wo lagen mit 17,6 % bzw. 21,3 % im Vergleich zu den Versuchsgruppen W4 1-mal verpresst 12 Wo, W4 2-mal verpresst 12 Wo und Mg-HA-Komposit 12 Wo höher. Allerdings waren die größten und kleinsten Gasblasenflächen der Gruppen W4 1-mal verpresst 12 Wo und W4 2-mal verpresst 12 Wo in einem sehr hohen Streubereich, so dass sich zwischen diesen 2 Versuchsgruppen mit Standzeiten von 6 Wo und den Gruppen W4 1-mal verpresst 12 Wo, W4 2-mal verpresst 12 Wo und Mg-HA-Komposit 12 Wo keine signifikanten Unterschiede ergaben ($p = 0,147$). In der Gruppe Mg-HA-Komposit 12 Wo war ein Ausreißer mit einer maximalen Beobachtung von 16 % vorhanden.

3.2.5 Flächenmessung aller Gasblasen in der gesamten AOI (14,468 mm²)

Für eine möglichst vollständige Erfassung aller H₂-Gasblasen in der Peripherie des Schraubenkanals (Defektfläche) wurde gegenüber der Testmessung und der Messung in den Zonen 3 und 4 der Radius der AOI von 1,05 mm auf 2,15 mm erweitert, so dass die AOI zur Berechnung der Fläche der Gasblasen in den 5 Versuchsgruppen 14,468 mm² betrug. Diese Fläche entsprach der Summe aus Defektfläche und peripherer AOI. Die Gesamtsumme der Gasflächen ergab sich somit aus der Differenz zwischen peripherer AOI und dem peripheren Gewebe ohne Gasbestandteile.

Die größte Gasblasenbildung wurde in der Versuchsgruppe W4 2-mal verpresst 6 Wo mit einer Gasfläche von 34,4 % und die kleinste Gasblasenbildung in der Gruppe W4 2-mal verpresst 12 Wo mit einer Gasfläche von 2,9 % ermittelt (Abb. 16).

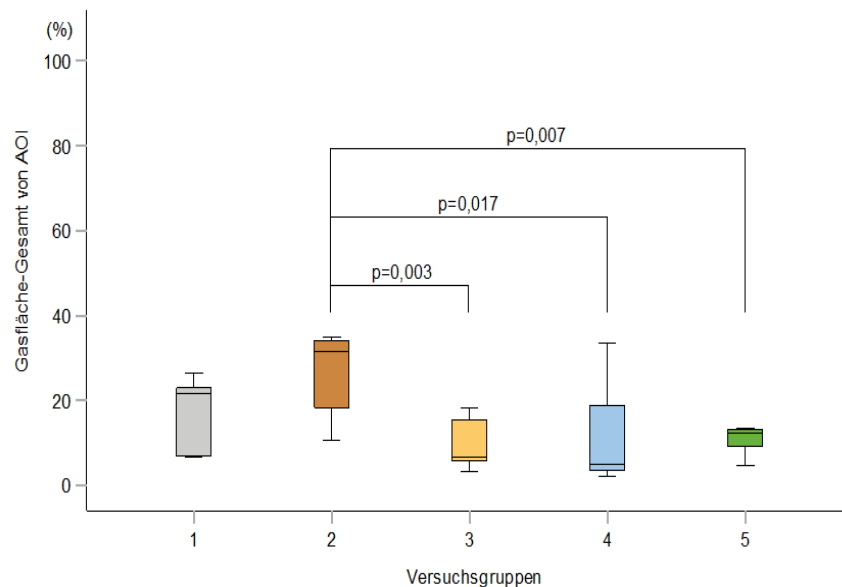


Abb.16: Boxplot-Darstellung der Gesamtfläche aller H₂-Gasblasen der 5 Versuchsgruppen, (1) Gruppe W4 1-mal verpresst 6 Wo, (2) Gruppe W4 2-mal verpresst 6 Wo, (3) Gruppe W4 1-mal verpresst 12 Wo, (4) Gruppe W4 2-mal verpresst 12 Wo und (5) Gruppe Mg-HA-Komposit 12 Wo.

Die höchsten Mediane (50 % Quantil) wiesen die Versuchsgruppe W4 2-mal verpresst 6 Wo mit 31,6 % und die Versuchsgruppe W4 1-mal verpresst 6 Wo mit 21,8 % auf. Von den 3 Versuchsgruppen mit Standzeiten von 12 Wo betrug der Median in der Versuchsgruppe Mg-HA-Komposit 12,4 %, in der Versuchsgruppe W4 1-mal verpresst 6,7 % und in der Versuchsgruppe W4 2-mal verpresst lediglich 4,9 %.

3 Ergebnisse

Eine zunächst durchgeführte einfaktorielle ANOVA zwischen den 5 Versuchsgruppen zeigte statistisch signifikante Unterschiede zwischen allen 5 Tiergruppen ($p = 0,022$). Auf Grund dieses Ergebnisses wurde für die intergruppale statistische Analyse ein Posthoc-Test (LSD) eingesetzt. Zwischen der Versuchsgruppe W4 2-mal verpresst 6 Wo und der Versuchsgruppe W4 1-mal verpresst 12 Wo ergaben sich hochsignifikante Unterschiede ($p = 0,003$). Ebenfalls hochsignifikante Unterschiede mit $p = 0,017$ bzw. $p = 0,007$ zeigten die Vergleiche zwischen der Versuchsgruppe W4 2-mal verpresst 6 Wo mit der Versuchsgruppe W4 2-mal verpresst 12 Wo und der Versuchsgruppe Mg-HA-Komposit 12 Wo.

3.3 Enzymnachweise im Knochengewebe

Nachweise der Enzyme TRAP und ALP wurden an histologischen Schnitten von implantattragenden Knochenresektaten vorgenommen, wobei die Entnahmen der Präparate von den Versuchstieren 6 und 12 Wo postoperativ erfolgten. Analysiert wurden die Lokalisation der Enzyme in Bezug auf das Implantatlager, auf regenerierendes Gewebe, wie z.B. Granulationsgewebe und auf positiven bzw. negativen Nachweis bei Monozyten, Makrophagen, Osteoblasten und Osteoklasten.

Hinsichtlich der Häufigkeit der TRAP- und ALP-positiven Zellen wurde eine semiquantitative Bestimmung in Form eines Scorings der Häufigkeit enzympositiver Zellen vorgenommen.

3.3.1 Tartrat-resistente saure Phosphatase (TRAP)

Für die Färbung des Zytoplasmas TRAP-positiver Zellen wurde Tartrat-resistentes-Naphthol-Anilidsäure-Phosphat eingesetzt. Die kontrastgebende Blaufärbung der Zellkerne erfolgte mittels einer HE-Färbung.

In der Versuchsgruppe W4 1-mal verpresst 6 Wo (n = 6 Tiere) fanden sich zahlreiche TRAP-positive Zellen innerhalb des Granulationsgewebes, das sich an den Rändern der H₂-Gasblasen gebildet hatte (Abb. 17).

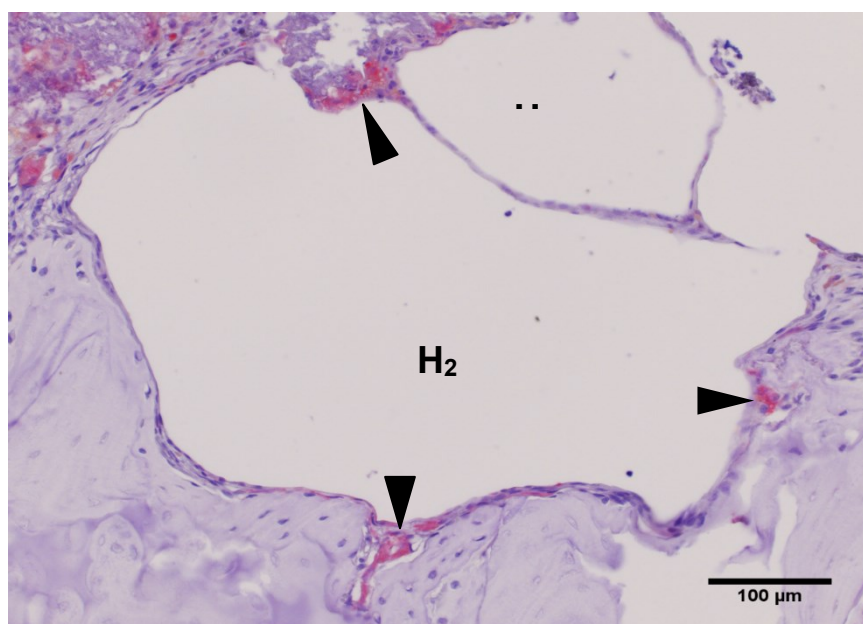


Abb. 17: Gruppe W4 1-mal verpresst 6 Wo, Nachweis von TRAP-positiven Zellen (►) an den H₂-Gasblasen.

3 Ergebnisse

TRAP-positive Zellen wie Makrophagen und Osteoklasten waren neben zahlreicher Präsenz im Granulationsgewebe in den peripheren Randbegrenzungen der Gasblasen gehäuft auch an Knochen trabekeln, in der Grenzzone zwischen Implantatlager und peripherem Knochengewebe und in der Umgebung neugebildeter Gefäße nachweisbar. Ebenfalls waren zahlreiche, zwischen Chondrozyten liegende TRAP-positive Zellen im Bereich der Epiphysenfuge zu finden.

In der Versuchsgruppe W4 2-mal verpresst 6 Wo (n = 6 Tiere) waren vergleichsweise mit der Gruppe W4 1-mal verpresst 6 Wo zahlreiche TRAP-positive Zellen vorhanden, die an der Neubildung von Granulationsgewebe, am Implantatabbau im Bereich des Interface und am Knochenumbau beteiligt waren. Es handelte sich vor allem um Osteoklasten sowie um mehrkernige Makrophagen, die vorwiegend in dem Granulationsgewebe sichtbar sind, das die Gasblasen umsäumt (Abb. 18).

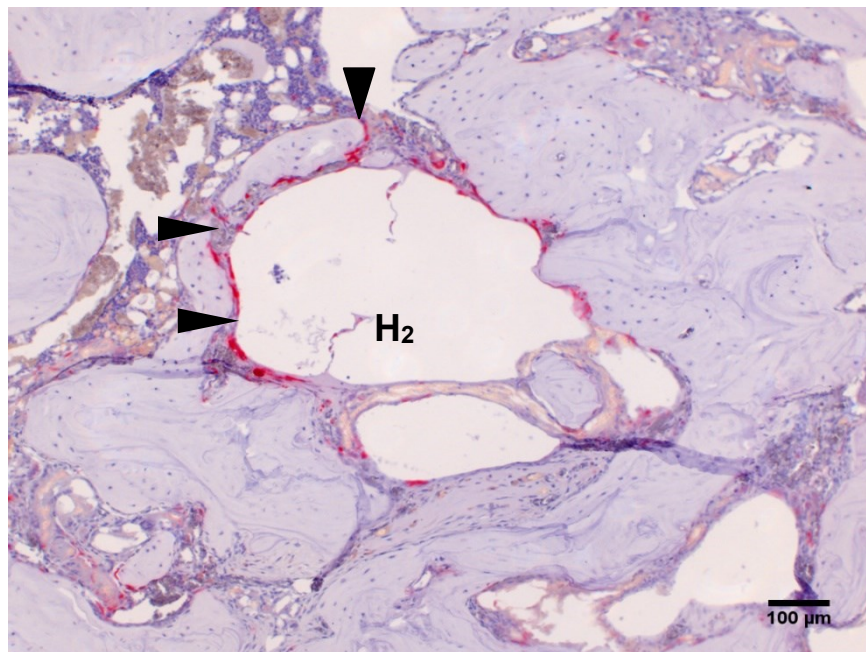


Abb. 18: Gruppe W4 2-mal verpresst 6 Wo, TRAP-positive Zellen (►) im Granulationsgewebe, welches die Gasblase (H₂) umsäumt.

Zu der Versuchsgruppe W4 1-mal verpresst 6 Wo und der Gruppe W4 2-mal verpresst 6 Wo lässt sich zusammenfassen, dass es hinsichtlich der Häufigkeit TRAP-positiver Zellen keine Unterschiede gab. Auffallend war jedoch, dass in der Versuchsgruppe W4-2-mal verpresst 6 Wo bei allen Versuchstieren TRAP-positive Zellen direkt an den Gasblasen lokalisiert waren.

In der Versuchsgruppe W4 1-mal verpresst 12 Wo (n = 3 Tiere) fanden sich TRAP-positive Zellen im Bereich von reparativem Granulationsgewebe sowie in der Nähe von Blutgefäßen. Insbesondere im Bereich des Interface zeigte sich eine starke Proliferation von Granulationsgewebe mit TRAP-positiven Zellen, bei welchen es sich vor allem um mehrkernige Makrophagen handelt.

Die Häufigkeit von TRAP-positiven Zellen war mit der geringen Anzahl dieser Zellen in der Gruppe W4 1-mal verpresst 6 Wo vergleichbar. Diese phagozytierenden Zellen waren vor allem in den Erosionslakunen, am Interface und in der Defektperipherie lokalisiert (Abb. 19).

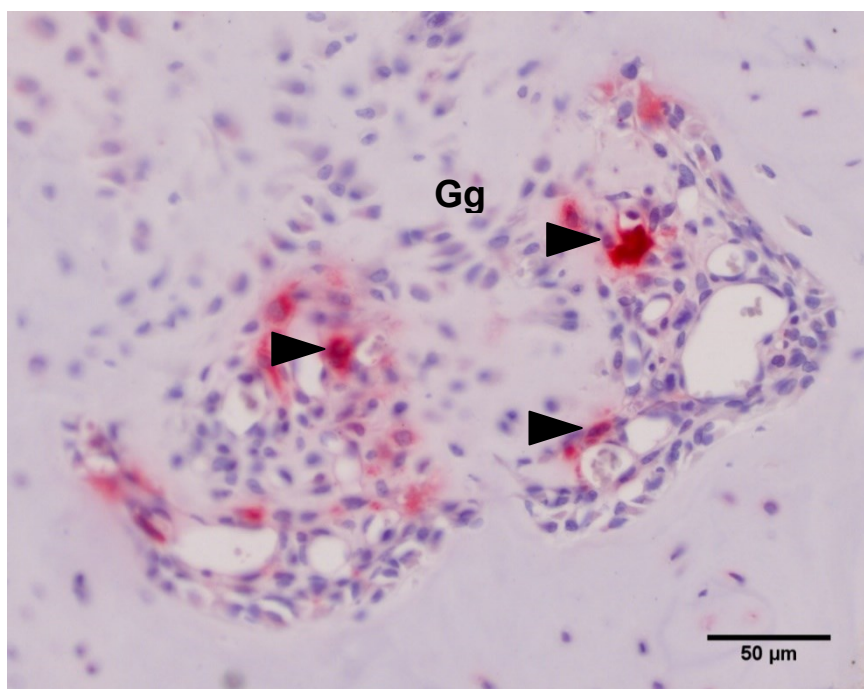


Abb. 19: Gruppe W4 1-mal verpresst 12 Wo, TRAP-positive Zellen (►) im Granulationsgewebe (Gg) in der Defektperipherie.

3 Ergebnisse

Vermehrte TRAP-positive Zellen fanden sich in der Versuchsgruppe W4 1-mal verpresst 12 Wo in Form von Osteoklasten im Bereich von Erosionslakunen mit Knochenumbau (Abb. 20).

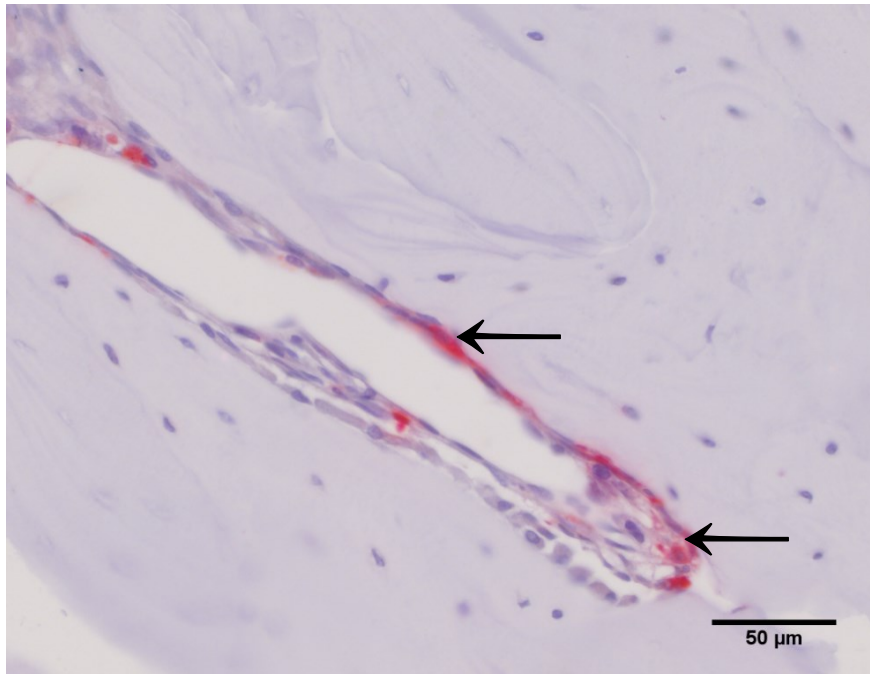


Abb. 20: Gruppe W4 1-mal verpresst 12 Wo, TRAP-positive Zellen (Osteoklasten) in einer Erosionslakune (←).

