

Vergleich des Degradationsverhaltens, der Osseointegration
und der Biokompatibilität der offenporigen
Magnesiumscaffolds LAE442 und La2 *in vivo*

von Nadine Denise Kleer-Reiter, geb. Kleer

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München

Vergleich des Degradationsverhaltens, der Osseointegration
und der Biokompatibilität der offenporigen
Magnesiumscaffolds LAE442 und La2 *in vivo*

von Nadine Denise Kleer-Reiter, geb. Kleer
aus Starnberg

München 2021

Aus dem Zentrum für Klinische Tiermedizin der Tierärztlichen
Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl für Chirurgie der Kleintiere

Arbeit angefertigt unter der Leitung von:
Univ.-Prof. Dr. Andrea Meyer-Lindenberg

Mitbetreuung durch:
Dr. Anja-Christina Waselau

**Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger,
Ph.D.

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Andrea Meyer-Lindenberg

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Johann Maierl
Univ.-Prof. Dr. Lutz S. Göhring
Priv.-Doz. Dr. Joachim C. Manning
Univ.-Prof. Dr. Cornelia A. Deeg

Tag der Promotion: 6. Februar 2021

Meiner Familie in Dankbarkeit

INHALTSVERZEICHNIS

I.	EINLEITUNG	1
II.	LITERATURÜBERSICHT	4
1.	Knochen	4
1.1.	Aufbau und Physiologie von Röhrenknochen	4
1.2.	Knochenbildung und -umbau.....	4
1.3.	Frakturheilung.....	5
2.	Knochenimplantate und Knochenersatzstoffe	6
2.1.	Mechanische und physiologische Eigenschaften.....	6
3.	Implantatmaterialien.....	7
3.1.	Nicht resorbierbare Materialien	7
3.1.1.	Stahl	7
3.1.2.	Titan und Titanverbindungen.....	8
3.1.3.	Kobaltverbindungen.....	8
3.2.	Biokeramiken	8
3.3.	Resorbierbare Materialien.....	9
3.3.1.	Polymere	10
3.3.2.	Magnesium und seine Legierungen	11
4.	<i>In vivo</i> Studien zu Magnesiumimplantaten	12
5.	Beschichtung und Oberflächenbehandlung von Magnesium	15
6.	Untersuchungsmethoden von Knochenimplantaten und Knochenersatzstoffen.....	16
6.1.	Mikrocomputertomographische Untersuchungen.....	16
6.2.	Histologische Untersuchungen	17
6.3.	REM/EDX-Analysen	19
III.	PUBLIKATIONEN.....	20
1.	Publikation I.....	20
2.	Publikation II	30
3.	Fachkongresse	64
IV.	DISKUSSION.....	65

V.	ZUSAMMENFASSUNG	76
VI.	SUMMARY	78
VII.	LITERATURVERZEICHNIS.....	80
VIII.	DANKSAGUNG.....	99

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

3D	dreidimensional
Al	Aluminium
AX30	Magnesiumlegierung mit 3 Ma.-% Aluminium, 1 Ma.-% Calcium
AZ31	Magnesiumlegierung mit 3 Ma.-% Aluminium, 1 Ma.-% Zink
AZ91	Magnesiumlegierung mit 9 Ma.-% Aluminium, 1 Ma.-% Zink
CaP	Calciumphosphat
EDX	Energiedispersive Röntgenspektroskopie
<i>et al.</i>	<i>et alteri</i> (lat.: und andere)
FBC	Fremdkörperriesenzellen
GPa	Gigapascal
HF	Fluorwasserstoffsäure
La	Lanthan
La2	Magnesiumscaffold mit 2 Ma.-% Lanthan
LAE442	Magnesiumlegierung und -scaffold mit 4 Ma.-% Lithium, 4 Ma.-% Aluminium und 2 Ma.-% Seltenen Erden
Li	Lithium
Ma.-%	Gewichtsprozent
MAO	Mikroarc-Oxidation
Mg-La2	Magnesiumlegierung mit 2 Ma.-% Lanthan
Mg(OH) ₂	Magnesiumhydroxid
MgCa0,8	Magnesiumlegierung mit 0,8 Ma.-% Calcium
MgF ₂	Magnesiumfluorid
μCT	Mikro-Computertomographie
REM	Rasterelektronenmikroskopie
ROI	Region of interest = Bereich von Interesse
SE	Seltene Erden
TCP	beta-Tricalciumphosphat
WE43	Magnesiumlegierung mit 4 Ma.-% Yttrium und 3 Ma.-% SE

WZ21	Magnesiumlegierung mit 2 Ma.-% Yttrium, 1 Ma.-% Zink, 0,25 Ma.-% Calcium und 0,15 Ma.-% Mangan
ZX50	Magnesiumlegierung mit 5 Ma.-% Zink, 0,25 Ma.-% Calcium und 0,15 Ma.-% Mangan

I. EINLEITUNG

Knochendefekte treten relativ häufig auf und können durch traumatische, metabolische oder tumoröse Veränderungen hervorgerufen werden (Nuss und von Rechenberg 2008, Pawelec 2019, Rey-Vinolas *et al.* 2019). Dabei stellen vor allem Critical Size Defekte das Gesundheitssystem auf die Probe, da diese immer einer Behandlung mittels autologem Knochenmaterial und/oder einer Stabilisation mittels Osteosynthese bedürfen (Dadsetan *et al.* 2015, Schemitsch 2017). Bisweilen gibt es keine allgemeingültige Definition von Critical Size Defekten, jedoch scheinen Defekte mit einer Größe von 2,5 cm oder mehr einen schlechten natürlichen Heilungsverlauf zu haben (Schemitsch 2017).

Autologes Knochenmaterial ist bisweilen der Goldstandard zur Auffüllung und Behandlung solcher Defekte. Dabei ist jedoch die Verfügbarkeit beschränkt und es besteht die Notwendigkeit eines zusätzlichen Eingriffs zur Gewinnung des Knochengewebes (Pawelec 2019). Bei der Verwendung von konventionellen Implantaten aus Stahl und Titan zur Defektstabilisierung sollten diese nach der Defektheilung meist in einem zweiten operativen Eingriff entfernt werden, da es sonst zu Infektionen oder zu einem Knochenabbau kommen kann (Hofmann 1995, Merolli 2019, Pawelec 2019). Zudem kommt es häufig bei der Verwendung von Implantaten aus Titan und Stahl zu dem sogenannten „Stress Shielding“, welches durch unterschiedliche Elastizitätsmodule (Steifigkeit) des Implantatmaterials und des Knochens hervorgerufen wird und zu einem Implantatversagen oder einer Refrakurierung führen kann (Nagels *et al.* 2003, Merolli 2019). Um die genannten Risiken und die Belastungen für den Patienten sowie die Kosten, die durch die zusätzlichen Eingriffe entstehen, zu verringern, wird seit vielen Jahren an geeigneten, resorbierbaren Knochenersatzstoffen und -implantaten geforscht (Pawelec 2019).

Hierbei werden Keramiken, Polymere und resorbierbare Metalle, wie Magnesium, aufgrund ihrer jeweiligen Eigenschaften auf verschiedene Einsatzmöglichkeiten hin untersucht. Einige Polymere und Keramiken finden bereits als Knochenersatzstoff für auffüllende Zwecke Anwendung. Jedoch sind die mechanischen Eigenschaften dieser Materialien nicht ausreichend, um sie in belasteten Knochendefekten einzusetzen (Merolli 2019).