In der Versuchsgruppe W4 2-mal verpresst 12 Wo (n = 5 Tiere) waren TRAP-positive Zellen zirkulär des ehemaligen Implantatlagers, im Granulationsgewebe und in der Umgebung von kleineren Gasblasen nachweisbar. Im Bereich des ursprünglichen Implantats waren einwachsende Septen und Zellstränge, bestehend aus TRAP-positiven Bindegewebszellen zu erkennen, die zusammen mit Osteoblasten die Osteoneogenese nachwiesen (Abb. 21).

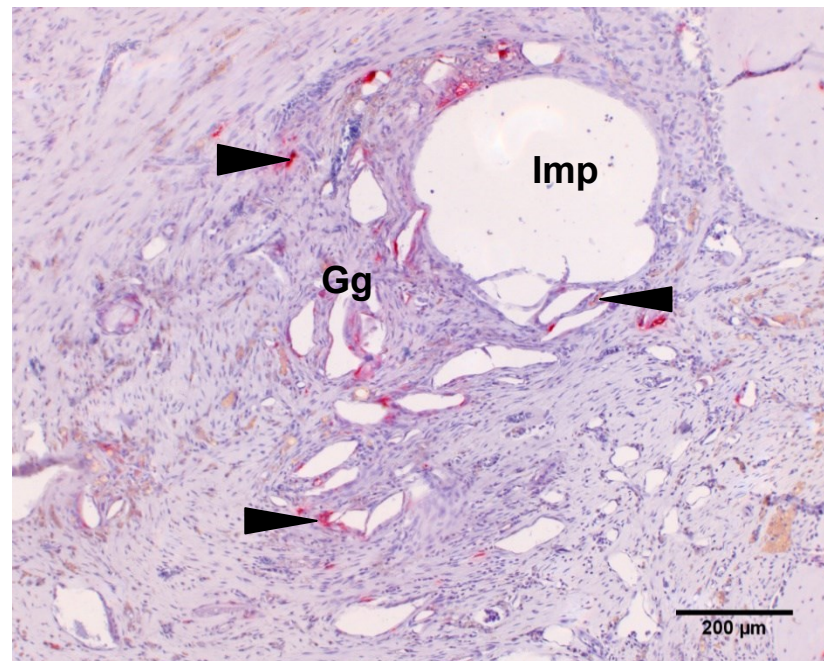


Abb.21: Gruppe W4 2-mal verpresst 12 Wo, TRAP-positive Zellen (►) im Bereich kleinerer Gasblasen im Granulationsgewebe (Gg) in Nähe zum ursprünglichen Implantat (Imp).

In der Versuchsgruppe Mg-HA-Komposit 12 Wo (n = 4 Tiere) zeigten sich, wie in den 4 Versuchsgruppen mit W4-Legierungen, typische Prädilektionsorte für TRAP-positive Zellen. Diese befanden sich im Granulationsgewebe, in den Bereichen von Interface, in marginalen Knochenregionen, im umhüllenden Gewebe von H₂-Gasblasen sowie Regionen mit Angiogenese.

Des Weiteren fanden sich gegenüber den Gruppen aus W4-Legierung zu Fremdkörper-Riesenzellen fusionierte mehrkernige TRAP-positive Makrophagen im komposithaltigen Implantatzentrum (Abb. 22).

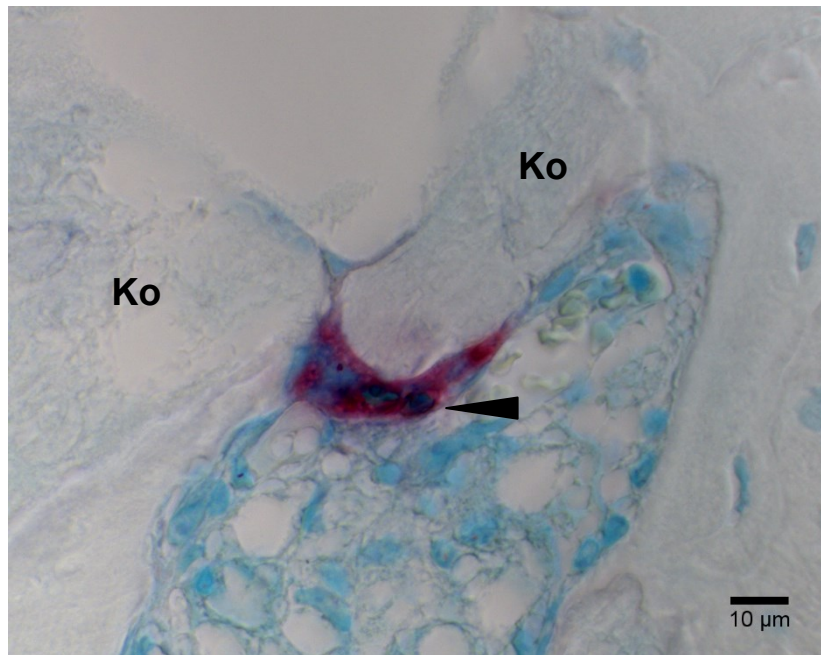


Abb. 22: Gruppe Mg-HA-Komposit 12 Wo, eine TRAP-positive mehrkernige Makrophage (►) baut ein Kompositfragment (Ko) ab.

Obwohl mehrkernige TRAP-positive Zellen auch in den 4 Versuchsgruppen mit W4-Legierungen nachweisbar waren, zeigten sie sich in der Versuchsgruppe Mg-HA-Komposit 12 Wo, bedingt durch die intensive Phagozytose von Komposit, in einer vergleichsweise deutlich stärkeren Präsenz.

3.3.2 Intergruppaler Vergleich der Häufigkeit TRAP-positiver Zellen

Je ein Versuchstier in den Gruppen W4 1-mal verpresst 6 Wo und W4 1-mal verpresst 12 Wo zeigte keine nachweisbare Färbung von TRAP-positiven Zellen.

Die Häufigkeit der TRAP-positiven Zellen in den 5 Vergleichsgruppen wurde nach folgendem Scoring differenziert:

- Keine TRAP-positiven Zellen nachweisbar – Scorewert 0
- Geringe Anzahl TRAP-positiver Zellen nachweisbar – Scorewert 1
- Vermehrte Anzahl TRAP-positiver Zellen nachweisbar – Scorewert 2

Hinsichtlich des Scorings zum Nachweis von TRAP-positiven Zellen ergaben sich bei den 5 Versuchsgruppen Mittelwerte zwischen 0,5 und 2,0 (Tab. 1).

Tab. 1: Mittelwerte und Lokalisation der TRAP-positiven Zellen in den 5 Versuchsgruppen.

Versuchsgruppe	Score-Mittelwert	Lokalisation
W4 1-mal verpresst 6 Wo (n = 6)	1,0	Interface/ Peripherie
W4 2-mal verpresst 6 Wo (n = 6)	1,0	Interface/ Peripherie
W4 1-mal verpresst 12 Wo (n = 3)	0,5	Interface/ Peripherie
W4 2-mal verpresst 12 Wo (n = 5)	1,5	Interface/ Peripherie
Mg-HA-Komposit 12 Wo (n = 4)	2,0	Implantatlager/ Interface/ Peripherie

Die Versuchsgruppen W4 1-mal verpresst 6 Wo und W4 2-mal verpresst 6 Wo wiesen eine mittlere Häufigkeit von TRAP-positiven Zellen von 1,0 Scorewerten auf. In der Versuchsgruppe W4 1-mal verpresst 12 Wo wurde der niedrigste mittlere Scorewert von 0,5 erreicht. Vergleichsweise ergab sich in der Gruppe W4 2-mal verpresst 12 Wo ein Scorewert von 2,0.

Der höchste mittlere Scorewert für TRAP-positive Zellen von 2,0 fand sich in der Versuchsgruppe Mg-HA-Komposit 12 Wo. Auch bei der Analyse der Lokalisation von TRAP-positiven Zellen zeigte sich in dieser Versuchsgruppe ein auffälliger Unterschied zu den Versuchsgruppen mit W4-Legierung. Während sich die Lokalisation TRAP-positiver Zellen in diesen Gruppen vor allem auf die Interface-Region und auf peripher des Implantatzentrums befindliche Knochenregionen bezog, fanden sich in der Kompositgruppe TRAP-positive Zellen überwiegend, bedingt durch Phagozytose, innerhalb des Implantatzentrums.

Weitere Unterschiede fanden sich zwischen den Versuchsgruppen in Bezug auf die Lokalisation zu Gasblasen. In der Versuchsgruppe W4 2-mal verpresst 6 Wo befanden sich bei allen 6 Tieren dieser Gruppe die TRAP-positiven Zellen in unmittelbarer Umgebung von Gasblasen, während bei den übrigen 4 Vergleichsgruppen lediglich bei je einem Tier eine Nähe zu Gasblasen gefunden wurde. In der Gruppe Mg-HA-Komposit ergab die histologische Auswertung, dass alle Versuchstiere einen engen Kontakt TRAP-positiver Zellen zum Knochenmark und zum Implantat aufwiesen.

3.3.3 Alkalische Phosphatase (ALP)

Der histologische Nachweis ALP-positiver Zellen erfolgte über eine Blaufärbung des Zytoplasmas durch das Phosphatasesubstrat BCIP und das Nitroblausalz NBT. Die Zellkerne der ALP-positiven Zellen wurden mit Kernechtrot gegengefärbt.

In der Versuchsgruppe W4 1-mal verpresst 6 Wo (n = 5 Tiere) fanden sich zahlreiche ALP-positive Zellen im Bereich der Epiphysenfugen und innerhalb des neugebildeten Granulationsgewebes, das sich vorwiegend als abgrenzendes Gewebe an den Rändern der H₂-Gasblasen lokalisierte.

ALP-positive Zellen waren in dieser Versuchsgruppe in der Peripherie des Implantatbereichs in allen Regionen mit Osteoneogenese (Abb. 23).

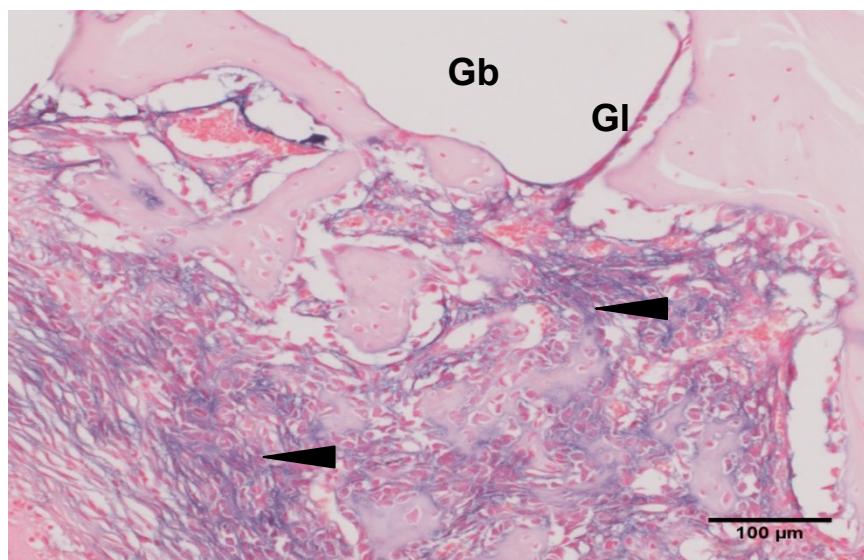


Abb. 23: Gruppe W4 1-mal verpresst 6 Wo, ALP-positive Osteoblasten (►) beim Knochenaufbau sowie ALP-positive Granulozyten in der Grenzlamelle (GI) von Gasblasen (Gb).

In der Versuchsgruppe W4 2-mal verpresst 6 Wo (n = 6 Tiere) zeigten sich im Vergleich zur Gruppe W4 1-mal verpresst 6 Wo im Bereich der Gasblasen vermehrte ALP-positive Osteoblasten als Zeichen einer intensiven Knochenneubildung. In diesen Zonen der Osteoneogenese wiesen die vorhandenen Osteoblasten die charakteristischen Zeichen von ALP-positiven Zellen mit blauer Färbung des Zytoplasmas und roter Kernfärbung auf (Abb. 23).

Im Gegensatz zur Färbung von ALP-positiven Osteoblasten zeigten Zellen der granulozytären Grenzlamelle von Gasblasen nicht die typische zytoplasmatische Blaufärbung.

In der Versuchsgruppe W4 2-mal verpresst 6 Wo sind ALP-positive Osteoblasten in der Nähe einer großen Gasblase zu erkennen. In diesem Bereich zeigt sich die Osteoneogenese an einem Knochentrabekel im Begrenzungsbereich zur sichtbaren Gasblase, wobei auch ein positiver Einfluss der Gasblase auf die Osteogenese diskutiert werden kann (Abb. 24).

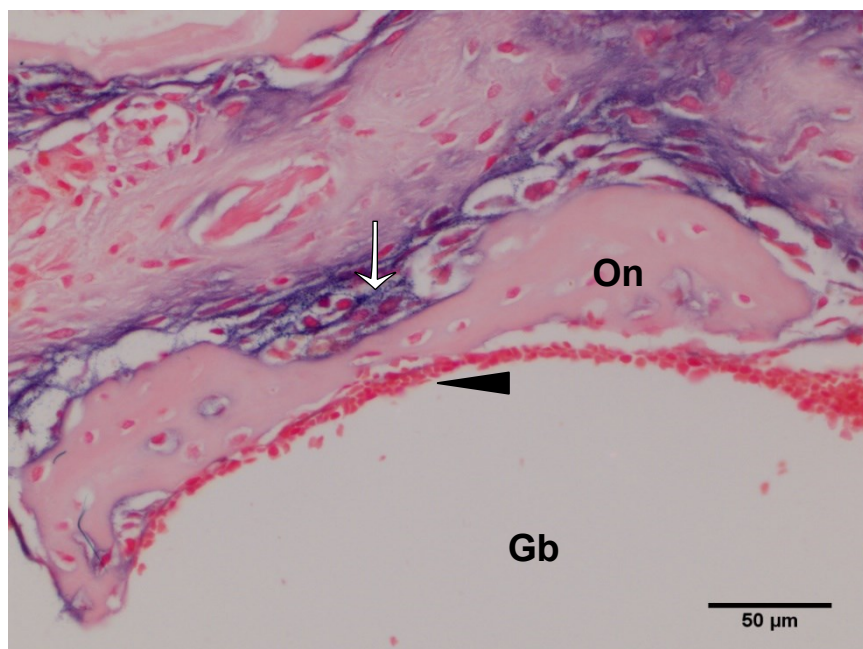


Abb. 24: Gruppe W4 2-mal verpresst 6 Wo, ALP-positive Osteoblasten (←) bei der Osteoneogenese (On) an der granulozytären Grenzlamelle (►) einer großen Gasblase (Gb).

3 Ergebnisse

In der Versuchsgruppe W4 1-mal verpresst 12 Wo (n = 3 Tiere) zeigten sich peripher des Implantats ausgeprägte Regionen mit Granulationsgewebe und zahlreiche H₂-Gasblasen mit granulozytären Grenzlamellen. ALP-positive Zellen konnten in den Gewebeschnitten nicht nachgewiesen werden (Abb. 25).

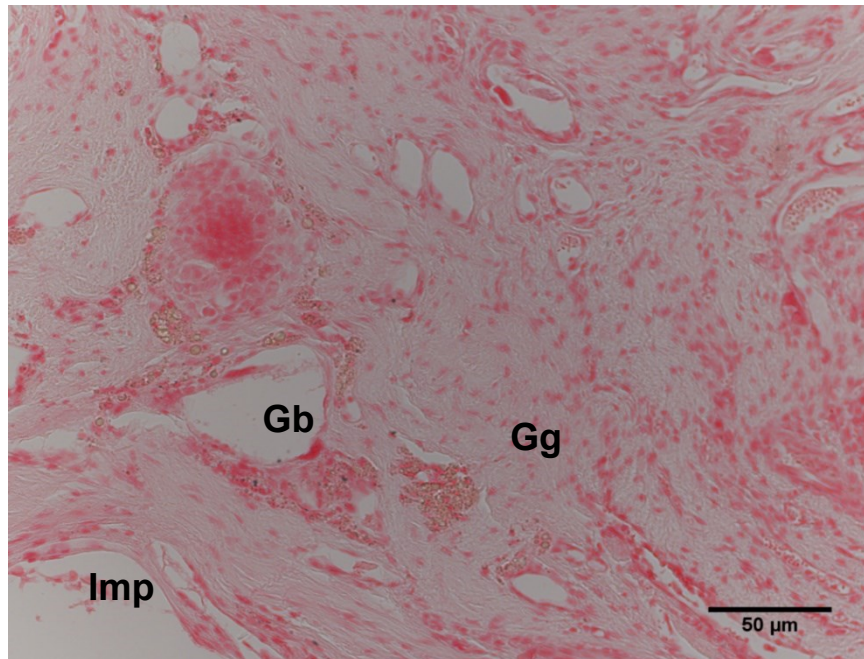


Abb. 25: Gruppe W4 1-mal verpresst 12 Wo, kein Nachweis ALP-positiver Zellen im Granulationsgewebe (Gg), an der Gasblase (Gb) und am ursprünglichen Implantat (Imp).

In der Versuchsgruppe W4 2-mal verpresst 12 Wo (n = 5 Tiere) war eine intensive Osteoneogenese in unmittelbarer Nähe zum ursprünglichen Implantat sichtbar (Abb. 26).

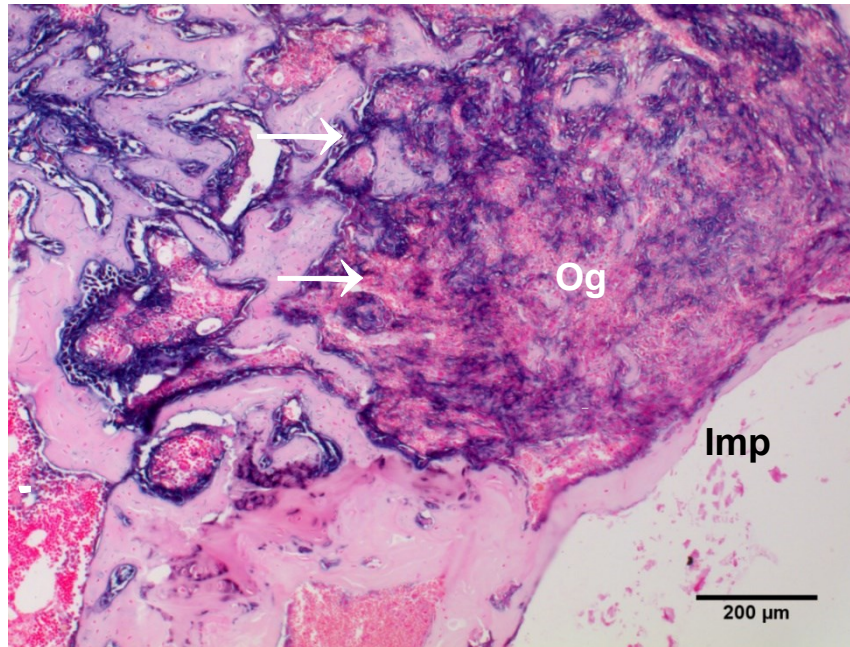


Abb. 26: Gruppe W4 2-mal verpresst 12 Wo, vermehrte ALP-positive Osteoblasten am ursprünglichen Implantat (Imp) als Zeichen einer intensiven Osteoneogenese (Og).

Zahlreiche ALP-positive Osteoblasten umsäumen einen peripher des ursprünglichen Implantats befindlichen kreisförmigen Bereich der Knochenbildung (Og). Am Interface hat sich durch Osteoneogenese viel neues Knochengewebe gebildet. Dominierend in der Abb. 26 sind zahlreiche Osteoblasten, wobei die blaue Farbintensität der ALP-positiven Zellen die rotgefärbten Zellkerne der Osteoblasten teilweise überlagert.

3 Ergebnisse

12 Wo nach Implantation von Knochenschrauben, bestehend aus 2-mal verpresster W4-Legierung, war eine intensive Osteoneogenese mit vielen ALP-positiven Osteoblasten nachweisbar. Teilweise bildeten diese Osteoblasten, wie in der nachfolgenden Abbildung sichtbar, am Knochentrabekel mehrreihige Schichten (Abb. 27).

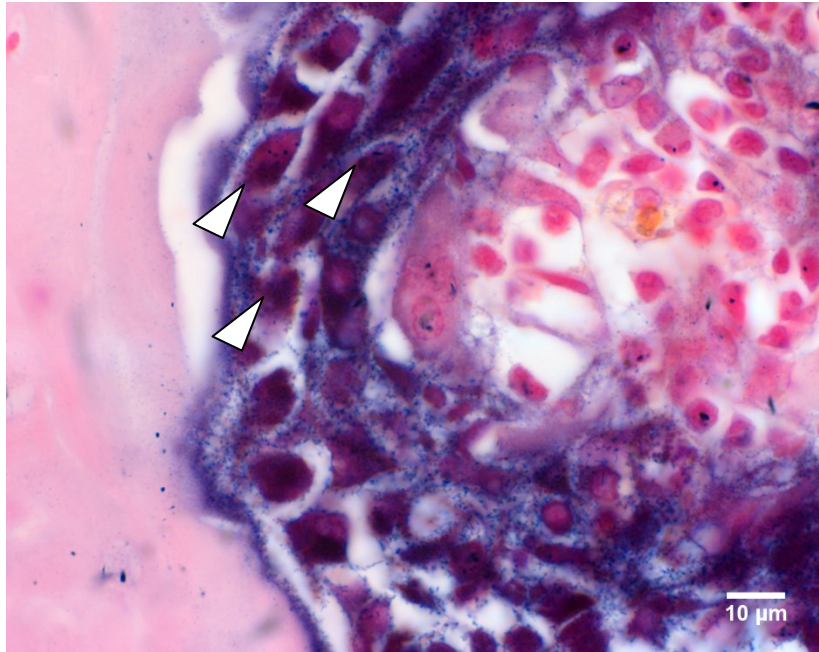


Abb. 27: Gruppe W4 2-mal verpresst 12 Wo, am Knochentrabekel (Kt) haben sich ALP-positive Osteoblasten (►) in mehreren Reihen gebildet.

In der Versuchsgruppe Mg-HA-Komposit 12 Wo (n = 4 Tiere) waren sowohl Zeichen des Abbaus des Komposits als auch intensive osteogenetische Aufbauvorgänge vorhanden (Abb. 28).

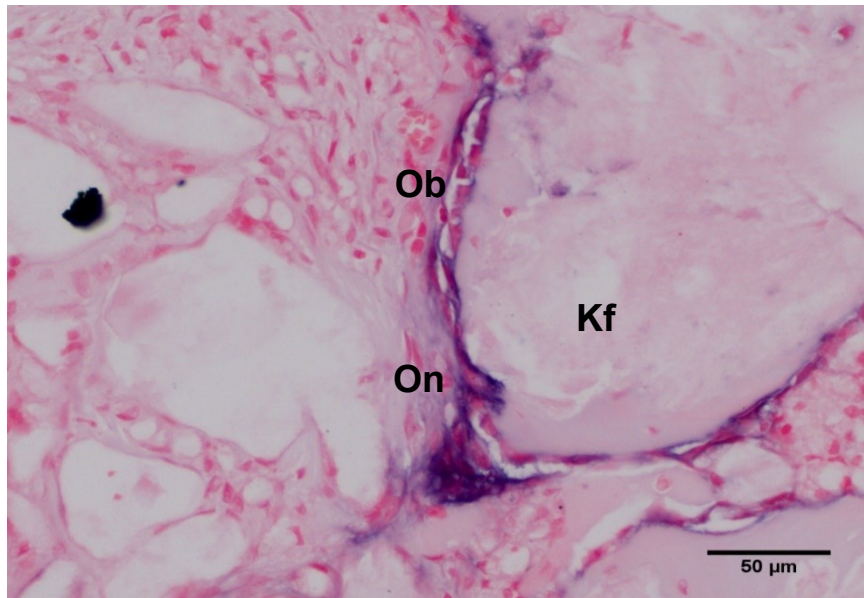


Abb. 28: Gruppe Mg-HA-Komposit 12 Wo, ALP-positive Osteoblasten (Ob) bei der Osteoneogenese (On) am degradierten Kompositfragment (Kf).

Neben teilweise degradierten Anteilen von Kompositfragmenten (Kf) sind im ehemaligen Implantatzentrum Regionen mit neugebildetem Knochengewebe zu erkennen (On). Zwischen den Bereichen mit noch vorhandenem Komposit sind kettenförmig angeordnete Osteoblasten (Ob) sichtbar.

3.3.4 Intergruppaler Vergleich der Häufigkeit ALP-positiver Zellen

Für die intergruppalen Analyse der Häufigkeit ALP-positiver Zellen wurde ebenfalls eine Methode des Scorings eingesetzt.

Die Häufigkeit ALP-positiver Zellen in den 5 Versuchsgruppen wurde nach folgendem Scoring differenziert:

- ▶ Keine ALP-positiven Zellen nachweisbar – Scorewert 0
- ▶ Geringe Anzahl ALP-positiver Zellen nachweisbar – Scorewert 1
- ▶ Vermehrte Anzahl ALP-positiver Zellen nachweisbar – Scorewert 2

3 Ergebnisse

11 von insgesamt 24 Versuchstieren wiesen keine ALP-positiven Zellen auf, wobei in der Versuchsgruppe W4 1-mal verpresst 12 Wo bei keinem der 3 Tiere ALP-positive Zellen nachweisbar waren.

Die Versuchsgruppe W4 2-mal verpresst 6 Wo wies mit 1,0 den höchsten Scorewert auf und in der Gruppe aus Mg-HA-Komposit betrug der Mittelwert des Scorings der ALP-positiven Zellen 0,8. In der Versuchsgruppe W4 2-mal verpresst 12 Wo lag der Scoringwert bei 0,6 und in der Versuchsgruppe W4 1-mal verpresst 6 Wo bei 0,4. In der Gruppe W4 1-mal verpresst 12 Wo waren bei keinem der 3 Versuchstiere ALP-positive Zellen nachweisbar.

Tab. 2: Mittelwerte und Lokalisation der ALP-positiven Zellen in den 5 Versuchsgruppen.

Versuchsgruppe	Score-Mittelwert	Lokalisation
W4 1-mal verpresst 6 Wo (n = 5)	0,4	Interface/ Peripherie
W4 2-mal verpresst 6 Wo (n = 6)	1,0	Interface/ Peripherie
W4 1-mal verpresst 12 Wo (n = 3)	0	---
W4 2-mal verpresst 12 Wo (n = 5)	0,6	Interface/ Peripherie
Mg-HA-Komposit 12 Wo (n = 4)	0,8	Implantatlager/ Interface/ Peripherie

Bei den 3 Versuchsgruppen W4 (1-mal und 2-mal verpresst 6 Wo sowie 2-mal verpresst 12 Wo) waren ALP-positive Zellen am Interface und in der Implantatperipherie lokalisiert. In der Versuchsgruppe Mg-HA-Komposit 12 Wo waren ALP-positive Zellen ebenfalls am Interface und in der Implantatperipherie lokalisiert, aber im Gegensatz zu den 3 Versuchsgruppen W4 (1-mal und 2-mal verpresst 6 Wo sowie 2-mal verpresst 12 Wo) waren ALP-positive Zellen in unmittelbarer Nähe von Gasblasen. Die häufigsten Lokalisationen dieser 3 Versuchsgruppen waren Knochentrabekel, Granulationsgewebe, Epiphysenfuge und Erosionslaken.

3.4 Immunhistochemischer Nachweis von PECAM-1 positiven Zellen

Für den immunhistochemischen Nachweis von PECAM-1, eines Markers für die Einsprossung von Gefäßendothelien während der Osteogenese, wurde PECAM-1 mit einem Nova-Red-Kit für Peroxidase sichtbar gemacht. Endothelzellen werden dabei durch eine intensive Braunfärbung sichtbar. Die Gegenfärbung der Kerne erfolgte mit Hämalaun.

In der Versuchsgruppe W4 1-mal verpresst 6 Wo (n = 6 Tiere) waren insbesondere im Bereich des Knochengewebes PECAM-1 positive Zellen infolge der Angiogenese nachweisbar (Abb. 29).

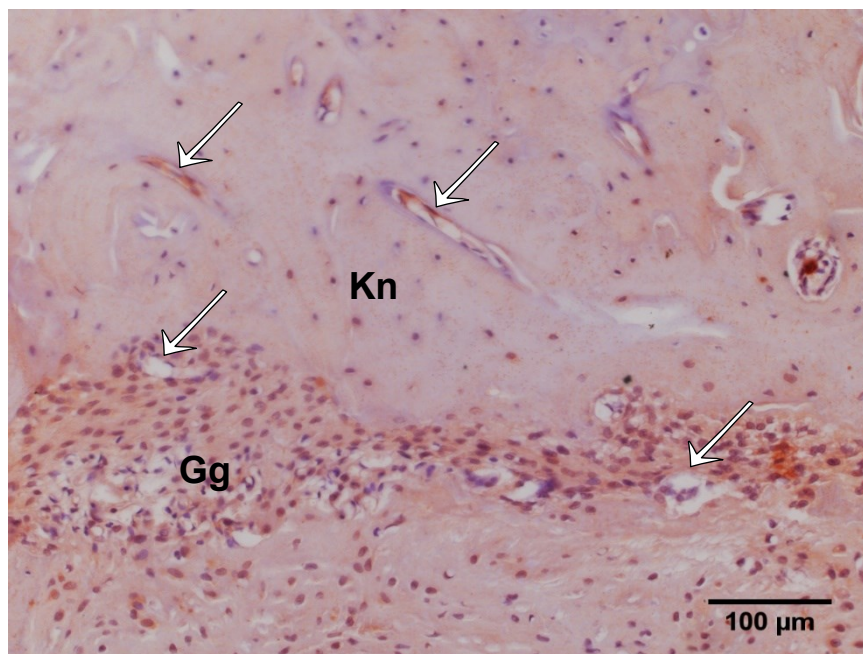


Abb. 29: Gruppe W4 1-mal verpresst 6 Wo, PECAM-1 positive Zellen (→) bei der Angiogenese im Knochengewebe (Kn) und im Granulationsgewebe (Gg).

Vermeehrt PECAM-1 positive Zellen zeigten sich im Granulationsgewebe und in Bereichen mit ausgeprägter Gefäßneubildung bei intensiver Osteogenese.

In der Versuchsgruppe W4 2-mal verpresst 6 Wo (n = 6 Tiere) waren PECAM-1 positive Zellen in Regionen der Osteoneogenese nachweisbar (Abb. 30).

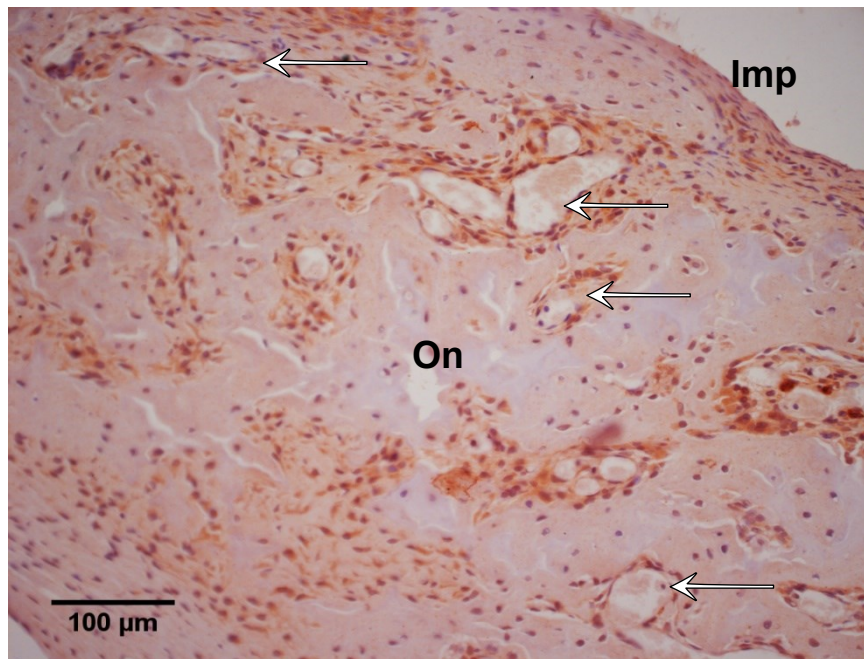


Abb. 30: Gruppe W4 2-mal verpresst 6 Wo, Osteoneogenese mit zahlreichen Gefäßneubildungen und PECAM-1 positiven Zellen (→).