Resorbierbare Knochenersatzstoffe zur Behandlung von großen, belasteten

Knochendefekten sollten eine der Knochenheilung angepasste Degradationsgeschwindigkeit aufweisen und während des gesamten Umbauprozesses über eine ausreichende Stabilität verfügen (van der Elst *et al.* 2000, Merolli 2019). Essentielle Eigenschaften sind auch eine hohe Biokompatibilität mit einem komplikationslosen Abbau und einer guten Ausscheidung der Abbauprodukte aus dem Körper (Hofmann 1995, van der Elst *et al.* 2000, Nuss und von Rechenberg 2008).

Um die Osseointegration von Implantaten zu erhöhen und das Einwachsen von Knochen zu ermöglichen, werden vermehrt poröse Strukturen untersucht (Karageorgiou und Kaplan 2005, Yazdimamaghani *et al.* 2017). Dabei sind bestimmte strukturelle Eigenschaften wie eine hohe Porosität, eine geeignete Porengröße und interkonnektierende Poren von besonderer Wichtigkeit (Klenke *et al.* 2008, Mavrogenis *et al.* 2009). Die Poren haben einen großen Einfluss auf das Einwandern und Einwachsen von Zellen und Blutgefäßen sowie auf die Sicherstellung einer nutritiven Versorgung des einwachsenden Gewebes. Im Hinblick auf eine erfolgreiche Osseointegration erwiesen sich Makroporen mit einer Größe zwischen 150 und 500 μm als besonders vorteilhaft (Karageorgiou und Kaplan 2005, von Doernberg *et al.* 2006).

Das resorbierbare Metall Magnesium zeichnet sich durch seine positiven, mechanischen Eigenschaften für die Anwendung als Knochenersatzstoff aus. Dazu zählen eine günstige Zug- und Druckfestigkeit sowie ein ähnliches Elastizitätsmodul im Vergleich zu Knochen (Nagels *et al.* 2003, Staiger *et al.* 2006). In wässriger Lösung weist Magnesium allerdings eine schnelle Korrosion mit Verlust seiner mechanischen Eigenschaften auf und es kommt zur Bildung von Wasserstoffgas (Song und Atrens 2003, Witte *et al.* 2005).

Um diese Nachteile auszugleichen, wird die Widerstandfähigkeit von Magnesium durch die Herstellung von Legierungen verbessert. Vor allem die Elemente Aluminium (Al), Lithium (Li) und die Verwendung von seltene Erden (SE) weisen dabei in vielen Studien einen korrosionsverzögernden Effekt auf (Witte *et al.* 2008, Willbold *et al.* 2015, Angrisani *et al.* 2016). Durch Beschichtungen oder Oberflächenbehandlungen der Magnesiumimplantate kann ein zusätzlicher Korrosionsschutz erreicht werden (Fischerauer *et al.* 2013, Lalk *et al.* 2013). Abhängig von der jeweiligen Behandlung kann dabei auch eine Verbesserung der Biokompatibilität und der Integration in das umliegende Gewebe erreicht werden (Wang *et al.* 2012).

Die Magnesiumlegierung LAE442 mit den Legierungselementen Li, Al und SE hat sich in vielen *in vivo* Studien in Form von intramedullären Pins, zylindrischen Vollkörpern und Schrauben-Plattensystemen als widerstandsfähig und biokompatibel erwiesen (Krause *et al.* 2010, Rossig *et al.* 2015, Wolters *et al.* 2015, Angrisani *et al.* 2016). Die binäre Legierung Mg-La₂ hingegen wurde bisher nur *in vitro* getestet und weist mit nur zwei Komponenten (Magnesium und Lanthan [La]) eine verbesserte Reproduzierbarkeit auf. Zusätzlich zeigte die Legierung Mg-La₂ eine gute Zellverträglichkeit und gute Materialeigenschaften für eine Untersuchung *in vivo* (Weizbauer *et al.* 2014).

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, das Degradationsverhalten, die Osseointegration und die Biokompatibilität von MgF₂-beschichteten Scaffolds aus den Magnesiumlegierungen LAE442 und La₂ mit definierten, interkonnektierenden Poren im Kaninchenmodell vergleichend zu untersuchen. Ein weiteres Ziel war es anhand der Ergebnisse dieser Arbeit eine geeignete Magnesiumlegierung für weitere Untersuchungen im gewichtstragenden Knochen auszuwählen, um das Problem von belasteten Critical Size Defekten zu adressieren.

II. LITERATURÜBERSICHT

1. Knochen

Knochen gehören zum Skelettsystem und stellen gemeinsam mit Knorpel, Bändern und Gelenken den passiven Bewegungsapparat dar (Nickel *et al.* 2004). Als Ansatzstelle für die Sehnen der Muskulatur ermöglichen sie eine aktive Bewegungsfunktion. Zusätzlich kommt dem Knochengewebe eine Schutzfunktion von inneren Organen, Weichteilgewebe und blutbildendem Knochenmark zu. Zudem reguliert der Knochen als Speicherorgan den Mineralhaushalts von Calcium und Phosphat (König und Liebich 2019).

1.1. Aufbau und Physiologie von Röhrenknochen

Der Röhrenknochen setzt sich zum einen aus dem Mittelstück, der Diaphyse zusammen, welche aus einem dichten Knochenmantel, der „*Substantia compacta*“, besteht und die Markhöhle einschließt. Zum anderen schließt sich an beiden Enden die Epiphyse an, die sich aus einer dünneren äußeren Knochenschicht, „*Substantia corticalis*“, und einer Schwammstruktur im Inneren, „*Substantia spongiosa*“, zusammensetzt (Nickel *et al.* 2004). Die innere und äußere Oberfläche des Knochens wird durch eine bindegewebsartige Schicht ausgekleidet, dem Endost bzw. Periost (König und Liebich 2019).

Der Knochen besteht aus Zellen und einer mineralisierten Interzellulärsubstanz, wobei er aus etwa 8% Wasser und 92% Trockensubstanz besteht (von Engelhardt *et al.* 2015). Die Knochentrockenmasse enthält etwa ein Drittel organische Grundsubstanz, die aus Kollagen Typ 1 (90%) und Lipiden aufgebaut ist (Welsch *et al.* 2018). Anorganisches Material macht die restlichen zwei Drittel der Trockenmasse aus und setzt sich aus etwa 85% Calciumphosphat, 10% Calciumkarbonat, Magnesiumphosphat und Spurenelementen zusammen (Sinowatz und Hees 2012).

1.2. Knochenbildung und -umbau

Die Knochenbildung, auch Ossifikation genannt, erfolgt im Rahmen des Knochenwachstums oder aufgrund von Frakturen und anderen pathologischen Prozessen (von Engelhardt *et al.* 2015). Dabei lässt sich die Ossifikation in zwei Formen unterteilen: die desmale/direkte und die chondrale/indirekte Ossifikation.

Bei der desmalen Ossifikation differenzieren sich knochenbildende Osteoblasten direkt aus Mesenchymalzellen und produzieren eine organische, unverkalkte Knochengrundsubstanz, das sogenannte Osteoid. In diese Knochengrundsubstanz, die überwiegend aus Kollagen Typ I besteht, bauen sich die Osteoblasten ein und wandeln sich während der Mineralisation zu Osteozyten um. Bei der Mineralisation kommt es zur Einlagerung von Calcium-Phosphat-Verbindungen in das Osteoid, wodurch das verkalkte Ossein entsteht (König und Liebich 2019). Bei der chondralen Ossifikation dient hyaliner Knorpel als Platzhalter und wird durch Knochengewebe ersetzt (König und Liebich 2019).