Eine vermehrte Anzahl von PECAM-1 positiven Zellen fand sich in neugebildeten Blutgefäßen in Regionen von Knochenneubildung am Interface und im Bereich von Erosionslakunen. Auffällig war in dieser Versuchsgruppe, wie auch in allen anderen Versuchsgruppen, dass es in Regionen mit Granulationsgewebe auch bei Fibroblasten positive PECAM-1 Nachweise gab.

In der Versuchsgruppe W4 1-mal verpresst 12 Wo (n = 3 Tiere) waren PECAM-1 positive Zellen in verschiedenen Gewebsregionen und in unterschiedlicher Häufigkeit zu beobachten.

Zahlreiche PECAM-1 positive Nachweise waren an Endothelzellen von Blutgefäßen im Interface-Bereich und des Weiteren im Granulationsgewebe nachweisbar, welches sich in Form von Grenzlamellen am Rand von Gasblasen gebildet hatte.

PECAM-1 positive Zellen zeigten sich auch gehäuft regelmäßig in den Endothelien größerer Blutgefäße, wenn sich Granulationsgewebe in unmittelbarer Nähe zum Lagerknochen befand bzw. wenn sich Endothelzellen in Erosionslakunen nachweisen ließen (Abb. 31).

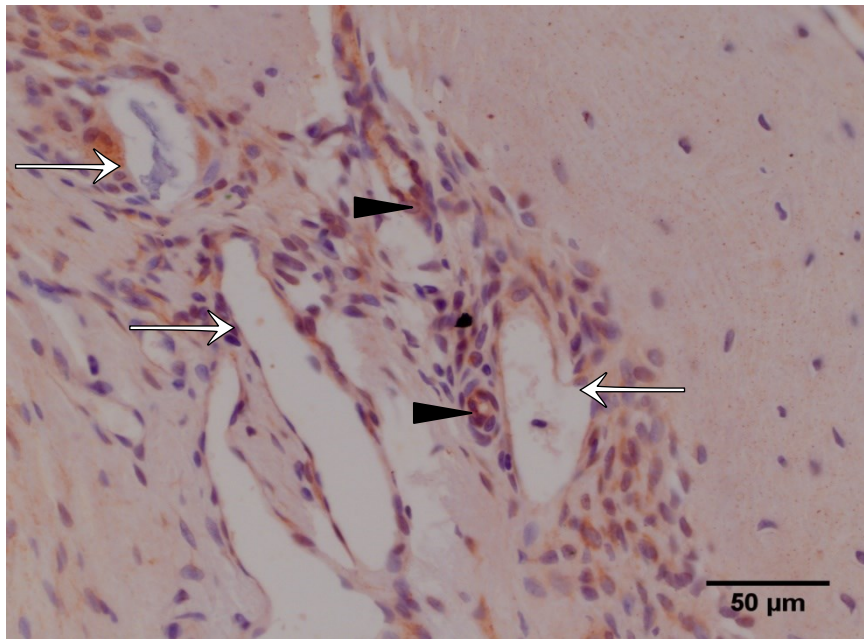


Abb. 31: Gruppe W4 1-mal verpresst 12 Wo, große neugebildete Blutgefäße (→) mit zahlreichen PECAM-1 positiven Zellen (▶).

In der Versuchsgruppe W4 2-mal verpresst 12 Wo (n = 5 Tiere) fanden sich im Granulationsgewebe zahlreiche PECAM-1 positive Zellen an neugebildeten Blutgefäßen 12 Wo nach Entfernung des implantattragenden Knochengewebes (Abb. 32).

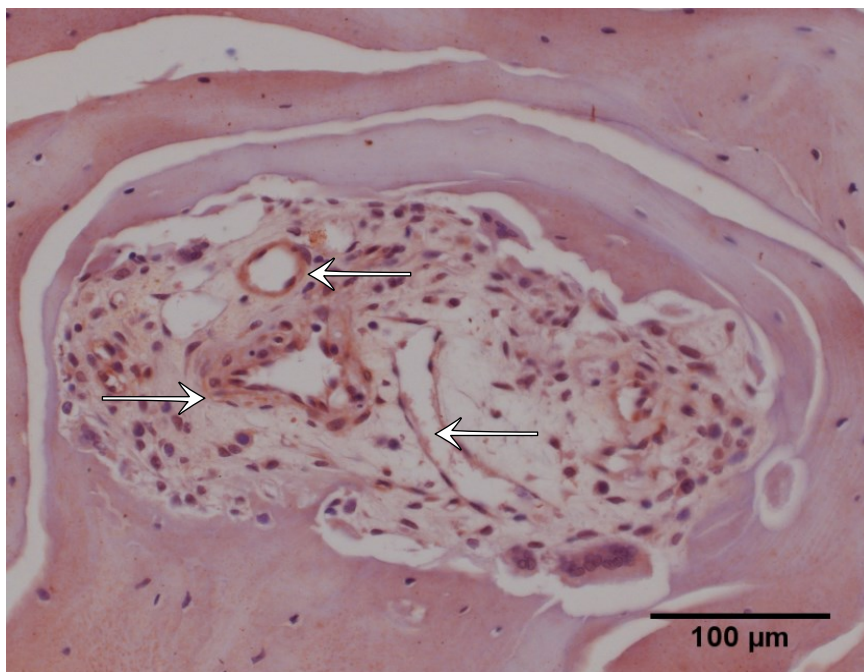


Abb. 32: Gruppe W4 2-mal verpresst 12 Wo, PECAM-1 positive Zellen (→) bei der Angiogenese.

3 Ergebnisse

Gegenüber den Versuchsgruppen W4 1-mal verpresst 6 und 12 Wo sowie W4 2-mal verpresst 6 Wo waren in der Versuchsgruppe W4 2-mal verpresst 12 Wo in vielen Gewebeschnitten vermehrt PECAM-1 positive Zellen vorhanden. Daraus konnte geschlossen werden, dass gegenüber 1-mal gepresstem W4 bzw. einer Standzeit von 6 Wo die morphologischen Umbauvorgänge an Intensität zugenommen hatten.

In der Versuchsgruppe Mg-HA-Komposit 12 Wo (n = 4 Tiere) waren vergleichsweise mit der Versuchsgruppe W4 2-mal verpresst 12 Wo zahlreiche Gefäßneubildungen mit PECAM-1 positiven Zellen nachweisbar (Abb. 33).

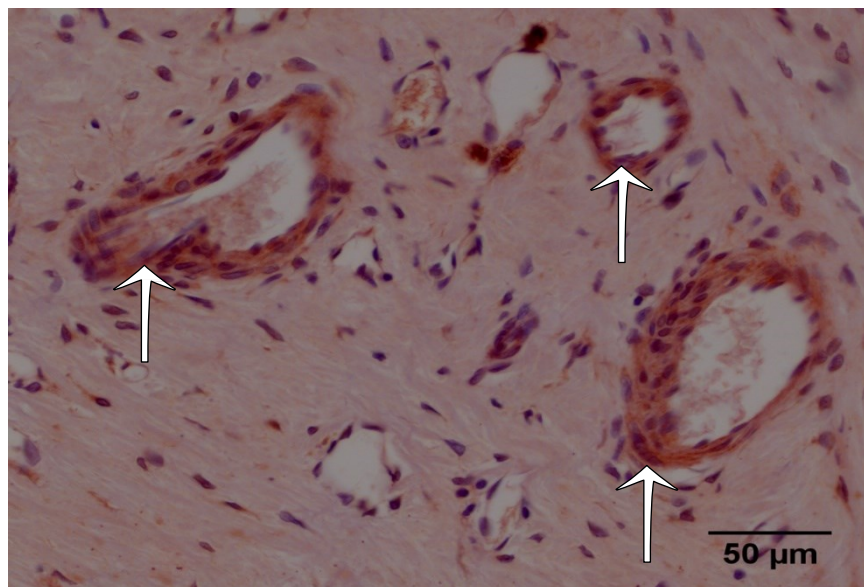


Abb. 33: Gruppe Mg-HA-Komposit 12 Wo, PECAM-1 positive Zellen (→) in mehreren neugebildeten Blutgefäßen.

Diese PECAM-1 positiven Gefäßneubildungen waren besonders im Granulationsgewebe und in der Nähe von Kompositfragmenten zu erkennen. Des Weiteren waren PECAM-1 positive Zellen stark präsent in der Nähe von ausgeprägter Knochenneubildung. Wie bei der Analyse der Lokalisation von TRAP- und ALP-positiven Zellen fanden sich in der Versuchsgruppe Mg-HA-Komposit viele PECAM-1 positive Zellen innerhalb des Implantatzentrums als Beweis für eine forcierte Angiogenese.

In allen Versuchsgruppen gab es Blutgefäße, bei denen eine immunhistochemische Anfärbung von Endothelzellen nicht oder nur vereinzelt beobachtet wurde (Abb. 34).

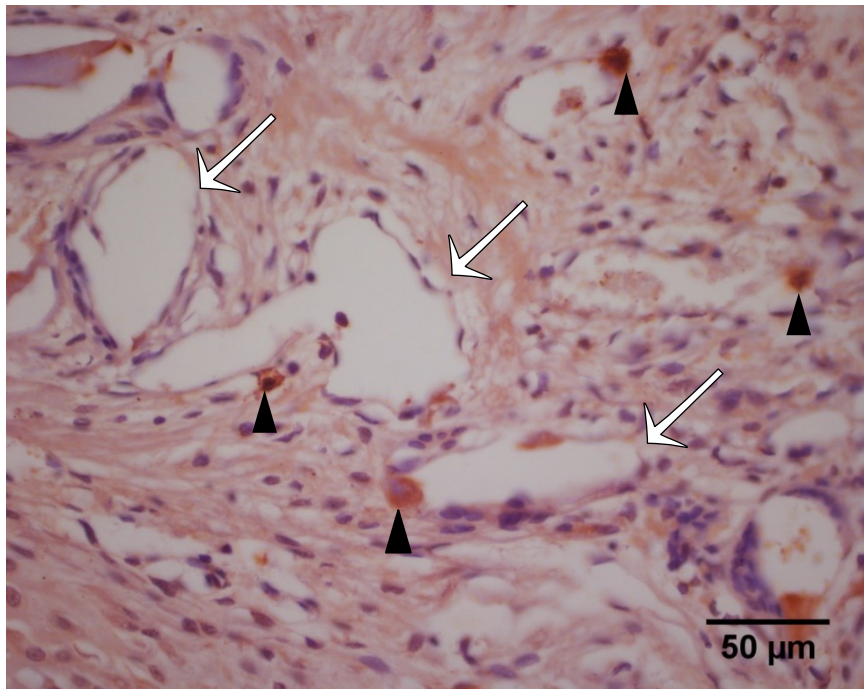


Abb. 34: Gruppe W4 2-mal verpresst 6 Wo, Blutgefäße (→) mit wenigen PE-CAM-1 positiven Zellen (▴).

Der histologische Schnitt ist von einem Versuchstier, bei dem ein Implantat W4 1-mal verpresst 6 Wo eingesetzt worden war. Histologische Schnitte mit lediglich vereinzelt PECAM-1 positiven Zellen waren in allen 5 Versuchsgruppen vorhanden, so dass eine quantitative Erfassung der Häufigkeit der PECAM-positiven Zellen für die hier vorliegende Arbeit nicht vorgenommen werden konnte.

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden tierexperimentelle Untersuchungen an Ratten vorgenommen, bei denen Knochenschrauben, angefertigt aus drei differenten Magnesiumwerkstoffen (1-mal bzw. 2-mal verpresste magnesiumhaltige W4-Legierung, Mg-HA-Komposit) in den distalen Femur der Versuchstiere implantiert worden waren.

Postoperativ erfolgten Untersuchungen zur quantitativen Erfassung der durch Degradation der Legierungen induzierten Freisetzung von Wasserstoff. Mit diesen Tierexperimenten sollte eine Wertung vorgenommen werden, welche von den 3 verwendeten Implantaten (Knochenschrauben) die geringste Menge an H_2 freisetzt. Gemessen wurden die implantatbezogene Distanz der H_2 -gefüllten Gasblasen sowie die Gasblasenfläche in genau definierten AOIs in der Defektperipherie.

Des Weiteren wurden histologische Untersuchungen der peripheren Regionen der Implantate mit enzym- und immunhistochemischen Nachweisen von alkalischer und tartrat-resistenter saurer Phosphatase sowie des Zelloberflächenproteins PECAM-1 zur Erfassung von Stoffwechselreaktionen und Endothelproliferation vorgenommen.

4.1 Methoden zur Messung der Degradation von Mg-Implantaten

Eine wichtige Voraussetzung für den medizinisch indizierten Einsatz biologisch abbaubarer metallischer, und damit auch Mg-haltiger Implantate, ist eine langsame, kalkulierbare Degradation, welche z.B. bei Frakturen dem jeweiligen, zeitlich optimalen Heilungsprozess angepasst sein sollte.

Ein Hauptproblem bei purem Mg und bei magnesiumhaltigen Legierungen besteht darin, dass Magnesium wenig korrosionsbeständig ist. Magnesium unterliegt einem durch das Implantatbett bedingten forcierten Abbau, wobei es zur Freisetzung von H_2 -Gas kommt (Eliezer und Witte 2010).

Diese Freisetzung von H_2 -Gas wurde in der Arbeit als ein Maß für die Stärke der Degradation der verwendeten 3 Magnesiumwerkstoffe mit Standzeiten von 6 und 12 Wo eingesetzt. Dafür erfolgten in einem ersten Teil der Methode Messungen des am weitesten distal vom Mittelpunkt der Implantate gelegenen H_2 -gefüllten Vesikels vorgenommen, wobei eine Mindestgröße der Vesikel von $\geq 0,003 \text{ mm}^2$ festgelegt wurde.

Des Weiteren wurden in der Arbeit Messungen der Gasblasenfläche in verschiedenen AOIs vorgenommen. Bei dieser Untersuchung konnte bei den Tieren mit 1- und 2-malig verpresster W4-Legierung im Vergleich zur Versuchsgruppe mit Mg-HA-Komposit ein höherer Anteil H_2 -gefüllter Gasblasen nachgewiesen werden.

Die stärkste H_2 -Freisetzung wurde in der Versuchsgruppe W4 2-mal verpresst 6 Wo mit einer Gasfläche von 34,4 %, bezogen auf die Gesamtmessfläche von 14,468 mm² gemessen. Die geringste H_2 -Freisetzung fand sich in der Versuchsgruppe mit W4 2-mal verpresst 12 Wo mit einer Gasfläche von 2,9 %. Daraus kann geschlussfolgert werden, dass in der Versuchsgruppe W4 2-mal verpresst 6 Wo der höchste Grad an korrosivem Materialabbau der Schraubenimplantate bis zum Ablauf der 6. postoperativen Woche stattfand. Weiterhin konnte nachgewiesen werden, dass eine zeitliche Einschätzung der Degradation mit der verwendeten Messmethode der H_2 -gefüllten Gasblasen möglich ist.

Hinsichtlich der in der Arbeit eingesetzten Methode der Messung von Distanz und Flächen der H_2 -gefüllten Vesikel sowie der Enzym- und Immunhistochemie sind nachfolgende Aspekte zu diskutieren:

- Bei der Methode handelte es sich um in-vivo-Untersuchungen zur Korrosion Mg-haltiger Implantate im Femur von Ratten und derartige Untersuchungen werden für klinische Adaptationen seit einigen Jahren als erforderlich eingeschätzt und vereinzelt vorgenommen (Thormann et al. 2015; Galli et al. 2017a; Marco et al. 2017).
- Die H_2 -Freisetzung als Parameter einer Korrosion von Mg-Legierungen ist seit vielen Jahren akzeptiert (Makar und Kruger 1993). Kritisch muss für die in der Arbeit verwendete Methode eingeschätzt werden, dass die Messung der Gasflächen nicht die absolute H_2 -Freisetzung bestimmt, sondern eine relative Vergleichsmöglichkeit darstellt.
- Die Messung der größten Distanz einer H_2 -Gasblase ist im Vergleich zur Flächenmessung von Gasblasen ein starker Parameter, wurde in der Arbeit aber ebenso wie die Messergebnisse bei den H_2 -Gasflächen relativiert, da in der Versuchsgruppe Mg-HA-Komposit im Gegensatz zu den W4-Legierungen keine Bestimmung nach einer Standzeit von 6 Wo erfolgte. Weiterhin ergab sich keine statistische Signifikanz zwischen den Gruppen mit W4-Legierung und Mg-HA-Komposit nach 12 Wo Standzeit. Die Anzahl der Versuchstiere mit $n = 6$, $n = 5$ und $n = 5$ pro Gruppe war, um unnötige Tierversuche zu vermeiden, extrem klein kalkuliert worden, jedoch war die Streuung in den zwei W4-Gruppen unerwartet hoch.

Nachdem in den letzten 10 Jahren die Bedeutung der Wasserstoffbildung als Gradmesser der Korrosion Mg-haltiger Implantate nachgewiesen worden war, erfolgten erste Quantifizierungen des freigesetzten H_2 -Gases zunächst in vivo mit röntgenologischer Bildgebung und Mikro-CTs, was einen erheblichen Aufwand hinsichtlich des erforderlichen Equipments bedeutete (Zhao et al. 2016).

In jüngster Zeit erfolgten daraufhin Untersuchungen mit neuen Messmethoden:

- Unter Verwendung von Implantaten, bestehend aus einer Mg-Ca-Zn-haltigen Legierung, konnte eine für medizinische Anwendungen akzeptable Korrosionsrate ermittelt werden (Cha et al. 2013). Als Parameter für die Korrosionsrate wurde die Wasserstoffentwicklung gemessen, wobei in einem wasserhaltigen Trichtersystem die korrosionsbedingte H₂-Bildung zu einer zeitlich abhängigen und quantitativ erfassbaren Absenkung des Wasserpegels führte.
- Eine weitere Methode zur Erfassung der korrosionsbedingten H₂-Freisetzung erfolgte zeitgleich, wobei eine massenspektrometrische Erfassung des Masse-Ladungs-Verhältnisses der H₂-Gasphase vorgenommen wurde (Kuhlmann et al. 2013). In dieser in-vivo-Untersuchung konnte an Mäusen nach s.c. Implantation von Mikroplättchen, bestehend aus einer Legierung von Mg und den Seltenen Erden Y, Gd, Nd und Dy die Konzentration von H₂-Gas in Gasblasen mit einem amperometrischen H₂-Sensor bis 10 Tage postoperativ bestimmt werden.
- Hinsichtlich der Messung von H₂-Gasblasen nach Implantation Mg-haltiger Materialien wurde in einer kürzlich publizierten in-vivo-Studie ein elektrochemischer Sensor eingesetzt und in seiner Wirksamkeit nach Implantation von Mg-Zn-Ca-Legierung überprüft (Zhao et al. 2018). Unter Verwendung eines elektrochemischen H₂-Mikrosensors konnten bereits eine Woche nach Durchführung einer Plattenosteosynthese an der Ulna von Kaninchen gravierende topographische Unterschiede in den Konzentrationen von Wasserstoff festgestellt werden. Der Sensor zeigte im Bereich des Knochenmarks der Ulna eine H₂-Konzentration von 1460 ± 320 Mikromolar (μM), im s.c. Bereich des Operationsgebietes eine Konzentration von 550 ± 210 μM und auf der Hautoberfläche des Ulnabereichs eine Konzentration von 120 ± 50 μM . Die H₂-Konzentration im Knochenmark war in dieser Studie explizit hoch und betrug nahezu das Doppelte gegenüber der H₂-Konzentration mit ~ 800 μM im Wasser unter Normalbedingungen. Als Ursache dieser Erstbeobachtung wurde in der Studie diskutiert, dass eine verzögerte transossale Perfusion für H₂ das H₂-Gas im Knochenmark anstaut. Ausgehend von dieser Theorie wiesen die Autoren darauf hin, dass mögliche Auswirkungen dieser H₂-Gasstauung auf die klinische Anwendbarkeit Mg-haltiger Implantate mit forcierter Degradation noch erforscht werden müssten (Zhao et al. 2018).

4.2 Steuerung der Korrosion von Mg-Implantaten

Zunehmend konzentrierte sich in den letzten Jahren die materialbezogene Forschung für Implantate in der Unfallchirurgie und Orthopädie neben der Validierung der Eigenschaften Zytokompatibilität und Stabilität auf die Beeinflussung der Korrosion durch eine verzögert stattfindende Degradation, um eine Zweitoperation in Form einer Explantation zu vermeiden (Witte et al. 2008). Forschungsschwerpunkte dieser Entwicklung betrafen vor allem chemische und physikalische Vorgänge der Degradation in Bezug auf Ausmaß und Toxizität freigesetzter Ionen und Moleküle und verstärkt in den Mittelpunkt des Interesses sind Mg-Legierungen gerückt (Witte et al. 2010; Hort et al. 2010; Thormann et al. 2015).

Neben der Freisetzung von Mg-Ionen und -Atomen sowie Mg-haltiger Partikel kommt es während der Degradation infolge spontan ablaufender chemischer Reaktionen zwischen Mg und H_2O in einem feuchten Milieu zu einer Verschiebung des pH-Wertes und zur Freisetzung von Wasserstoffgas (Makar und Kruger 1993; Jung et al. 2015; Vasconcelos et al. 2016). Auf Grund der intensiven Degradation von Magnesium, indem es aus einem Gramm purem Mg über die Umsetzung der Formel der Korrosionsreaktion $\text{Mg} + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{Mg}(\text{OH})_2 + \text{H}_2$ zur Freisetzung von 1,03 l Wasserstoff in die Implantatumgebung kommt, gab es in der Vergangenheit zunächst ein großes Problem (Kraus et al. 2012; Kuhlmann et al. 2013).

Die durch Korrosion induzierte Freisetzung von H_2 -Gas aus Mg-Implantaten in das periimplantäre Wirtsgewebe ist bereits seit etwa 80 Jahren bekannt (McBride 1938), jedoch konnten wegen fehlendem technischem Equipment die genauen Gasarten und deren Konzentrationen nicht exakt bestimmt werden. So enthielten Gasblasen nach den Untersuchungen von McBride (1938) mehr als 80 % N_2 und lediglich etwas mehr als 7 % H_2 .

Da hypothetisch angenommen wurde, dass zwischen dem Ausmaß der Korrosion und der Menge an freigesetztem H_2 -Gas eine positive Korrelation bestehen könnte, wurde in den letzten Jahren die Intention für eine quantitative Messung des Volumens der H_2 -Gasbildung intensiver diskutiert (Song et al. 2005; Witte et al. 2008; Kirkland et al. 2012).

Parallel zur Intensivierung der Forschung auf dem Gebiet der Implantation von Mg-haltigen Osteosynthesematerialien wie Schrauben, Pins und Platten, wurden negative lokale und systemische Auswirkungen der H_2 -Ansammlung auf Gewebe und Blutgefäße, wie z.B. Schädigungen der Knochenstruktur bzw. Gasembolien, diskutiert (Staiger et al. 2006; Yoshikawa und Naito 2011).

Während Staiger et al. (2006) sogar die evtl. Notwendigkeit der periimplantären Punktion von H_2 -Gasblasen ernsthaft in Erwägung zogen, widerlegten die Untersuchungen von

Kuhlmann et al. (2013) derartige Abläufe. In den in-vivo-Untersuchungen erfolgte eine s.c. Implantation von Mikroplättchen (2 x 2 x 1 mm), bestehend aus Mg und den Seltenen Erden Y, Gd, Nd und Dy. In einem 2. Versuchsaufbau wurde Mäusen H₂-Gas s.c. injiziert. Mit Hilfe eines amperometrischen H₂-Sensors und mit massenspektrometrischen Messungen konnte die genaue Menge an H₂ in Gewebebläschen und im s.c. Bereich in situ über einen Zeitraum von 10 Tagen gemessen werden. In einem ersten Versuchsaufbau mit s.c. Implantation Mg-haltiger Plättchen war 3 Tage post implantationem kein Hydrogen mehr nachweisbar und in einem zweiten Versuch war eine Stunde nach s.c. Injektion von H₂ die Menge an nachweisbarem H₂ auf 10 % des injizierten Gasvolumens gesunken (Kuhlmann et al. 2013). Mit diesen Ergebnissen wurde die Hypothese, dass Mg-haltige Implantate in vivo zur Freisetzung von gesundheitsschädigenden Mengen an H₂ führen können, zumindest infrage gestellt.

In der hier vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass von allen drei verwendeten Implantatmaterialien (W4 1-mal und 2-mal verpresst 6 und 12 Wo, Mg-HA-Komposit 12 Wo) die Implantate der Gruppe 2 (W4 2-mal verpresst 6 Wo) die höchste H₂-Gasbildung aufwiesen, woraus man auf die intensivste Degradation in dieser Gruppe nach einer Standzeit von 6 Wo schließen konnte.

In einigen Publikationen der letzten 10 Jahre wurde bereits auf die Möglichkeit hingewiesen, dass Mg-haltige Implantate trotz hoher Zytokompatibilität unerwünscht eine zu forcierte Degradation aufweisen könnten (Song 2005; Witte et al. 2008; Witte 2010; Kraus et al. 2012). Diese rapide Degradation könnte damit zu einem Stabilitätsproblem und möglicherweise zur Bildung schädlicher Korrosionsbestandteile wie Hydrogenionen mit Anstieg des pH-Wertes und starker periimplantärer Gasformation führen (Kraus et al. 2012).

So konnte in einer jüngeren Studie der Nachweis erbracht werden, dass gravierende schädigende Einflüsse bei Einsatz von reinem Mg als Implantatmaterial zu erwarten sind (Noviana et al. 2016). Dabei wurde die Wirkung von freigesetztem H₂ nach Implantation von Plättchen aus purem Mg in ausgefräste Vertiefungen am Femur von Ratten mit einem Durchmesser von 13 mm und einer Dicke von 2,5 mm hinsichtlich der Menge an freigesetztem Hydrogen und der Mortalität bis 18 Tage postoperativ mit radiographischen Kontrollen, Blutgasanalysen und Erfassung der Überlebenszeit überprüft. Innerhalb von 18 Tagen nach Implantation der münzähnlichen Plättchen aus purem Mg betrug die Letalität bezogen auf alle 15 Versuchstiere, 100 %. Während der ersten 5 postoperativen Tage wurde bei allen Versuchstieren eine extrem prominente Schwellung im Operationsbereich des Oberschenkels beobachtet und diese, als H₂-Gas-Freisetzung identifizierte Prominenz, war progressiv in Form einer ausgeprägten Emphysembildung

im Abdomen und in der Thoraxregion. Die Gasbildung war bei den überlebenden Tieren ab dem 7. postoperativen Tag wieder rückläufig. In den Blutanalysen zeigte sich zu diesem Zeitpunkt ein starker Anstieg an H_2 -Ionen und der nachfolgende Übertritt dieser H_2 -Ionen in die Blutbahn korrelierte mit einer zunehmenden und vollständigen Mortalität der 15 Versuchstiere (Noviana et al., 2016).

In weiteren Untersuchungen konnte der Nachweis erbracht werden, dass es bereits einige Mg-Legierungen gibt, deren Zusammensetzung eine forcierte Degradation positiv beeinflusst, wie es auch in der vorliegenden Untersuchung bei Verwendung der Legierungen W4 1-mal verpresst und Mg-HA-Komposit im Vergleich zum Einsatz von W4 2-mal verpresst nachgewiesen werden konnte.

In einer in-vitro- und in-vivo-Studie wurde der Grad der Korrosion von cageartig gefertigten zylindrischen Implantaten aus gepresstem W4-Material (96 Gew.% Mg, 4 Gew.% Y) mit einem Durchmesser von 3 mm und einer Länge von 5 mm hinsichtlich der Korrosionsstärke und -dauer überprüft (Bobe et al. 2013). Die in-vitro-Korrosionsmessungen erfolgten im Zellkulturmedium an Mausfibroblasten (L929) unter Anwesenheit humaner Osteoblasten und mit Messung der Gasbildung mittels eines Eudiometers sowie des Proben gewichts. In-vivo-Untersuchungen wurden 6 und 12 Wo nach periostealer Implantation der zylindrischen Cages bei Kaninchen vorgenommen. Bei Inkubation der Mg-Proben über einen Zeitraum von 72 Stunden in der Zellkultur der murinen Fibroblasten L929 unter differenten Bedingungen bzgl. Temperatur, Austausch des Kulturmediums und Zeitdauer variierten die Korrosionsraten der Implantate zwischen 1,05 bis 3,43 Millimeter pro Jahr ($mm\ y^{-1}$). Dagegen betrug die Korrosionsrate der in-vivo-Implantate nach 6 Wo 0,16 $mm\ y^{-1}$. Mit diesen Ergebnissen wurde die Bedeutung von in-vivo-Untersuchungen zur Bestimmung von Korrosionsraten Mg-haltiger Implantate für die klinische Anwendbarkeit nachgewiesen, da die in-vivo-Ergebnisse von Bobe et al. (2013) eine aktive Osteogenese nachweisen konnten. Des Weiteren fanden sich keine Hinweise auf Fremdkörperreaktionen und 6 Wo nach Implantation fand sich bei der Messung mit dem Eudiometer keine weitere H_2 -Gasentwicklung.

Für Forschungen zur Identifizierung optimaler Materialien von Implantaten ist in jüngster Zeit der Fokus auf die Standardisierung von in-vitro-Testmethoden gerichtet worden, um Vergleiche mit in-vivo-Ergebnissen vornehmen zu können (Zhang et al. 2013; Martinez-Sanchez et al. 2015). In einer, mit der Studie von Bobe et al. (2013) vergleichbaren Untersuchung, erfolgten aus dieser Intention heraus ebenfalls in-vitro- und in-vivo-Untersuchungen unter Verwendung von drei Materialien aus Magnesium-10-Gadolinium (Mg-10Gd), Magnesium-2-Silber (Mg-2Ag) sowie purem Mg mit einem Reinheitsgrad von 99,93 % (Marco et al. 2017).

Für die Bildung von Proben zur in-vitro-Untersuchung der Degradation dienten aus diesen drei Materialien hergestellte Drähte, die in Plättchen von 10 mm Durchmesser und 1,5 mm Dicke geschnitten wurden. Gemessen wurden die H_2 -Gasfreisetzung und die Gewichtsabnahme der Plättchen unter sterilen Bedingungen und 5 %iger CO_2 -Kondition in den 3 Kulturmedien PBS (Phosphatgepufferte Kochsalzlösung), HBSS (Hanks balanzierte Salzlösung) und DMEM (Dulbecco's modifiziertes Eagle-Medium). Für die in-vivo-Untersuchungen wurden in der Studie ebenfalls die Materialien Mg-10Gd, Mg-2Ag (Silber) und pures Mg mit einem Reinheitsgrad von 99,93 % eingesetzt. Mittels des Verfahrens der Extrusion erfolgte die Fertigung von Pins bzw. Drähten mit einem Durchmesser von 1,5 mm. Hinsichtlich der Stärke der Gasbildung und der degradationsbedingten Gewichtsabnahme fanden die Untersucher bei Vergleich der in-vitro- und in-vivo-Versuche identische Ergebnisse. Als Fazit der Ergebnisse der vergleichenden Untersuchungen haben die Autoren (Marco et al. 2017) eine nichtbewiesene Schlussfolgerung gezogen, dass in-vitro-Materialtests in der Aussage gleichwertig gegenüber in-vivo-Tests sind.

Neben der Beeinflussung von möglichen Schädigungseinflüssen bei Mg-haltigen Implantaten durch Optimierung der Mg-Legierungen und dem Einsatz von speziellen Oberflächenbehandlungen der Implantate, gibt es in jüngerer Zeit auch Untersuchungen zum Einsatz ummantelter Implantate, sog. Coatings, um eine forcierte Degradation mit vorzeitiger Implantatdestabilisierung zu verhindern.

In einer Pilotstudie am Schafsmodell erfolgte die Fixation abgerissener vorderer Kreuzbänder mit Interferenzschrauben, die aus der Mg-Legierung W4 mittels Druckguss oder Fräsung hergestellt worden waren (Thormann et al. 2015). Vor der Implantation waren die Schrauben mittels plasmaelektrolytischer Oxidation (PEO) und einer daraus resultierenden oberflächlichen Beschichtung mit Kalziumphosphat ummantelt worden. Die Fertigung von Interferenzschrauben, meist eingesetzt zur Fixation von Kreuzbändern nach Abriss, erfolgte seit einigen Jahren auf Grund von Nachteilen bei titangefertigten Schrauben und bioresorbierbaren Materialien, wie z.B. Poly-L-Lactid (PLLA) oder Poly-D-Lactid (PDLA). Erstmals wurde eine aus einer Magnesium-Druckgusslegierung angefertigte Interferenzschraube im Jahr 2010 als Patent in Deutschland angemeldet (Witte et al. 2010). Da Implantate aus purem Mg eine sehr starke Degradation mit entsprechendem Gefahrenmoment für die Stabilität einer Bandfixation aufweisen, wurde in der Studie von Thormann et al. (2015) der Versuch unternommen, diese Degradation durch eine Beschichtung mit Kalziumphosphat mittels PEO in Form einer Versiegelung zu verzögern. Die Ergebnisse der Studie zeigten hinsichtlich der Biokompatibilität Unterschiede bezüglich der Fertigung der Interferenzschrauben, der Gasfreisetzung und der Beeinflussung

des Knochenstoffwechsels. Mittels Fräsens produzierte Schrauben wiesen eine geringere Gasbildung und eine geringere Beeinträchtigung des Knochenstoffwechsels gegenüber den druckgepressten Schrauben auf. Die Ummantelung durch PEO führte in der Studie allerdings nicht zu einer effizienten Reduktion der Gasbildung, so dass für den Einsatz Mg-haltiger Implantate suffizientere Technologien für die Reduktion der forcierten Korrosion gefunden werden müssen (Thormann et al. 2015).