Der Knochenumbau lässt sich in zwei verschiedene Mechanismen unterteilen: das „Remodeling“ und das „Modeling“. Bei dem „Remodeling“ handelt es sich um einen zyklischen, koordinierten Prozess, bei dem Knochen an einer bestimmten Stelle durch Osteoklasten abgebaut und anschließend durch Osteoblasten wieder aufgebaut wird (von Engelhardt *et al.* 2015). Dadurch kommt es zu einem Materialaustausch bzw. -erneuerung, der im Idealfall ausgeglichen ist. Im Gegensatz dazu handelt es sich beim „Modeling“ um einen dynamischen Adaptionsvorgang, bei dem es zum Umbau von Knochen kommt (von Engelhardt *et al.* 2015). Dabei kann es zum Wachstum des Knochens durch Zunahme von Knochenmasse oder zur Anpassung der Knochenstruktur an veränderte, mechanische Belastungen kommen. Auch bei der natürlichen Frakturheilung kommt es zu Umbauprozessen, bis die ursprüngliche Kontur des Knochens wiederhergestellt ist (Lüllmann-Rauch und Asan 2015).

1.3. Frakturheilung

Nach einer Fraktur des Knochens kommt es durch einen komplexen Reparaturvorgang zur Überbrückung der Bruchspalte (Salomon *et al.* 2015). Die Art der Frakturheilung ist dabei vor allem von der Größe der Bruchspalte, der Stellung der Frakturrenden zueinander und der mechanischen Stabilität abhängig (Welsch *et al.* 2018). Durch Osteosynthese kann eine primäre Frakturheilung erreicht werden. Hierbei werden die Frakturrenden direkt adaptiert ($< 0,5$ mm) und stabil miteinander fixiert. Über Kontakt- oder Spaltheilung kann umgehend Lamellenknochen entstehen (Salomon *et al.* 2015). Im Gegensatz dazu kommt es bei der natürlichen, sekundären Frakturheilung zu einem Frakturhämatom, welches sich nach 1 – 2 Wochen zu Granulationsgewebe mit vielen Makrophagen und Fibroblasten organisiert. Anschließend werden die Frakturrenden durch den

sogenannten „Knorpelkallus“, bestehend aus Bindegewebe und Knorpel, verbunden. Nach etwa 4 – 6 Wochen wird dieser durch Geflechtknochen (Knochenkallus) ersetzt, welcher sich anschließend über Monate hinweg zu Lamellenknochen umbaut (Salomon *et al.* 2015, Welsch *et al.* 2018).

Bei starker Instabilität und Einwirkung von Schubkräften kann es zu einer Störung der Knochenbildung kommen, sodass eine knöcherne Überbrückung verhindert wird. Anstelle von Knochen bildet sich straffes Bindegewebe und es entstehen Pseudarthrosen (Lüllmann-Rauch und Asan 2015, Welsch *et al.* 2018). Diese sogenannten Nonunions können nicht nur durch eine biomechanische Instabilität ausgelöst werden, sondern entstehen auch bei einer Beeinträchtigung der zellulären und molekularen Signalübertragung. Dabei treten diese im Vergleich zu Critical Size Defekten oft auch ohne Knochenspalt auf. Im Gegensatz dazu liegt bei Critical Size Defekten meist eine adäquate Biologie zur Knochenheilung vor. Es besteht jedoch eine Unfähigkeit, den substanziellen Knochenverlust zu überbrücken, sodass sich wiederum Nonunions entwickeln können (Gómez-Barrena *et al.* 2015, Schemitsch 2017).

2. Knochenimplantate und Knochenersatzstoffe

Implantatmaterialien, die am oder im Knochen Einsatz finden, benötigen bestimmte und kontrollierbare Eigenschaften, die optimal an die jeweilige Anwendung angepasst sein müssen. Dabei steht für Materialien, welche in stark lasttragenden Bereichen eingesetzt werden sollen, die mechanische Stabilität besonders im Vordergrund. Wohingegen in kleinen Knochendefekten, in erster Linie die Zusammensetzung und die Struktur des Knochenimplantates zur Induktion von Knochenneubildung von Bedeutung sind. Die richtige Auswahl eines Knochenimplantates ist von vielen Faktoren abhängig, die zum Teil im Widerspruch zueinander stehen können und somit einer Kompromissfindung unterliegen (Pawelec *et al.* 2019).

2.1. Mechanische und physiologische Eigenschaften

Die Eigenschaften von Knochenimplantaten werden hauptsächlich durch das Grundmaterial bestimmt und können durch Änderungen in der Zusammensetzung, der Mikrostruktur und im Herstellungsprozess angepasst werden. Besonders die Interaktion von mechanischen, mikrostrukturellen und physiologischen Eigenschaften ist ausschlaggebend für die jeweiligen Anwendungen. Zu den

mechanischen Eigenschaften zählen Zug-, Biege- und Druckfestigkeit sowie Elastizitätsmodul (Young's modulus), Duktilität und Härte eines Materials (Pawelec *et al.* 2019). Der Aufbau und die Mikrostruktur eines Materials können die mechanischen Eigenschaften sowie die Interaktion des Materials mit dem Wirtsgewebe stark beeinflussen. Dabei haben vor allem die Porosität, die Porengröße, die Korngröße und die Phasenverteilung einen Einfluss auf die Materialeigenschaften (Pawelec *et al.* 2019). Des Weiteren sind Knochenersatzstoffe verschiedenen, physiologischen Einflüssen ausgesetzt. Darunter zählen beispielsweise die Interaktion mit Körperflüssigkeiten, Zellen und Gewebe sowie Änderungen im pH-Wert und Einwirkung des Immunsystems. Aufgrund dieser Einflüsse kommt es zu verschiedenen Reaktionen des Materials, wie Korrosion, Auflösung und Degradation (Pawelec *et al.* 2019). Somit bedingt eine Veränderung in der Mechanik, der Zusammensetzung oder des Aufbaues eines Materials meist auch eine Änderung in einer der anderen Kategorien.

3. Implantatmaterialien

3.1. Nicht resorbierbare Materialien

Bei der chirurgischen Versorgung von Knochenfrakturen kommen vor allem rostfreier Stahl und Titan als metallische, nicht resorbierbare Osteosynthesematerialien zum Einsatz (Gonzalez-Carrasco *et al.* 2019). Aufgrund ihrer hohen mechanischen Stabilität und ihrer Bruchfestigkeit, eignen sie sich optimal für die Anwendung bei lasttragenden Knochendefekten und zur Frakturversorgung. Jedoch ist als negativer Effekt der hohe Elastizitätsmodul dieser Metalle (Stahl ca. 190 - 200 GPa, Titan ca. 105 GPa) im Vergleich zum Knochen zu nennen, der zu dem sogenannten „Stress Shielding“ führen kann (Gonzalez-Carrasco *et al.* 2019). Daraus folgend kann es zu einer Schwächung des Knochens, einer Lockerung der Implantate und einer Verzögerung der Knochenheilung kommen (Nagels *et al.* 2003). Des Weiteren sind die Risiken und Kosten, die mit einer Zweitoperation zur Entfernung der nicht resorbierbaren Implantate verbunden sind, nicht unerheblich (Pawelec 2019).