Ausgehend von diesem Fazit wurde in einer neueren Studie der Einsatz einer Ummantelung Mg-haltiger Implantate mit einem Komposit aus Poly-3,4-ethylen-dioxythiophen (PEDOT) und Graphitoxid (GO) auf die Wirkung von Korrosionsgeschwindigkeit und H₂-Gasproduktion überprüft (Catt et al. 2017).

Erstmals eingesetzt wurde dieses Komposit aus PEDOT und GO auf Grund seiner guten Biokompatibilität und geringen Impedanz für die Beschichtung von transkutan einsetzbaren Mikroelektroden (Tian et al. 2014).

In der Studie von Catt et al. (2017) wurden PEDOT/GO-ummantelte und nichtummantelte Mg-Bänder mit einem Mg-Gewichtsanteil von $\geq 99.5\%$, mit einer Länge von 9 mm, einer Breite von 3 mm und einer Dicke von 0,2 mm während der Lagerung in PBS verschiedenen Korrosionstests unterzogen. Das Ziel der in-vitro-Studie bestand darin, mittels der Ummantelung die Bildung schädlicher Korrosionsprodukte wie z.B. Hydroxidionen (OH⁻) und deren Auswirkung auf einen Anstieg des pH und die Freisetzung von Wasserstoffgas im Implantatbereich zu verhindern und um damit die Voraussetzungen für die erforderliche Stabilität von Implantaten bis zum Abschluss der Osteogenese zu schaffen. Während des 24-tägigen Verlaufs der Studie wurde gegenüber den nichtummantelten Materialien in PBS eine um 41 % geringere Konzentration von Mg-Ionen und eine um 43 % geringere Häufigkeit von OH⁻ nachgewiesen. Die Messung der Konzentration von Wasserstoff ergab während des gesamten Versuchsablaufs bei ummantelten Mg-Proben im Vergleich zu nichtummantelten Materialien eine um 67 % geringere H₂-Menge mit kleineren Gasblasen. Bei einem Vergleich der coated und nichtcoated Mg-Proben bezüglich der Toxizität gegenüber von im Kulturmedium befindlichen Neuronen zeigten die ummantelten Mg-Proben eine deutlich höher neuronale Biokompatibilität. In Auswertung dieser Studie wurde von Catt et al. (2017) der Vorteil einer Ummantelung von Mg-Implantaten mit PEDOT/GO hinsichtlich folgender Einflussfaktoren diskutiert:

- die Ummantelung verhindert initial das Eindringen von Kulturmedium in das Implantat, wodurch eine Korrosion vermindert wird, und

- nach Diffusion von Medium durch die Ummantelung verhindern ein Aufbau von negativer Ladung und die Bildung einer Schicht aus Mg-Phosphat in hohem Maß die Korrosion der Mg-Proben.

Die Ergebnisse der Studien mit Ummantelung von Mg-haltigen Implantaten könnten für die klinische Anwendung eine wichtige Ergänzung zur Steuerung der Degradation von Implantaten darstellen und in Zukunft an Bedeutung gewinnen.

In der vorliegenden Arbeit wurde mit dem Mg-HA-Komposit ein Mg-haltiges Implantat überprüft, das durch den Zusatz von HA eine verzögerte Degradation hätte aufweisen können. Kritisch muss zu diesem Versuchsteil angemerkt werden, dass die Standzeit von 12 Wo eine Einschätzung dieser klinisch relevanten Einflussnahme auf die Korrosionsgeschwindigkeit nur begrenzt zuließ und weiterhin berücksichtigt werden muss, dass es sich nicht um eine Ummantelung von Mg mit HA handelte, sondern um ein Mischmaterial beider Substanzen. In einer Studie von Charyeva et al. (2015) wurde die These überprüft, dass ein Komposit von Mg und HA dahingehend vorteilhaft ist, dass eine unerwünschte forcierte Degradation durch unzureichend ausgeführte Ummantelung verhindert wird und daher die Degradation besser kontrolliert verläuft. In dieser Studie wiesen im Vergleich zu purem Mg und der Legierung W4 Implantate aus Mg-HA die intensivste Korrosion auf und bereits 6 Wo nach Implantation war die Integrität der Implantate aufgehoben und abgespaltene Partikel befanden sich im periimplantären Gewebe (Charyeva et al. 2015). Eine Ursache für diese forcierte Degradation könnte darin bestehen, dass der hohe Anteil von HA im Komposit mit 20 % Gewichtsanteilen und dem damit vorhandenen hohen Kalziumgehalt die frühzeitige und foudroyante Korrosion induziert (Schaffler und Kennedy 2012). Es ist dabei zu berücksichtigen, dass ossale Regenerationen einen Zeitraum von ca. 12 Wo erfordern (Staiger et al. 2006).

In der hier vorliegenden Arbeit betrug der Anteil an HA im Komposit sogar 30 % Gewichtsanteil. Ein Fazit für zukünftige Entwicklungen von Mg-haltigen Implantaten könnte auf der Basis dieser Erkenntnisse eine Reduktion des HA und damit des Kalziumanteils für Mg-HA-Komposits bzw. Ummantelungen beinhalten.

4.3 Diskussion histochemischer Ergebnisse

In dieser Arbeit wurden 6 und 12 Wo nach transossaler Implantation von Schrauben, bestehend aus den Mg-haltigen Materialien W4-Legierung und Mg-HA-Komposit, histologische Nachweise von TRAP, ALP und PECAM-1 vorgenommen.

Im Fokus der enzymhistochemischen Analysen von TRAP und ALP sowie des immunhistochemischen Nachweises von PECAM-1 standen die Region des Implantatlagers mit einem TRAP- und ALP-positiven Nachweis in den Targetzellen Makrophagen, Osteoklasten und Osteoblasten sowie für PECAM-1 der Nachweis in Endothelzellen der Blutgefäße. Ausgewertet wurden die Enzymnachweise semiquantitativ in Form eines auf die Häufigkeit enzympositiver Zellen bezogenen Scorings, wobei bei einem Scorewert von 0 keine enzympositiven Zellen nachweisbar, einem Scorewert von 1 eine geringe Anzahl enzympositiver Zellen nachweisbar und einem Scorewert von 2 eine vermehrte Anzahl enzympositiver Zellen nachweisbar waren.

Wenn man davon ausgeht, dass die Anzahl von TRAP-positiven Zellen in Korrelation zur Stärke der Korrosion Mg-haltiger Implantate steht, dann stimmen die Ergebnisse der Versuchsgruppe 3 (W4 1-mal verpresst 12 Wo) mit 0,5 Scoringpunkten und der damit geringsten Anzahl TRAP-positiver Zellen mit der niedrigen H₂-Gasbildung in dieser Gruppe überein.

Demgegenüber lagen die Scoringwerte der Versuchsgruppe 4 (W4 2-mal verpresst 12 Wo) und der Versuchsgruppe 5 (Mg-HA-Komposit 12 Wo) mit Scoringwerten von 1,5 und 2,0 deutlich höher und könnten als osteogenetische Regenerationsphase mit vermehrter Häufigkeit der Osteoklasten und nicht als Zeichen einer intensiven Korrosion gewertet werden. In der Gruppe Mg-HA-Komposit fanden sich im Vergleich zu den Versuchsgruppen 1 bis 4 die meisten TRAP-positiven Zellen im Bereich des Implantats. Dieser Befund stimmte mit den Ergebnissen einer Studie überein, in der Implantate, bestehend aus 3 differenten, Mg-basierten Biomaterialien (Mg-HA, W4 und pures Mg), im Bereich des distalen Femurs von Kaninchen fixiert und nach 6 und 12 Wo zusammen mit dem knöchernen Implantatbett explantiert wurden (Charyeva et al. 2015). Hinsichtlich der Anzahl TRAP-positiver Zellen fand sich die größte Anzahl 6 und 12 Wo nach Entfernung von Mg-HA-Komposit-Implantaten und die geringste Zahl TRAP-positiver Zellen zeigte sich bei den Versuchstieren mit W4-Implantaten. Zu den TRAP-positiven Zellen gehören vorwiegend Osteoklasten, Makrophagen und dentritische Zellen, so dass der TRAP-Nachweis insbesondere bei Untersuchungen von ossalen Umbauvorgängen als Marker fungiert. Osteoklasten leiten die Knochenneubildung über Osteoblasten ein (Halleen et al. 2006). Da die höchste Anzahl TRAP-positiver Zellen

in der Mg-HA-Komposit-Gruppe sogar 12 Wo nach Implantation zu verzeichnen war, könnte dies einerseits noch ein Resultat einer weiterhin stattfindenden forcierten Degradation sein, andererseits könnte dies auch einen Beweis für eine knöcherne Regeneration bedeuten (Charyeva et al. 2015).

Hinsichtlich des positiven Nachweises von ALP wiesen die Versuchsgruppen 1 (W4 1-mal verpresst 6 Wo) und Versuchsgruppe 4 (W4 2-mal verpresst 12 Wo) mit 0,4 respektive 0,6 Scorewerten eine geringe Zahl ALP-positiver Osteoblasten im Bereich des Implantatlagers auf. In den Versuchsgruppen 2 (W4 2-mal verpresst 6 Wo) und 5 (Mg-HA-Komposit 12 Wo) wurden deutlich höhere Zahlen an ALP-positiven Osteoblasten gefunden und die mittleren Scorewerte betrugen 1,0 respektive 0,8.

12 Wo nach Versuchsbeginn wiesen die hohen Scorewerte des zellulären ALP-Gehalts auf eine durch Osteoblasten vermittelte intensive Osteoneogenese hin.

Eine Einschätzung der Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung von PECAM-positiven Strukturen wies bei allen 5 Versuchsgruppen nach Standzeiten von 6 und 12 Wo PECAM-positive Zellen als Zeichen für eine beginnende Angioneogenese auf. Kritisch muss erwähnt werden, dass eine quantitative Bestimmung der Angioneogenese auf der Basis der Auswertung von Serienschnitten möglich gewesen wäre, aber nicht erfolgte. Als Grund hierfür ist zu diskutieren, dass methodische Schwankungen in Bezug auf die Herstellung des Präparates, des Alters und der auf die histologischen Schnitte pipettierten Menge des Antikörpers, der nicht konstanten Schnittdicke der Präparate sowie des Mangels an exakten Vergleichsparametern hinsichtlich der zu bewertenden Blutgefäße zum Auftreten eines Bias und damit zu nicht validen Daten geführt hätte, so dass eine seriöse Auswertung nicht möglich war.

5 Ausblick

In der vorliegenden Studie erfolgte zur Erfassung der Korrosion die Messung der Gasblasenbildung an drei differenten Magnesiumwerkstoffen. Magnesium ist auf Grund seiner Biokompatibilität, Densität und Biodegradibilität für einen Einsatz als Implantat im Knochen und für Stents im Gefäßsystem ein vielversprechendes Material, besonders auch unter dem Aspekt, dass eine Zweitoperation in Form der Materialentfernung vermieden werden könnte. Wie in der vorliegenden Arbeit dargelegt wurde, hat die Forschung in den letzten 15 Jahren nachgewiesen, dass die Biodegradation von Mg und Mg-Legierungen komplexer Natur ist und zahlreichen Einflüssen unterliegt. Dazu zählen die Materialien und deren Anteil bei Mg-Legierungen, Materialbehandlung, Oberflächengestaltung und letztlich auch Verunreinigungen.

Der Begriff „biologisch abbaubares Metall“ (BM) wird weltweit verwendet, um diese Arten von abbaubaren metallischen Biomaterialien für medizinische Anwendungen zu beschreiben. In einer viel beachteten Übersichtsarbeit wurde versucht, die Abbaumechanismen metallischer Biomaterialien und deren Einflussfaktoren zu diskutieren (Zheng et al. 2014). Im Vordergrund standen dabei zunächst die Mg-basierten BMs (reines Mg, Mg-Ca-Legierung, Mg-Zn-Legierung usw.), wie sie auch in der vorliegenden Studie zum Einsatz kamen. Daneben wurden aber auch Fe-basierte BMs (reine Fe, Fe-Mn-basierte Legierungen usw.) und andere BMs, wie z. B. reines Wolfram, Zink und Zinklegierungen sowie kalziumbasierte und strontiumbasierte Materialien identifiziert. Deren Mikrostrukturen und mechanische Eigenschaften sowie das Abbauverhalten wurden in vitro und in vivo in vorklinischen und klinischen Studien überprüft. Einen Schwerpunkt bildete dabei die Kontrolle der biologischen Abbauraten. Diese werden auch in Zukunft im Mittelpunkt der Forschungen stehen, um die Heilungsraten der Wirtsgewebe den verschiedenen Oberflächenmodifikationstechniken und neuartigen Strukturentwürfen anzupassen. Die Forscher sprechen dabei von „Biomaterialien dritter Generation“ mit „multifunktionalen Fähigkeiten“, die sich je nach individuellen Anforderungen kontrollieren lassen (Zheng et al. 2014).

Ein wichtiger Schritt für die Forschung wäre eine Standardisierung von in-vitro-Tests, um eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu erzielen und um diese damit für weitere in-vivo-Untersuchungen effektiv einsetzen zu können. Für den klinischen Einsatz von Mg-Legierungen sind weiterführende in-vivo-Untersuchungen erforderlich, bei denen verschiedene Ansatzpunkte existieren. Zu diesen zukünftigen Forschungsschwerpunkten zählen die Wechselwirkung zwischen Implantat und periimplantärem Gewebe unter besonde-

5 Ausblick

rem Bezug auf Vaskularisierung, die Gestaltung der Implantatoberfläche und die Ummantelung der Implantate zur Optimierung der Korrosionsintensität sowie der Verlauf der Korrosion im Hinblick auf den weiteren Abbau im Organismus. Als ein wesentlicher Aspekt der weiteren Forschung werden in der Literatur in-vivo-Untersuchungen zur Frakturheilung nach Osteosynthese mit Mg-haltigen Legierungen von weiterführendem Nutzen sein, wie es in der vorliegenden Arbeit mit der Verwendung von Knochenschrauben am Rattenfemur erfolgte.

6 Zusammenfassung

Für die stabilisierende Knochenchirurgie sind resorbierbare Implantate von großer Bedeutung, da eine weitere Operation zur Entfernung von Implantaten nach der Knochenheilung nicht erforderlich wäre. Mg-haltige Legierungen könnten dafür geeignete Materialien sein, da Mg beim Menschen eine hohe Tolerabilität aufweist.

In dieser Arbeit wurden in-vivo-Untersuchungen zur Korrosionserfassung an Knochenschrauben, bestehend aus 1-mal und 2-mal verpressten Mg-haltigen W4-Legierungen und Mg-HA-Komposit am Femur von Ratten vorgenommen. Die Bestimmung der Korrosion erfolgte mittels histomorphometrischer Messungen der Distanz der am weitesten entfernt liegenden H_2 -Gasblasen und der Flächen aller H_2 -Gasblasen in der Peripherie der Implantatregion.

Die größte Gasblasenfläche wurde bei Implantaten aus 2-mal verpresster W4-Legierung nach einer Beobachtungszeit von 6 Wochen mit 31,6% gemessen. Nach 12 Wochen hatte die Gasblasenbildung in allen 3 Werkstoffen (W4 1-mal verpresst, W4 2-mal verpresst, Mg-HA-Komposit) abgenommen.

Der intergruppale Vergleich der Gasblasenflächen bei 1-mal und 2-mal verpresster W4-Legierung nach 6 Wo, sowie bei W4-Legierungen und Mg-HA-Komposit nach 12 Wo wies keine signifikanten Unterschiede auf. Dagegen fanden sich signifikant hohe Gasblasenbildungen bei Implantaten aus 2-mal verpresster W4-Legierung nach 6 Wochen im Vergleich zu W4 2-mal verpresst mit einer Beobachtungszeit von 12 Wochen. Innerhalb dieser Gruppe waren die Gasblasen nach 6 Wochen auch am weitesten entfernt. Signifikante Unterschiede beim Vergleich der Entfernungen der Gasblasen wurden dagegen nicht gemessen.

Des Weiteren wurden enzymhistochemische (TRAP, ALP) und immunhistochemische (PECAM) Untersuchungen in der Implantatperipherie vorgenommen. Durch ein Scoring wurde versucht, eine Quantifizierung der TRAP-positiven Zellen vorzunehmen. In diesem Scoring zeigte sich, dass nach 12 Wochen bei 2-mal verpresstem Werkstoff vermehrt TRAP-positive Zellen im Vergleich zu 6 Wochen nach der Implantation nachgewiesen wurden. 12 Wochen nach Implantation zeigte sich folgende quantitative Reihung: Mg-HA-Komposit > W4 2x verpresst > W4 1x verpresst. Diese Ergebnisse könnten ein möglicher Hinweis auf eine stimulierte Knochenbildung am Mg-HA-Komposit sein. Damit würden sich neue Impulse für die Modifikation von Magnesiumimplantaten für den Einsatz im muskuloskelettalen System ergeben.

7 Summary

For stabilizing bone surgery, resorbable implants are of particular importance, since a further surgery to remove implants after bone healing would not be necessary. Alloys containing Mg could be suitable materials for this purpose, since Mg has a high tolerability in humans.

In this study, in vivo investigations on corrosion monitoring of bone screws consisting of once and twice pressed Mg-containing W4 alloys and Mg-HA composite at the femur of rats were performed. Corrosion was determined by histomorphometric measurements of the distance of the most distant H₂ gas bubbles and the areas of all H₂ gas bubbles in the periphery of the implant region.

The largest gas bubble area was measured with 31.6% for implants made of twice pressed W4 alloy after an observation period of 6 weeks. After 12 weeks the formation of gas bubbles had decreased in all 3 materials (W4 pressed once, W4 pressed twice, Mg-HA composite).

The intergroup comparison of the gas bubble areas for W4 alloy pressed once and twice after 6 weeks, and for W4 alloys and Mg-HA composite after 12 weeks did not show any significant differences. On the contrary, significantly high gas bubble formation was found for implants made of W4 alloy pressed twice after 6 weeks compared to W4 pressed twice with an observation period of 12 weeks. Within this group, the gas bubbles were also furthest apart after 6 weeks. However, no significant differences were measured when comparing the distances of the gas bubbles.

Furthermore, enzyme-histochemical (TRAP, ALP) and immunohistochemical (PECAM) examinations in the implant periphery were performed. A scoring was used to try to quantify the TRAP-positive cells. This scoring showed that after 12 weeks, increased TRAP-positive cells were detected in material pressed twice compared to 6 weeks after implantation. 12 weeks after implantation the following quantitative sequence was observed: Mg-HA composite > W4 2x pressed > W4 1x pressed. These results could be a possible indication of stimulated bone formation at the Mg-HA composite. This would provide new impulses for the modification of magnesium implants for use in the musculoskeletal system.

*Der Mensch muss bei dem Glauben verharren, dass das Unbegreifliche begreiflich sei:
er würde sonst nicht forschen.*

J. W. von Goethe

8 Abkürzungsverzeichnis

Ag	Silber
Al.....	Aluminium
ALP	Alkalische Phosphatase
ANOVA	Varianzanalyse
AOI.....	Area of Interest
Aqua dest.....	Destilliertes Wasser
AZ	Aluminium-Zink
BCIP.....	5-Bromo-4-Chloro-Indolyl-Phosphat
BM	Biologisch abbaubares Metall
BMU	Basic multicellular unit
BSA.....	Bovine (Rinder)-Serumalbumin
Bzw	beziehungsweise
C	Celsius
Ca	Kalzium
CD 31.....	Cluster of differentiation 31
Ce	Cerium
CF-PEEK.....	Karbonfaserverstärktes PEEK
Cr	Chrom
CT	Computertomografie
Destatis	Statistisches Bundesamt
DMEM	Dulbecco`s modifiziertes Eagle-Medium
Ø	Durchmesser
Dy	Dysprosium
e ⁻	Negativer Ladungsträger
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure
EF	Epiphysenfuge
Fe.....	Eisen
g.....	Gramm
Gd	Gadolinium
Gew-%	Gewichtsprozent
GH	Growth Hormone
GO	Graphitoxid
HA.....	Hydroxylapatit
HBSS	Hanks balanzierte Salzlösung

HE	Hämatoxylin-Eosin
H ₂	Wasserstoff
H ₂ O	Wasser
IGFs	Wachstumsfaktoren
Imp	Implantat
i.p.	intraperitoneal
Jh	Jahrhundert
Kd	Degradation von Komposit
Kf	Kompositfragment
Ko	Komposit
Kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
L	Länge
l	Liter
La	Lanthan
LAE442	Lithium(4%)-Aluminium(4%)-RE(2%)
Li	Lithium
Lu	Lutetium
Mg	Magnesium
Mg-HA	Magnesiumhydroxylapatit
MgH ₂	Magnesiumhydrit
Mg(OH) ₂	Magnesiumdihydroxid
Mg-2Ag	Magnesium-2-Silber
Mg-10Gd	Magnesium-10-Gadolinium
mg	Milligramm
mg/d	Milligramm pro Tag
mm	Millimeter
mm y ⁻¹	Millimeter pro Jahr
mmol/L	Millimol pro Liter
Min	Minute
Mn	Mangan
M	Molarität
MRT	Magnetresonanztomografie
Na	Natrium
N ₂	Stickstoff
NBT	Nitro-Blau-Tetrazoliumsalz
Nd	Neodym

8 Abkürzungsverzeichnis

Ni	Nickel
NOAEL	No Observed Adverse Effect Level
OH	Hydroxid
OH ⁻	Hydroxidionen
OG	Osteogenese
OPG	Osteoprotegerin
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PEDOT	Poly-3,4-ethylendioxythiophen
PEEK	Polyetheretherketon
PEO	Plasmaelektrolytische Oxidation
PECAM-1	Platelet endothelial cell adhesion molecule-1
PDLA	Poly-D-Lactid
PLLA	Poly-L-Lactid
Pr	Praseodymium
RANK-L	Receptor Activator of Nuclear Factor kappa-B Ligand
RE	Rare earth elements - Seltene Erden
RKI	Robert-Koch-Institut
s.c.	subkutan
Sek	Sekunde
Si	Silizium
sog.	sogenannt
Std	Stunde
TB	Toluidinblau
TRAP	Tartrat-resistente saure Phosphatase
W4	Anteil von 96 Gew-% Mg und 4 Gew-% Y
WE43	Anteil von 93,6 Gew-% Mg, 4 Gew-% Y, 2,25 Gew-% Neodym (Nd) und 0,15 Gew-% Zirkonium (Zr)
Wo	Woche
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromolar
Y	Yttrium
Zn	Zink
Zr	Zirkonium

9 Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Mittelwerte und Lokalisation der TRAP-positiven Zellen	49
Tab. 2: Mittelwerte und Lokalisation der ALP-positiven Zellen	56

10 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Identifizierung der H ₂ -Gasblase.....	22
Abb. 2: H ₂ -Distanzmessung.....	23
Abb. 3: H ₂ -Fächenmessung in der Test-AOI.....	24
Abb. 4: Messung in Zonen und Quadranten	25
Abb. 5: Optimale Ringzonen mit viel H ₂ -Fläche	26
Abb. 6: Messung aller H ₂ -Gasblasen peripher des Defektbereichs.....	27
Abb. 7: Gruppe W4 1-mal verpresst 6 Wo, Übersicht H ₂ -Gasblasen	32
Abb. 8: Gruppe W4 2-mal verpresst 6 Wo, Übersicht H ₂ -Gasblasen	33
Abb. 9: Gruppe W4 1-mal verpresst 12 Wo, Übersicht H ₂ -Gasblasen	34
Abb. 10: Gruppe W4 2-mal verpresst 12 Wo, Übersicht H ₂ -Gasblasen.....	35
Abb. 11: Gruppe Mg-HA-Komposit 12 Wo, Übersicht H ₂ -Gasblasen	36
Abb. 12: Boxplot-Darstellung der Distanzmessung.....	37
Abb. 13: Boxplot-Darstellung der Gasblasenfläche der Test-AOI	38
Abb. 14: Boxplot-Darstellung der Gasblasenfläche in Zone 3.....	39
Abb. 15: Boxplot-Darstellung der Gasblasenfläche in Zone 4.....	40
Abb. 16: Boxplot-Darstellung der Gesamtfläche aller H ₂ -Gasblasen.....	41
Abb. 17: Gruppe W4 1-mal verpresst 6 Wo, TRAP-Nachweis	43
Abb. 18: Gruppe W4 2-mal verpresst 6 Wo, TRAP-Nachweis	44
Abb. 19: Gruppe W4 1-mal verpresst 12 Wo, TRAP-Nachweis	45
Abb. 20: Gruppe W4 1-mal verpresst 12 Wo, TRAP-Nachweis, Beispiel 2	46
Abb. 21: Gruppe W4 2-mal verpresst 12 Wo, TRAP-Nachweis	47
Abb. 22: Gruppe Mg-HA-Komposit 12 Wo, TRAP-Nachweis	48
Abb. 23: Gruppe W4 1-mal verpresst 6 Wo, ALP-Nachweis	50

10 Abbildungsverzeichnis

Abb. 24: Gruppe W4 2-mal verpresst 6 Wo, ALP-Nachweis	51
Abb. 25: Gruppe W4 1-mal verpresst 12 Wo, kein ALP-Nachweis	52
Abb. 26: Gruppe W4 2-mal verpresst 12 Wo, ALP-Nachweis	53
Abb. 27: Gruppe W4 2-mal verpresst 12 Wo, ALP-Nachweis, Beispiel 2	54
Abb. 28: Gruppe Mg-HA-Komposit 12 Wo, ALP-Nachweis	55
Abb. 29: Gruppe W4 1-mal verpresst 6 Wo, PECAM-1-Nachweis	57
Abb. 30: Gruppe W4 2-mal verpresst 6 Wo, PECAM-1-Nachweis	58
Abb. 31: Gruppe W4 1-mal verpresst 12 Wo, PECAM-1-Nachweis	59
Abb. 32: Gruppe W4 2-mal verpresst 12 Wo, PECAM-1-Nachweis	59
Abb. 33: Gruppe Mg-HA-Komposit 12 Wo, PECAM-1-Nachweis	60
Abb. 34: Gruppe W4 2-mal verpresst 6 Wo, wenig PECAM-1-Nachweis	61

11 Literaturverzeichnis

Altmann P, Dhanesha U, Hamon C, Cunningham J, Blair J, Marsh F (1889) Disturbance of cerebral function by aluminium in haemodialysis patients without overt aluminium toxicity. *Lancet*. 2(8653):7-12.

Baron R (2000) Anatomy and ultrastructure of bone-histogenesis, growth and remodeling. In: De Groot LJ, Beck-Peccoz P, Chrousos G et al. (eds). *Endotext*. South Dartmouth (MA) MDText.com, Inc. (Zugriff: 05.11.2018).

Bobe K, Willbold E, Morgenthal I, Andersen O, Studnitzky T, Nellesen J, Tillmann W, Vogt C, Vano K, Witte F (2013) In vitro and in vivo evaluation of biodegradable, open-porous scaffolds made of sintered magnesium W4 short fibres. *Acta Biomater*. 9:8611-8623.

Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL (2003) Osteoclast differentiation and activation. *Nature* 423 (6937):337-342.

Brady MP, Ilevlev AV, Fayek M, Leonard DN, Frith MG, Meyer HM, Ramirez-Cuesta AJ, Daemen LL, Cheng Y, Guo W, Poplawsky JD, Ovchinnikova OS, Thomson J, Anovitz LM, Rother G, Shin D, Song GL, Davis B (2017) Rapid Diffusion and Nanosegregation of Hydrogen in Magnesium Alloys from Exposure to Water. *ACS Appl Mater Interfaces*. 43:38125-38134.

Brar HS, Platt MO, Sarntinoranont M, Martin PI, Manuel MV (2009) Magnesium as a biodegradable and bioabsorbable material for medical implants. *JOM*. 61:31-34.

Cantatore FP, Crivellato E, Nico B, Ribatti D (2005) Osteocalcin is angiogenic in vivo. *Cell Biol Int* 2005; 29(7): 583-585.

Castellani C, Lindtner RA, Hausbrandt P, Tschegg E, Stanzl-Tschegg SE, Zanoni G, Beck S, Weinberg AM (2011) Bone-implant interface strength and osseointegration: Biodegradable magnesium alloy versus standard titanium control. *Acta biomater*. 7:432-440.

Catt K, Li H, Cui T (2017) Poly (3,4-ethylenedioxythiophene) graphene oxide composite coatings for controlling magnesium implant corrosion. *Acta Biomater*. 48:530-540.

Cha PR, Han HS, Yang GF, Kim YC, Hong KH, Lee SC, Jung JY, Ahn JP, Kim YY, Cho SY, Byun JY, Lee KS, Yang SJ, Seok HK (2013) Biodegradability engineering of biodegradable Mg alloys: tailoring the electrochemical properties and microstructure of constituent phases. *Sci Rep*. 3:2367-2372.

Charyeva O, Thormann U, Lips KS, Heimann L, Sommer U, Szalay G, Alt V, Hort N, Schnettler R, Rauschmann M, Schmidt S (2015) Histological Comparison of New Biodegradable Magnesium-Based Implants for Maxillofacial Applications. *J Maxillofac Oral Surg*. 14:637-645.

Chlumsky V (1900) Über die Wiederherstellung der Beweglichkeit des Gelenkes bei Ankylose. Zentralbl Chir. 37:37.

Cui L, Sun L, Zeng R, Zheng Y, Li S (2017) In vitro degradation and biocompatibility of Mg-Li-Ca alloys-the influence of Li content. <https://doi.org/10.1007/s40843-017-9071-y>.

Chan AW, Moliterno D J (2001) In-stent restenosis: update on intracoronary radiotherapy. Clev Clin J Med. 68:796-803.

Clarke B (2008) Normal bone anatomy and physiology. Clin J Am Soc Nephrol. Suppl. 3:131-139.

Datta HK, Ng WF, Walker JA, Tuck SP, Varanasi SS (2008) The cell biology of bone metabolism. J Clin Pathol. 61:577-587.

Delesse M A (1866) Procédé mécanique pour déterminer la composition des roches. Comptes Rendus de l'Académie des Sciences. 25:544-545.

Destatis und RKI (2017) Gesundheitsberichterstattung. www.gbe-bund.de Zugriff: 04.11.2018.

Di Mario C, Griffiths H, Goktekin O, Peeters N, Verbist J, Bosiers M, Deloose K, Heublein B, Rohde R, Kasese V, Ilesley C, Erbel R (2004) Drug-eluting bioabsorbable magnesium stent. J Intervent Cardiol. 17:391-395.

Duncan RL, Turner CH (1995) Mechanotransduction and the functional response of bone to mechanical strain. Calcif Tissue Int. 57:344-358.

Eliezer A, Witte F (2010) Corrosion behavior of magnesium alloys in biomedical environments. Adv Mater Res. 95:17-20.

Erbel R, Böse D, Haude M, Kordish I, Churzidze S, Malyar N, Konorza T, Sack S (2007) Absorbierbare Stents. Eine vielversprechende Neuerung? Herz. 32:308-319.

Feyerabend F, Fischer J, Holtz J, Witte F, Willumeit R, Drücker H, Vogt C, Hort N (2010). Evaluation of short-term effects of rare earth and other elements used in magnesium alloys on primary cells and cell lines. Acta Biomater. 6:1834-1842.

Frost HM (1990) Skeletal structural adaptations to mechanical usage (SATMU): Redefining Wolff's law: the remodeling problem. Anat Rec. 226:414-422.

Galenus A (1586) Galeni Opera - Librorum Septima. Ex sexta Giuntarum editione, Venetiis:Giunta. Digitalisierte Ausgabe der Bayerischen Staatsbibliothek München, Zugriff: 06.04.2018.
<http://opacplus.bsb-muenchen.de/title/BV010893870>

Galli S, Andersson M, Jinno Y, Karlsson K, He W, Xue Y, Mustafa K, Wennerberg A, Jimbo R (2017a) Magnesium release from mesoporous carriers on endosseous implants

does not influence bone maturation after 6 weeks in rabbit bone. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 105:2118-2125.

Galli S, Stocchero M, Andersson M, Karlsson J, He W, Lilin T, Wennerberg A, Jimbo R (2017b) The effect of magnesium on early osseointegration in osteoporotic bone: a histological and gene expression investigation. 28:2195-2205.

Ghazi A, Berrier C, Ajouz B, Besnard M (1998) Mechanosensitive ion channels and their mode of activation. *Biochimie.* 80:357-362.

Gluck T (1891) Referat über die durch das moderne chirurgische Experiment gewonnenen positiven Resultate, betreffend die Naht und den Ersatz von Defecten höherer Gewebe, sowie über die Verwendung resorbierbarer und lebendiger Tampons in der Chirurgie. *Arch klin Chir.* 41:187-239.

Grünfeld JP, Rossier BC (2009) Lithium nephrotoxicity revisited. *Nature Rev Nephrol.* 5:270-276.

Hadjidakis DJ, Androulakis II (2006) Bone remodeling. *Ann N Y Acad Sci.* 1092:385-396.

Halleen JM, Tiitinen SL, Ylipahkala H, Fagerlund KM, Väänänen HK (2006) Tartrate-resistant acid phosphatase 5b (TRACP 5b) as a marker of bone resorption. *Clin Lab.* 52:499-509.