3.1.1. Stahl

Rostfreier Stahl findet seit 1930 Anwendung und macht etwa 90% der Osteosyntheseimplantate in der Humanmedizin aus (Gonzalez-Carrasco *et al.*

2019). Mit seiner guten mechanischen Stabilität, seiner angemessenen Biokompatibilität und seiner vergleichsweise günstigen Herstellung findet Stahl auch im Bereich der Veterinärmedizin Anwendung (Bonath und Prieur 1998).

3.1.2. Titan und Titanverbindungen

Titanverbindungen werden erst seit den 60er Jahren als Implantatmaterialien eingesetzt und finden vor allem als humanmedizinische Implantate ihre Anwendung (Gonzalez-Carrasco *et al.* 2019). Im Gegensatz zu rostfreiem Stahl ist Titan zwar kostenintensiver, weist jedoch ein reduziertes allergenes Potential und ein geringes Gewicht auf (Hayes und Richards 2010, Gonzalez-Carrasco *et al.* 2019). Des Weiteren zeigt es eine sehr gute Kombination aus Korrosionsresistenz, exzellenter Biokompatibilität und Osseointegration (Heyland *et al.* 2017).

3.1.3. Kobaltverbindungen

Implantate aus Kobaltverbindungen werden aufgrund ihrer außerordentlichen mechanischen Festigkeit und ihrer Verschleißbeständigkeit vor allem in schwer gewichtstragenden Gelenken eingesetzt. Über viele Jahrzehnte fanden sie auch Anwendung im Bereich der Zahnmedizin (Gonzalez-Carrasco *et al.* 2019).

3.2. Biokeramiken

Keramiken stellen eine große anorganische/nichtmetallische Materialgruppe mit einer Kombination aus ionischen und kovalenten Bindungen dar, welche als vielseitiges Biomaterial in der biomedizinischen Technik eingesetzt wird (Nuss *et al.* 2006, Rahaman *et al.* 2007). Biokeramiken weisen aufgrund ihrer Zusammensetzungen und verwendeten Herstellungsmethode ein breites Spektrum an Eigenschaften auf. Anhand dieser Merkmale und je nach Interaktion mit dem lebenden Organismus lassen sich Biokeramiken in drei Kategorien einteilen: „bioinerte“, „bioaktive“ und „bioresorbierbare“ Keramiken (Vallet-Regí und Salinas 2019). Zu den „bioinerten“ Keramiken zählen Aluminiumoxide und Zirconiumoxide, die hauptsächlich in der Orthopädie und der Zahnmedizin für spezielle klinische Anwendungen wie totale Hüftarthroplastiken eingesetzt werden (Kaur *et al.* 2019, Vallet-Regí und Salinas 2019). Dabei zeigen diese beiden Keramiken eine gute Verschleißbeständigkeit, eine hohe Festigkeit und eine ausgezeichnete Korrosionsbeständigkeit (Kaur *et al.* 2019). Allerdings interagieren „bioinerte“ Keramiken nahezu nicht mit dem umliegend Gewebe, sodass es zu einer

fortschreitenden Entwicklung einer nicht anhaftenden faserigen Kapsel kommt (Hench 1991). Im Gegensatz dazu können „bioaktive“ Keramiken eine Apatitschicht ausbilden, die sich als anhaftende Grenzflächenverbindung zum umliegenden Gewebe darstellt und erheblichen mechanischen Belastungen widerstehen kann (Hench 1991, Vallet-Regí und Salinas 2019). Zu „bioaktiven“ Keramiken gehören Hydroxyapatit, bioaktive Gläser und Glaskeramiken, die unter anderem als knochengewebsaufbauendes Material, Knochenzement oder als Beschichtung von metallischen Implantaten klinische Anwendung finden. „Bioresorbierbare“ Keramiken haben die Aufgabe bestimmte Funktionen im Gewebe für einen gewissen Zeitraum zu übernehmen, um sich anschließend vollständig abzubauen. Dies stellt jedoch meistens eine Herausforderung dar, da sich das Material meist schneller resorbiert, als sich neues Gewebe aufbauen kann (Vallet-Regí und Salinas 2019). Ein Großteil der „bioaktiven“ und „bioresorbierbaren“ Keramiken, die als Knochenersatzstoffe verwendet werden, basieren auf Calciumphosphaten wie Hydroxyapatit, beta (β)- und α -Tricalciumphosphat (Dorozhkin 2010, Vallet-Regí und Salinas 2019). Dabei weisen Calciumphosphate chemische Ähnlichkeit mit der mineralischen Komponente von Knochen und eine gute Biokompatibilität auf. Zudem wirken Calciumphosphate als Gerüst für die Knochenneubildung osteokonduktiv und unterstützen die Adhäsion und Proliferation von Osteoblasten (Anselme 2000, Dorozhkin 2010). Jedoch besitzen Calciumphosphate ungeeignete mechanische Eigenschaften, um als gewichtstragende Knochenersatzstoffe eingesetzt zu werden, sodass diese hauptsächlich zur Auffüllung von kleineren Defekten oder als Beschichtung eingesetzt werden (Dorozhkin 2010, Gruber 2017). In diversen klinischen Studien findet β -Tricalciumphosphat bereits Anwendung in der Dental-, Kiefer- und Gesichtschirurgie sowie der orthopädischen Chirurgie (Zijderveld *et al.* 2005, Horch *et al.* 2006, Gruber 2017).

3.3. Resorbierbare Materialien

Um die Risiken und Kosten einer Zweitoperation zu verringern, wird seit vielen Jahren an geeigneten resorbierbaren Knochenersatzstoffen und -implantaten geforscht (Kraus *et al.* 2014, Merolli 2019). Dabei sollten diese über eine hohe Biokompatibilität verfügen und eine der Knochenheilung angepasste Degradationsgeschwindigkeit aufweisen. Bei belasteten Knochendefekten müssen resorbierbare Materialien über eine ausreichende und angepasste Stabilität

verfügen, um eine allmähliche Belastungsübertragung auf das heilende Knochengewebe zu ermöglichen (van der Elst *et al.* 2000). Zusätzlich ist eine komplikationslose Ausscheidung von Abbauprodukten aus dem Körper notwendig. Materialien wie Polymere, geeignete Keramiken und Magnesiumverbindungen werden für die Anwendung als resorbierbare Implantate auf diese Eigenschaften hin untersucht (Merolli 2019).

3.3.1. Polymere

Polymere stellen die größte Klasse von Biomaterialien dar und weisen ein weites Anwendungsgebiet auf. Bei Polymeren handelt es sich um langkettige Moleküle, die aus vielen kleinen, sich wiederholenden Einheiten zusammengesetzt sind. Sie lassen sich in resorbierbare und nicht resorbierbare Polymere einteilen (Nuss und von Rechenberg 2008).

Polymethylmethacrylat ist derzeit das wichtigste Polymer in der Orthopädie und wird als nicht abbaubarer Knochenzement zur Verankerung von Gelenkprothesen verwendet (Nuss und von Rechenberg 2008, Rey-Vinolas *et al.* 2019).

Resorbierbare Polymere können vom Körper abgebaut werden, nachdem ihre Funktion erfüllt ist. Um Probleme wie das Austreten toxischer Substanzen aus dem Implantat oder potentielle Toxizität der Abbauprodukte zu vermeiden, ist daher eine besonders gute Biokompatibilität notwendig (Rey-Vinolas *et al.* 2019). Zu den synthetischen Polymeren zählen Polyglykolsäure, Poly-L-Lactidsäure und deren Copolymer, die aus aliphatischen Polyestern bestehen. Sie finden vor allem als resorbierbares Nahtmaterial Anwendung und wurden mit einigem Erfolg auch als selbstverstärkende Schrauben, Stäbe und Abstandshalter eingesetzt (Sutherland und Bostrom 2005, Rey-Vinolas *et al.* 2019).

Natürliche Polymere werden seit einigen Jahren vermehrt für den Einsatz als bioaktive und resorbierbare Biomaterialien untersucht, da diese auf zellulärer Ebene die Regeneration des Gewebes induzieren (Nair und Laurencin 2007). Aus natürlichen Polymeren wie Kollagen, Gelatine, Seide, Alginate und Cellulose können Hydrogele, Scaffolds und Mikro-/Nanosphären hergestellt werden. Hydrogele können in einen Defekt injiziert werden, nehmen dort große Mengen an Wasser auf und dienen der Auffüllung eines Defekts oder geben sukzessive Medikamente oder Wachstumsfaktoren ab (Rodríguez *et al.* 2019). Die Oberfläche von Scaffolds aus natürlichen Polymeren eignet sich hervorragend für das Zellwachstum, jedoch weisen diese Scaffolds nur schwache mechanische

Eigenschaften auf. Scaffolds aus synthetischen Polymeren hingegen lassen sich gut zu belastbaren Scaffolds formen, wobei ihre Fähigkeit zur Interaktion mit dem umliegenden Gewebe reduziert ist (Chen und Kawazoe 2018). Aus diesem Grund wurden Hybridscaffolds entwickelt, die aus einem porösen synthetischen Polymergerüst bestehen, welches mit natürlich gewonnenen Polymeren an der Oberfläche versetzt wird. Dabei wird mit dem synthetischen Polymergerüst eine höhere Stabilität erreicht und das oberflächliche, natürliche Polymere interagiert mit dem umliegenden Gewebe (Dai *et al.* 2010). Zusätzlich können osteoinduktive Wachstumsfaktoren wie das knochenmorphogenetische Protein, welches die Knochenregeneration fördert, in diese Hybridscaffolds eingebracht werden (Lu *et al.* 2012). Jedoch kann vor allem bei natürlichen Polymeren aufgrund ihrer immunogenen Aktivität eine Fremdkörperreaktionen auslöst werden (Santavirta *et al.* 1990, Weiler *et al.* 1998).

3.3.2. Magnesium und seine Legierungen

Das resorbierbare Metall Magnesium (Mg) ist ein essentielles Element im Körper. Es ist an den meisten metabolischen und enzymatischen Reaktionen im Organismus beteiligt und dient als Cofaktor für etwa 300 Enzyme (Hartwig 2001, de Baaij *et al.* 2015). Der Hauptanteil von Magnesium im Körper (etwa 60%) wird im Knochen eingelagert (Vormann 2003). Der restliche Anteil wird in verschiedenen Organen gespeichert - nur eine geringe Menge (etwa 1%) befindet sich im Blutplasma. Die Hauptausscheidung von Magnesium erfolgt über die Nieren (Van Laecke 2019).

Als Werkstoff zeichnet sich Magnesium durch günstige Zug- und Druckfestigkeit aus und hat als Leichtmetall eine geringere Dichte ($1,7 - 2,0 \text{ g/cm}^3$) im Vergleich zu anderen Metallen (Gonzalez-Carrasco *et al.* 2019). Des Weiteren weist Magnesium (45 GPa) einen ähnlichen Elastizitätsmodul wie kortikaler Knochen (7 – 30 GPa) auf, wodurch die Gefahr von „Stress shielding“ gesenkt wird (Gonzalez-Carrasco *et al.* 2019).

Allerdings zeigt reines Magnesium in wässriger Lösung eine schnelle Korrosion mit Verlust seiner mechanischen Eigenschaften auf. Bei diesem Korrosionsprozess kommt es zusätzlich zu einer Bildung von gasförmigem Wasserstoff, wodurch es zu einer subkutanen Ansammlung von Gas kommen kann. Dabei lautet die Gesamtreaktionsgleichung: $\text{Mg} + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{Mg}(\text{OH})_2 + \text{H}_2$ (Song und Atrens 2003) Durch die Herstellung von Magnesiumlegierungen, können diese Nachteile reduziert und die Widerstandsfähigkeit verbessert werden. Dabei finden als

Legierungselement vor allem Aluminium (Al), Lithium (Li), Zink, Calcium und seltene Erden (SE) Einsatz und wiesen bereits in vielen Studien einen korrosionsverzögernden Effekt im Vergleich zu Implantaten aus reinem Magnesium auf (Witte *et al.* 2005, Erdmann *et al.* 2010, Willbold *et al.* 2015, Angrisani *et al.* 2016). Aluminium wurde mit unterschiedlichem Gehalt (1 – 9 Ma.-%) in vielen Magnesiumlegierungen wie AZ31 (3 Ma.-% Aluminium, 1 Ma.-% Zink), AZ91 (9 Ma.-% Aluminium, 1 Ma.-% Zink), LAE442 (4 Ma.-% Lithium, 4 Ma.-% Aluminium und 2 Ma.-% Seltenen Erden) untersucht (Witte *et al.* 2005) und kann die Festigkeit der Legierung, sowohl in Druck- als auch in Zugrichtung erhöhen (Friedrich und Mordike 2006). Durch den Zusatz von Lithium kann die Duktilität von Magnesiumlegierungen verbessert werden (Kaese 2002). Ähnlich wie Magnesium sind Calcium und Zink essentielle Elemente im menschlichen Körper und haben zusätzlich eine festigende Wirkung als Legierungselement (Song 2007). Häufig werden seltene Erden in Legierungen eingesetzt, wodurch eine erhöhte Implantatstabilität erreicht wird (Willbold *et al.* 2015). Als Mischmetall variieren SE je nach ihrer Herkunft in ihrer Zusammensetzung, wobei sie gewöhnlich reich an Cerium, Lanthan und Neodym sind (Witte *et al.* 2007). Die Wirkung und Toxizität von seltenen Erden auf den Knochen ist noch nicht abschließend geklärt und wird kontrovers diskutiert (Willbold *et al.* 2015). Sie scheinen jedoch in geringen Mengen für den menschlichen Körper tolerierbar zu sein (Song 2007). Die Magnesiumlegierung LAE442 mit Li, Al und SE zeigte in vielen *in vivo* Studien eine gute Biokompatibilität mit langsamem und homogenem Abbau (Krause *et al.* 2010, Witte *et al.* 2010, Angrisani *et al.* 2016). Um die Reproduzierbarkeit zu erhöhen, wurde bei der Legierung LANd442 das Gemisch aus seltenen Erden durch reines Neodym ersetzt. Damit konnte jedoch weder die Biokompatibilität noch das Degradationsverhalten der Legierungen positiv beeinflusst werden. Es stellte sich im Gegenteil eine reduzierte klinische Toleranz und eine ungleichmäßige Korrosion der Legierung in den *in vivo* Untersuchungen dar (Angrisani *et al.* 2012). Legierungspartner beeinflussen damit nicht nur die Korrosion in unterschiedlichem Maße, sondern können auch die Festigkeit und Biokompatibilität von Magnesiumlegierungen stark verändern (Witte *et al.* 2005).