Höh N von der, Bormann D, Lucas A, Denkena B, Hackenbroich C, Meyer-Lindenberg A (2009) Influence of different surface machining treatments of magnesium-based resorbable implants on the degradation behavior in rabbits. *Adv Eng Mater.* 11:B47-B54.

Höpfner E (1903) Ueber Gefäßnaht, Gefäßtransplantation und Replantation von amputierten Extremitäten. *Arch Klin Chir.* 70:417.

Hort N, Huang Y, Fechner D, Störmer M, Blawert C, Witte F, Vogt C, Drücker H, Willumeit R, Kainer KU, Feyerabend F (2010) Magnesium alloys as implant materials – Principles of property design for Mg-RE alloys. *Acta Biomater.* 6:1714-1725.

Howship J (1817) Experiments and observations in order to determine the means employed by the animal economy in the formation of bone. *Transactions of the Medico-Chirurgical Society (London).* 6:263-301.

Huse EC (1878) A new ligature? *Chicago Med J Exam.* 37:171-172.

Jilka RL (2003) Biology of the basic multicellular unit and the pathophysiology of osteoporosis. *Med Pediatr Oncol* 2003; 41(3):182-185.

Jung O, Smeets R, Porchetta D, Kopp A, Ptock C, Müller U, Heiland M, Schwade M, Behr B, Kröger N, Kluwe L, Hanken H, Hartjen P (2015) Optimized in vitro procedure for assessing the cytocompatibility of magnesium-based biomaterials. *Acta Biomater.* 23:354-363.

Khosla S (2001) Minireview: the OPG/RANKL/RANK system. *Endocrinology*. 142:5050-5055.

Kirkland N, Birbilis N, Staiger MP (2012) Assessing the corrosion of biodegradable magnesium implants: a critical review of current methodologies and their limitations. *Acta Biomaterialia*. 8:925-936.

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

Kuchling H (2011) Taschenbuch der Physik. München: Carl Hanser.

Kuhlmann J, Bartsch I, Willbold E, Schuchardt S, Holz O, Hort N, Höche D, Heineman WR, Witte F (2013) Fast escape of hydrogen from gas cavities around corroding magnesium implants. *Acta Biomater*. 9:8714-8721.

Kulkarni KK, Pani KC, Neumann C, Leonard F (1966) Polylactid acid for surgical implants. *Arch Surg*. 93:839-843.

Kurtz SM, Devine JN (2007) PEEK biomaterials in trauma, orthopedic, and spinal implants. *Biomaterials*. 28(32):4845-4869.

Kusumbe AP, Ramasamy SK, Adams RH (2014) Coupling of angiogenesis and osteogenesis by a specific vessel subtyp in bone. *Nature*. 507:323-328.

Lee JW, Han H-S, Han KJ, Park, J, Jeon H, Ok MR, Seok HK, Ahn JP, Lee KE, Lee DH, Yang SJ, Cho SY, Cha PR, Kwon H, Nam TH, Han JHL, Rho HJ, Lee KS, Kim YC, Mantovani D (2016) Long-term clinical study and multiscale analysis of in vivo biodegradation mechanism of Mg alloy. *Proc Natl Acad Sci USA*. 113:716-721.

Lunder O, Lein JE, Hesjevik SM, Aune TK, Nisancioglu K (1994) Corrosion morphologies on magnesium alloy AZ 91. *Werkstoffe und Korrosion*. 45:331-340.

Makar GL, Kruger J (1993) Corrosion of magnesium. *Int. Mater. Rev*. 38:138-153.

Marco I, Myrissa A, Martinelli E, Feyerabend F, Willumeit-Römer R, Weinberg AM, Van der Biest O (2017) In vivo and in vitro degradation comparison of pure Mg, Mg-10Gd and Mg-2Ag: a short term study. *Eur Cell Mater*. 33:90-104.

Martinez-Sanchez AH, Luthringer BJC, Feyerabend F, Willumeit R (2015) Mg and Mg alloys: how comparable are in vitro and in vivo corrosion rates? A review. *Acta Biomater*. 13:16-31.

Mc Bride ED (1938) Adsorbable metal in bone surgery. *JAMA*. 111:2464.

Minkin C (1982) Bone acid phosphatase: tartrate-resistant acid phosphatase as a marker of osteoclast function. *Calcif Tissue Int*. 34:285-290.

- Noviana D, Paramitha D, Ulum MF, Hermawan H (2016) The effect of hydrogen gas evolution of magnesium implant on the postimplantation mortality of rats. *J Orthop Translat.* 5: 9-15
- Nazarov A (1993) Anodic dissolution and autodissolution of magnesium in the presence of depassivators. *Protection of Metals.* 29:525-535.
- Newman PJ, Berndt MC, Gorski J, White GC, Lyman S, Paddock C, Muller WA (1990) PECAM-1 (CD31) cloning and relation to adhesion molecules of the immunoglobulin gene superfamily. *Science.* 247:1219-1222.
- Newman PJ (1997) The biology of PECAM-1. *J Clin Invest.* 100 (11 Suppl): 25-29.
- Owen M (1988) Marrow stromal stem cells. *J Cell Sci Suppl.* 10: 63-76.
- Payr E (1900) Beiträge zur Technik der Blutgefäß- und Nervennaht nebst Mitteilungen über die Verwendung des resorbierbaren Metalles in der Chirurgie. *Arch Klein Chir.* 62:67.
- Pieper C (2005) Korrosion und Oxidation von Magnesium-Legierungen, Düsseldorf:VDI-Verlag. S.12.
- Pittenger MF, McKay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR (1999) Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science.* 284(5411) 143-147.
- Pourbaix M (1974). Atlas of Electrochemical Equilibria in Aqueous Solutions, 2.Aufl. Houston: National Association of Corrosion Engineers.
- Ralston SH (1997) What determines peak bone mass and bone loss? *Baillieres Clin Rheumatol.* 11:479-494.
- Ratna SB, Sampath KTS, Chakkingal U, Nandakumar V, Doble M (2014) Nano-hydroxyapatite reinforced AZ31 magnesium alloy by friction stir processing: a solid state processing for biodegradable metal matrix composites. *J Mater Sci Mater Med.* 25:975–988.
- Rocheffort GY, Pallu S, Benhamou CL (2010) Osteocyte: the unrecognized side of bone tissue. *Osteoporos Int.* 21:1457-1469.
- Rohen JW, Lütjen-Drecoll E (1996) Funktionelle Histologie. 3. Aufl. Schattauer: Stuttgart.
- Rohen JW (1998) Funktionelle Anatomie des Menschen. 9. Aufl. Schattauer:Stuttgart.
- Rubio L, Burgos JS, Morera C, Vera-Sempere FJ (2000) Morphometric study of tumor angiogenesis as a new prognostic factor in nasopharyngeal carcinoma patients. *Pathol Oncol Res.* 6:210-216.
- Rüedi TP (1975) Titan und Stahl in der Knochenchirurgie, Berlin Heidelberg: Springer.

Saffar JL, Lasfargues JJ, Cherruau M (1997) Alveolar bone and the alveolar process: the socket that is never stable. *Periodontol* 2000. 13:76-90.

Salunke P, Shanov V, Witte F (2011) High purity biodegradable magnesium-coating for implant application. *Mat Sci Eng B*. 176:1711-1717.

Sartori M, Giavaresi G, Tschon M, Martini L, Dolcini L, Fiorini M, Pressato D, Fini M (2014) Long-term in vivo experimental investigations on magnesium doped hydroxyapatite bone substitutes. *J Mater Sci Mater Med*. 25:1495–1504.

Schaffler MB, Kennedy OD (2012) Osteocyte signaling in bone. *Curr Osteoporos Rep*. 10:118-125.

Seitz J, Collier K, Wulf E, Bormann D, Bach F (2011) Comparison of the corrosion behavior of coated and uncoated magnesium alloys in an in vitro corrosion environment *Adv. Eng. Mater.* 13: B313-23.

Singhal JP, Singh H, Ray AR (1988) Absorbable suture materials: Preparation and properties, *Polym Rev*. 28:475-502.

Sivaraj KK, Adams RH (2016) Blood vessel formation and function in bone. *Development*. 143:2706-2715.

Song GL, Atrens A (1999). Corrosion mechanisms of magnesium alloys. *Adv Eng Mater*. 1:11-33.

Song GL (2005) Recent progress in corrosion and protection of magnesium alloys. *Adv Eng Mater*. 7:563-586.

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

Statistisches Bundesamt Deutschland (2011) Bevölkerungs- und Haushaltsentwicklung im Bund und in den Ländern. Heft 1.

Su X, Sun K, Cui FZ, Landis WJ (2003) Organization of apatite crystals in human woven bone. *Bone*. 32:150-162.

Swiostek J (2008) Erweiterung der Prozessgrenzen beim Strangpressen von Magnesiummagnetlegierungen der AZ-Reihe durch das hydrostatische Strangpressverfahren [Dissertation]. Hamburg-Harburg: Technische Universität.

Tamariz, E, Rios-Ramírez A (2013) Biodegradation of Medical Purpose Polymeric Materials and Their Impact on Biocompatibility. In: Chamy R, Rosenkranz F, Hrsg. *Biodegradation - Life of Science*. London: Intech. 3-30.

Thomann M, Krause C, Bormann D, Höh N von der, Windhagen H, Meyer-Lindenberg A

(2009) Comparison of the resorbable magnesium alloys LAE442 and the bone-implant-contact after 12 months implantation duration in a rabbit model. *Mat Sci Eng Tech.* 40:82-87.

Thormann U, Alt V, Heimann L, Gasquere C, Heiss C, Szalay G, Franke J, Schnettler R, Lips KS (2015) The biocompatibility of degradable magnesium interference screws: an experimental study with sheep. *Biomed Res Int.* 2015:943603. doi: 10.1155/2015/943603.

Tian H-C, Liu J-Q, Kang X-Y, Wei D-X, Zhang C, Du J-C, Yang B, Chen X, Yang C-S (2014) Poly(3,4-ethylenedioxythiophene)/graphene oxide composite coating for electrode-tissue interface. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc.* 2014:1571-4. doi: 10.1109/EMBC.2014.6943903.

Tröltzsch M, Eichhorn M, Probst FA, Messlinger K, Otto S, Tröltzsch M (2016) Knochen und Skelettsystem – von der Embryologie bis zur Osteoporose. *Quintessenz.* 67:83-93.

Trumbo P, Schlicker S, Yates AA, Poos M (2002) Dietary reference intakes for energy, carbohydrate, fiber, fat, fatty acids, cholesterol, protein and amino acids. *J Am Diet Assoc.* 102, 1621-1630.

Ullmann B, Reifenrath J, Seitz J-M, Bormann D, Meyer-Lindenberg A (2013) Influence of the grain size on the in vivo degradation behavior of the magnesium alloy LAE 442. *Proc Institut Mech Eng.* 227:317-326.

Vasconcelos DM, Santos SG, Lamghari M, Barbosa M (2016) The two faces of metal ions: From implants rejection to tissue repair/regeneration. *Biomaterials.* 84:262-275.

Wang Y (1997) Beitrag zur Verbesserung korrosiver Eigenschaften superleichter Magnesium-Lithium-Basislegierungen (Dissertation). Hannover: Universität.

Wang YX, Guan SK, Zeng XQ, Ding WJ (2006) Effects of RE on the microstructure and mechanical properties of Mg-8Zn-4Al magnesium alloy. *Mat Sci Eng.* 416:109-118.

Windhagen H, Radtke K, Weizbauer A, Diekmann J, Noll Y, Kreimeyer U, Schavan R, Stukenborg-Colsman R, Waizy H (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. *Biomed Eng Online.* 12:62.

Witte F, Kaese V, Haferkamp H, Switzer E, Meyer-Lindenberg A, Wirth CJ, Windhagen H (2005) In vivo corrosion of four magnesium alloys and the associated bone response. *Biomaterials.* 26:3557-3563.

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

Witte F (2010) The history of biodegradable magnesium implants: a review. *Acta Biomater.* 6:1680-1692.

Witte F, Hort N, Fröhlich B, Voith W, Fischer H-J, Wolfstädter M (2010) <http://www.patent-de.com/20100225/DE102008037202A1.html> Zugriff: 11.08.2018.

Wu X, Liu X, Wei J, Ma J, Deng F, Wei S (2012) Nano-TiO₂/PEEK bioactive composite as a bone substitute material: in vitro and in vivo studies. *Int J Nanomed.* 7:1215-1225.

Yoshikawa T, Naito Y (2011) Gas biology research in clinical practice. Basel:Karger, 56.

Zaidi M, Moonga B, Moss D W, Macintyre I (1989) Inhibition of osteoclastic acid phosphatase abolishes bone resorption. *Biochem Biophys Res Commun.* 159:68-71.

Zeng R, Dietzel W, Witte F, Hort N, Blawert C (2008) Progress and challenge for magnesium alloys as biomaterials. *Adv Eng Mat.* 10:B3- B14.

Zhang LN, Hou ZT, Ye X, Xu ZB, Bai XL, Shang P (2013) The effect of selected alloying element additions on properties of Mg-based alloy as bioimplants: a literature review. *Front Mater Sci.* 7:227-236.

Zhao D, Wang T, Hoagland W, Benson D, Dong Z, Chen S, Chou DT, Hong D, Wu J, Kumta PN, Heineman WR (2016) Visual H₂ sensor for monitoring biodegradation of magnesium implants in vivo. *Acta Biomater.* 45:399-409.

Zhao D, Brown A, Wang T, Yoshizawa S, Sfeir C, Heineman WR (2018) In vivo quantification of hydrogen gas concentration in bone marrow surrounding magnesium fracture fixation hardware using an electrochemical hydrogen gas sensor. *Acta Biomater.* 73:559-566.

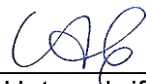
Zheng YF, Gu XN, Witte F (2014) Biodegradable metals. *Mater Sci Eng.* 77:1-34.

Zreiqat H, Howlett CR, Zannettino A, Evans P, Schulze-Tanzil G, Knabe C, Shakibaei M (2002) Mechanisms of magnesium-stimulated adhesion of osteoblastic cells to commonly used orthopaedic implants. *J Biomed Mater Research* 62:175-184.

12 Ehrenwörtliche Erklärung

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Bayreuth, 10.04.2019



Unterschrift

13 Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde im Labor für experimentelle Unfallchirurgie der Klinik und Poliklinik für Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen unter Anleitung von Frau Professorin Dr. Katrin Susanne Lips, Leiterin des Labors, durchgeführt.

Frau Prof. Dr. Lips hat mit sehr viel Engagement zum Gelingen der Arbeit beigetragen. Für die stetige Bereitschaft, mir Hilfestellungen durch fachliche Anregungen zur Gliederung, Strukturierung und Verbesserung der Arbeit zu geben, zu motivieren und mich in allen Phasen der Arbeit an Frau Prof. Dr. Lips vertrauensvoll wenden zu dürfen, möchte ich mich sehr herzlich bedanken. Ganz besonders dankbar bin ich für die Geduld und das Verständnis, das mir Frau Prof. Dr. Lips entgegenbrachte, als ich aufgrund der langen und schweren Erkrankung und des Todes meiner Mutter die Arbeit an der Dissertation unterbrechen musste.

Herrn Prof. Dr. Dr. Howaldt danke ich für die Arbeit als Gutachter und Herrn Prof. Dr. Mulert für den Prüfungsvorsitz bei der Disputation.

Des Weiteren möchte ich vor allem auch Herrn Univ.-Prof. Prof. h.c. Dr. Dr. Dr. h.c. Reinhard Schnettler sowie Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Dr. h.c. Christian Heiß für den bereitgestellten Arbeitsplatz und die Möglichkeit danken, dieses Forschungsvorhaben durchführen zu können.

Mein Dank gilt ferner Frau Dr. Ursula Sommer für die Einweisung in den Umgang mit dem Lichtmikroskop, Frau Martina Fink für die Einarbeitung in labortechnische Methoden und die Unterstützung bei den histochemischen Färbungen sowie Herrn Rainer Braun, Frau Ida Oberst und allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Labors für experimentelle Unfallchirurgie für ihre Mühen und ihren Einsatz im Zusammenhang mit meiner Arbeit.

Vielen Dank ebenso Herrn Dr. Jörn Pons-Kühnemann (Medizinische Statistik, Justus-Liebig-Universität Gießen) sowie Herrn Dr. Johannes Herrmann für die statistische Beratung und Auswertung.

Für die Finanzierung der Studie möchte ich mich beim Hessischen Ministerium für Wissenschaft und Kunst bedanken, das durch die Hessen-Agentur GmbH das Projekt unter der Kennnummer 182/09-12 mit einer Sachmittelbeihilfe unterstützte.

Nicht zuletzt möchte ich meinem Vater für seine Unterstützung, Durchsicht und aufmunternden Worte während der Anfertigung der Arbeit ein herzliches Dankeschön sagen.

14 Tabellarischer Lebenslauf

Der Inhalt wurde aus Datenschutzgründen entfernt.



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-6865-3