4. *In vivo* Studien zu Magnesiumimplantaten

Bereits zu Beginn des 20. Jahrhunderts wurden Magnesiumimplantate auf ihre klinische Anwendbarkeit hin untersucht (Rostock 1937). Im Jahre 1900 berichtete

Payr bei der Untersuchung von Magnesiumimplantaten für die Gefäßchirurgie über eine vollständige Auflösung des Metalls (Payr 1900). Lambotte (1932) setzte erstmals eine Magnesiumplatte mit Stahlnägeln zur Osteosynthese am Menschen ein. Durch die starke Kontaktkorrosion verloren diese jedoch schnell ihre Funktion. Insbesondere die starke Gasentwicklung von reinem Magnesium in seinen Untersuchungen sah er als kritisch an. McBride (1938) versuchte diese Korrosionsproblematik durch eine Magnesiumlegierung mit Anteilen von Aluminium (4 Ma.-%) und Mangan (0,3 Ma.-%) zu beheben. Dabei beschrieb er im klinischen Einsatz von Mg-Platten und Mg-Schrauben zur Fraktur stabilisierung ebenfalls eine schnelle Resorption und Gasentwicklung dieser Legierung sowie eine Stimulation der periostalen Proliferation (McBride 1938). Nebenwirkungen der Magnesiumimplantate auf systemischer Ebene konnten dabei nicht festgestellt werden (Lambotte 1932, McBride 1938). Aufgrund der Nachteile von Magnesium und der Entwicklung von Implantaten aus rostfreiem Stahl und Titan traten weitere Untersuchungen von Magnesiumimplantaten in den Hintergrund der Forschung. Anfang des 21. Jahrhunderts wurde die Forschung an Magnesiumlegierungen als Osteosynthesematerial wieder aufgenommen, um die Problematik von Revisionseingriffen zur Implantatentfernung zu adressieren.

Witte *et al.* (2005) untersuchte hierfür die Magnesiumlegierungen AZ31, AZ91, WE43 (4 Ma.-% Yttrium, 3 Ma.-% Seltene Erden) und LAE442. Diese wurden als Probenstäbe (1,5 mm x 20 mm) intramedullär in den Oberschenkelknochen von Meerschweinchen implantiert. Dabei traten subkutane Gasansammlungen auf, die bei den Legierungen WE43 und LAE442 deutlich geringer ausgeprägt waren (Switzer 2005, Witte *et al.* 2005). In der Arbeit von Krause (2008) wurden die Magnesiumlegierungen MgCa0,8 (0,8 Ma.-% Calcium), WE43 und LAE442 als intramedulläre Pins in der Kaninchen Tibia hinsichtlich der Biokompatibilität, der mechanischen Eigenschaften und des Degradationsverhaltens über sechs Monate untersucht. Eine Gasbildung konnte dabei in geringem Ausmaß nur mittels histologischen und μ CT-Untersuchungen nachgewiesen werden. Die schnellere Degradation der MgCa0,8- und WE43-Pins führte dabei zu stärkeren periostalen und endostalen Veränderungen in der Knochenstruktur. Die LAE442-Pins zeigten ein langsames und gleichmäßiges Abbauverhalten und wiesen damit eine bessere Biokompatibilität auf (Krause 2008, Krause *et al.* 2010). In einer zwölfmonatigen Studie von Thomann *et al.* (2009) wurden Pins aus LAE442 und MgCa0,8 im Kaninchenmodell in Bezug auf ihre mechanischen Eigenschaften, Degradation und

Knochen-Implantat-Kontakte evaluiert. Auch über diesen Zeitraum konnten für beide Pins keine klinische Unverträglichkeit beobachtet werden. Jedoch zeigten sich hinsichtlich des Degradationsverhaltens auch hier die LAE442-Pins gegenüber den MgCa0,8-Pins überlegen (Thomann *et al.* 2009). Zhang *et al.* (2008) untersuchte Implantate aus einer Magnesium-Mangan-Zink-Legierung (1 Ma.-% Zink, 0,8 Ma.-% Mangan) über einen Untersuchungszeitraum von 6 Monaten im Femur von Ratten. Dabei stellte er eine von der Lokalisation abhängige Degradation fest, die im Knochenmark im Vergleich zum kortikalen Knochen starker ausgeprägt war (Zhang *et al.* 2008). Bei den Untersuchungen von Kraus *et al.* (2012) wurden die Knochenreaktion der Magnesiumpins ZX50 (5 Ma.-% Zink, 0,25 Ma.-% Calcium, 0,15 Ma.-% Mangan) und WZ21 (2 Ma.-% Yttrium, 1 Ma.-% Zink, 0,25 Ma.-% Calcium, 0,15 Ma.-% Mangan) im Femur von Ratten beurteilt. Die ZX50-Pins wiesen einen schnellen Abbau mit einer großen Gasentwicklung auf und führten zu einer erheblichen Kallusbildung. Diese schädigte die Knochenfunktion jedoch nicht, sodass es zu einer schnellen Knochenregeneration nach dem vollständigen Abbau der ZX50-Pins kam. Die langsam abbauenden WZ21-Pins behielten hingegen ihre Integrität für mehr als 4 Wochen und zeigten gute osteokonduktive Eigenschaften (Kraus *et al.* 2012).

Lalk *et al.* (2013) untersuchte zylinderförmige AX30 Schwämme mit unterschiedlichen Beschichtungen auf deren Biokompatibilität, Degradation und Einwachsverhalten im Kaninchenmodell über einen Zeitraum von 24 Wochen. Die MgF₂- und CaP-beschichteten Schwämme wurden in den *Trochanter major* der Tiere eingesetzt. Die MgF₂-Schwämme zeigten eine deutlich bessere Integration in den Knochen. Insgesamt konnte ein deutlicher Einfluss der unterschiedlichen Beschichtungen auf die Degradation und die Biokompatibilität der AX30-Schwämme beobachtet werden (Lalk *et al.* 2013). Cheng *et al.* (2016) setzte offenporige Magnesiumzylinder mit zwei unterschiedlichen Porengrößen von 250 µm und 400 µm in den lateralen Epicondylus des Femurs von Kaninchen ein. Bei gleicher Porosität konnten die Scaffolds mit der größeren Porengröße die Vaskularisation und die Expression von Kollagen Typ 1 fördern, wodurch sich eine höhere Knochenmasse und mehr reifes Knochengewebe ausbildete (Cheng *et al.* 2016). In einer Langzeitstudie von Angrisani *et al.* (2016) wurden LAE442 Pins bezüglich ihres Degradationsfortschritts im Zeitraum von neun Monaten bis 3,5 Jahre nach der Implantation in die Kaninchentibia untersucht. Dabei zeigten die Pins eine gute Biokompatibilität und einen homogenen und langsamen Abbau über

den gesamten Untersuchungszeitraum. Eine Akkumulation von seltenen Erden in verschiedenen Organen konnte beobachtet werden, welche jedoch keine physiologischen oder toxikologischen Effekte zeigte (Angrisani *et al.* 2016).

5. Beschichtung und Oberflächenbehandlung von Magnesium

Mithilfe von Beschichtungen kann das Knochen-Implantat-Interface verändert und die Biokompatibilität verbessert werden (Castner und Ratner 2002, Agarwal *et al.* 2016). Weitaus wichtiger ist hingegen der korrosionsverzögernde Effekt, der durch Oberflächenbehandlung und Beschichtung von Magnesiumimplantaten erzielt werden kann (Julmi *et al.* 2019). Um einen möglichst hohen Korrosionsschutz zu erreichen, sollten die Beschichtungen dabei eine gleichmäßige und glatte Oberfläche ohne Poren aufweisen und dem Implantat gut anhaften (Zhang *et al.* 2005). Es wurden bereits verschiedenste Methoden von Oberflächenveränderungen wie Kalziumphosphatabscheidung, Polymer-Beschichtung, Mikroarc-Oxidation (MAO) oder Fluoridbehandlung erfolgreich auf ihren Korrosionsschutz von Magnesiumimplantaten hin untersucht (Yu *et al.* 2017).

Die MAO ist eine praktikable, elektrochemische Methode zur Herstellung einer Korrosionsschutzschicht mit metallurgischer Bindekraft auf Magnesiumimplantaten. Die Dicke und die Zusammensetzung der MAO-Beschichtungen kann durch die Geräteinstellung und das verwendete Elektrolytbad (z.B. Silikat oder Phosphat) bestimmt werden (Wu *et al.* 2019). In unterschiedlichen *in vitro* und *in vivo* Studien konnte mit dieser Methode eine Reduktion der Korrosion sowie eine verbesserte Biokompatibilität von Magnesiumimplantaten beobachtet werden (Gu *et al.* 2011, Chen *et al.* 2012, Wu *et al.* 2019).

Beschichtungen mit Magnesiumfluorid (MgF_2) zeigten *in vivo* eine gute klinische Toleranz und direkten Knochen-Implantat-Kontakt (Thomann *et al.* 2010, Lalk *et al.* 2013). Insbesondere in der initialen Phase des Abbaus von Magnesiumimplantaten kann eine MgF_2 -Beschichtung die schnelle Freisetzung von Mg^{2+} und H_2 sowie den raschen Anstieg des pH-Wertes reduzieren. Dadurch entsteht ein günstigeres Milieu an der Implantatoberfläche, welches die Zellanheftung und -proliferation fördert (Li *et al.* 2017, Yu *et al.* 2017). Zur Herstellung einer MgF_2 -Beschichtung werden die Implantate in einer Natriumhydroxid (NaOH)-Lösung gekocht, wodurch sich eine dichte und stabile Magnesiumhydroxidschicht auf der Oberfläche ausbildet (Julmi *et al.* 2019). Anschließend wird das Implantat mit Fluorwasserstoffsäure (HF) behandelt. Dabei kommt es zu einer

Austauschreaktion, bei der die Hydroxidschicht durch eine Fluoridschicht ersetzt wird (Witte *et al.* 2006). Mit einer verlängerten Eintauchzeit in HF kann bei Magnesiumimplantaten eine dickere Beschichtung erzielt werden, welche zu einem erhöhten Korrosionswiderstand führt (Trinidad *et al.* 2013). Bei der MgF₂-Beschichtung handelt es sich im Vergleich zur Mikroarc-Oxidation und vielen anderen Oberflächenbehandlungen um eine einfache und kostengünstige Methode, die auch für die industrielle Fertigung geeignet ist (Li *et al.* 2017).

6. Untersuchungsmethoden von Knochenimplantaten und Knochenersatzstoffen

6.1. Mikrocomputertomographische Untersuchungen

Die Mikrocomputertomographie (μ CT) ist ein schnelles, präzises, zerstörungsfreies und dreidimensionales Bildgebungsverfahren, welches zur Beurteilung von Knochenstrukturen insbesondere von spongiösem Knochen eingesetzt wird (Rüegsegger *et al.* 1996, Müller *et al.* 1998). Die Verfügbarkeit der μ CT-Bildgebung hat in den letzten Jahrzehnten stark zugenommen, da kommerziell erhältliche Scanner für *ex vivo* oder *in vivo* Untersuchungen entwickelt wurden (Clark und Badea 2014). Mit einer hohen Auflösung von bis zu 5 μ m können detaillierte Informationen über 3D-Konnektivität, Topologie und Mikroarchitektur von Knochenproben und von Knochen-Implantat-Verbunden erhoben werden, die der histologischen Untersuchung kaum mehr nachstehen (Delling *et al.* 1995, Holdsworth und Thornton 2002, Huehnerschulte *et al.* 2012). In diversen Studien konnte mittels μ CT die Osseointegration und die Degradation verschiedener Implantatmaterialien erfolgreich im Tiermodell untersucht werden (Thomann *et al.* 2009, Hampp *et al.* 2013, Angrisani *et al.* 2016). Allerdings limitiert die *in vivo* anwendbare Strahlendosis die μ CT-Untersuchung am lebenden Kleintiermodell, da sie mit einer geringeren Auflösung im Vergleich zu *in vitro* μ CT-Untersuchungen einhergeht (Holdsworth und Thornton 2002). Die Anfertigung eines μ CT-Scans beginnt mit einer Übersichtsaufnahme dem sogenannten „Scoutview“, in dem der Messbereich festgelegt wird. Anschließend wird die Messung nach automatischer Positionierung durchgeführt und die gemessenen Daten rekonstruiert (Rüegsegger *et al.* 1996).

Zur Auswertung der μ CT-Daten können quantitative Analysen durchgeführt werden, wobei die morphometrischen Parameter der Nomenklatur der 3D-

Histomorphometrie entsprechen (Parfitt *et al.* 1987, Dempster *et al.* 2013). Hierzu zählen beispielsweise das Knochenvolumen, das Verhältnis von Knochenvolumen zu Gesamtvolumen und die Trabekelanzahl und -dicke (Xu *et al.* 2018). Die Berechnung dieser Parameter erfolgt anhand der Grauwerte der einzelnen Voxel (Gitterpunkte in einem dreidimensionalen Gitter), die unter Verwendung eines Schwellenwertes (Threshold) segmentiert werden (Hara *et al.* 2002). Mit einem geeigneten Threshold können auch Volumen und Dichte von Implantatmaterialien ermittelt werden (Xu *et al.* 2018). Zusätzlich können deskriptive Analysen zur Beschreibung des Knochen-Implantat-Kontakts und des Trabekelnetzwerks sowie zur Beurteilung der Gasbildung bei Magnesiumimplantaten herangezogen werden (Thomann *et al.* 2009, Lalk *et al.* 2010, Angrisani *et al.* 2016).

Ein großer Vorteil der μ CT-Untersuchung ist, dass die untersuchten Proben nach dem Scannen unverändert vorliegen, sodass sie für weiterführende histologische Untersuchungen oder andere Tests zur Verfügung stehen (Rüegsegger *et al.* 1996). Zudem kann eine hohe Probenanzahl mit geringem Arbeitsaufwand im Vergleich zur Histologie untersucht werden, da die Proben nicht bearbeitet werden müssen (Wachter *et al.* 2001). Des Weiteren können mittels *in vivo* μ CT-Untersuchungen Verlaufskontrollen an dem selben Tier durchgeführt werden, wodurch die Zahl eingesetzter Versuchstiere reduziert werden kann (Klinck *et al.* 2008). Bisher ist es dennoch nicht möglich, mittels μ CT-Untersuchungen die Mikrostruktur von Knochen zu untersuchen oder Analysen auf zellulärer Ebene durchzuführen (Wachter *et al.* 2001), sodass eine histologische Evaluation von Implantaten weiterhin unerlässlich ist.

6.2. Histologische Untersuchungen

Die histologische Untersuchung gehört mit zu den wichtigsten Methoden für die Beurteilung der Biokompatibilität von Implantaten (Jansen *et al.* 1994). Dabei werden vor allem Parameter wie neu gebildeter Knochen und Osteoid, die Vaskularisation des einwachsenden Gewebes und die Ausbildung einer Bindegewebskapsel in die Beurteilung miteinbezogen. Darüber hinaus wird das Auftreten einer Entzündungsreaktion mit neutrophilen Granulozyten und Lymphozyten untersucht. Das Einsetzen von Knochenimplantaten kann mit einer Fremdkörperreaktion einhergehen, die sich insbesondere mit einer Ansammlung von Makrophagen und Fremdkörperriesenzellen (FBC) darstellt (Nuss und von Rechenberg 2008). Des Weiteren kann das Auftreten von nekrotischem Gewebe

untersucht werden (Erdmann *et al.* 2010, Lalk *et al.* 2013). Die Untersuchung von histologischen Proben kann mithilfe zweier Auswertungsverfahren erfolgen: der deskriptiven Histologie und der Histomorphometrie (An und Martin 2003).

Bei der deskriptiven Histologie findet die Beurteilung meist unter Verwendung eines semiquantitativen Scoringsystems statt (Hofmann *et al.* 2013, Han *et al.* 2018). Damit werden Parameter wie die Zellmorphologie und -struktur, die Struktur des Implantatmaterials sowie die Interaktion zwischen Implantat und Gewebe beurteilt. Bei der Evaluierung der Interaktion zwischen Implantat und Knochen steht besonders der Knochen-Implantat-Kontakt und die Art und Menge von nicht-kalzifiziertem Gewebe im Vordergrund. Aber auch auftretende Knochenresorption oder -neubildung sind wichtige Parameter, die evaluiert werden (An und Martin 2003). Als weiterer Parameter kann die Vaskularisation des einwachsenden Gewebes untersucht werden, da diese von entscheidender Bedeutung für den Prozess der Osseointegration ist (Mavrogenis *et al.* 2009, Hofmann *et al.* 2013).

Bei der histomorphometrischen Auswertung werden vor allem Messungen von Flächen, Längen und Abständen sowie die Messung der Anzahl bestimmter Gewebekomponenten durchgeführt (Parfitt *et al.* 1987). Zu den am häufigsten verwendeten Parametern gehören die Bestimmung des Knochen- und Gewebevolumentums sowie die Untersuchung der Knochen- und Osteoidoberfläche (Dempster *et al.* 2013). Des Weiteren können auch Messungen der Knochenimplantatkontakflächen durchgeführt werden (An und Martin 2003).

Bei der Herstellung von histologischen Präparaten unterscheidet man zwischen entkalkten und unentkalkten Knochenproben. Bei der Entkalkung von Knochenproben werden zunächst die Minerale herausgelöst und die Proben anschließend in Paraffin eingebettet. Für die Untersuchung von Knochenimplantaten und deren Interaktion mit dem Knochengewebe sind jedoch unentkalkte Knochenproben notwendig, die aufwendigeren Herstellungstechniken bedürfen (Lang 2012). Eine dieser Techniken ist die Trenn-Dünnschliff-Technik nach Donath, welche die Herstellung von 5 – 10 µm dünnen Schlifften ermöglicht. Damit können Knochenproben mit Keramik- oder Metallimplantaten und Zähne, die ansonsten nicht mit dem Mikrotom schneidbar wären, bearbeitet werden (Donath und Breuner 1982).

Die Knochenproben werden bei dieser Technik nach der Fixation schrittweise in Methylmetacrylat (MMA), ein Kunstharz, eingebettet. Anschließend wird der auspolymerisierte Kunststoffblock auf einem Objektträger fixiert, mit einer

Diamantbandsäge abgetrennt und geschliffen (Lang 2012).

Für die Färbung von Knochenproben stehen verschiedene Färbemethoden zur Verfügung: Hämatoxylin & Eosin, Masson-Goldner-Trichrom, von-Kossa, Giemsa oder Toluidinblau. Die Toluidinblau-Färbung ist einfach und standardisiert in der Durchführung und ermöglicht eine Differenzierung von Zellen und Gewebe durch metachromatische Farbeffekte in unterschiedlichen Blautönen (Lang 2012).

6.3. REM/EDX-Analysen

Die Rasterelektronenmikroskopie (REM) ist eine Methode zur hochauflösenden Abbildung von Probenoberflächen von medizinischen und biologischen Präparaten. Durch eine Elektronenquelle wird ein Primärelektronenstrahl erzeugt, der durch ein elektromagnetisches Linsensystem weiter verkleinert und auf der Probenoberfläche fokussiert wird (Schmidt 1994). Die dabei entstehenden Signale werden zur Bildentstehung genutzt und können von entsprechenden Detektoren registriert werden: Sekundärelektronen, Rückstreuelektronen und Röntgenstrahlung. Sekundärelektronen sind niederenergetische Elektronen, die aus der obersten Schicht der Probe stammen und damit die Topographie der Probe abbilden. Rückstreuelektronen sind höherenergetische Elektronen, wobei die Intensität des Signals von der Ordnungszahl der Elemente des untersuchten Probenbereichs abhängig ist und von Detektoren erkannt wird (Schmidt 1994). Dabei entsteht ein Bild aus Grautönen, bei dem sich schwere Elemente (z.B. Magnesium) heller und leichte Elemente (z.B. Kohlenstoff) hingegen dunkler darstellen. Die energiedispersive Röntgenspektroskopie (EDX) ist ein chemisches Analyseverfahren, welches verschiedene Elemente in einem bestimmten Probenbereich detektieren kann. Der Primärelektronenstrahl wirft beim Auftreffen auf ein Element charakteristische Röntgenstrahlung zurück, die von Detektoren registriert werden (Krefting 1994).

III. PUBLIKATIONEN

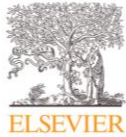
1. Publikation I

Das Paper “Comparison of degradation behaviour and osseointegration of the two magnesium scaffolds, LAE442 and La2, *in vivo*” von Kleer *et al.* wurde am 10. August 2019 zur Publikation im Journal Materialia akzeptiert und am 11. August 2019 online publiziert.

Comparison of degradation behaviour and osseointegration of the two magnesium scaffolds, LAE442 and La2, *in vivo*

N. Kleer, S. Julmi, A.-K. Gartzke, J. Augustin, F. Feichtner, A.-C. Waselau, C. Klose, H.J. Maier, P. Wriggers, A. Meyer-Lindenberg

MATERIALIA 2019; 8:100436



Contents lists available at ScienceDirect

Materialia

journal homepage: www.elsevier.com/locate/mtla

Full Length Article

Comparison of degradation behaviour and osseointegration of the two magnesium scaffolds, LAE442 and La2, in vivo

N. Kleer^a, S. Julmi^b, A.-K. Gartzke^c, J. Augustin^a, F. Feichtner^a, A.-C. Waselau^a, C. Klose^b, H.J. Maier^b, P. Wriggers^c, A. Meyer-Lindenberg^{a,*}

^a Clinic for Small Animal Surgery and Reproduction, Ludwig-Maximilians University, Munich, Germany

^b Institut für Werkstoffkunde (Materials Science), Leibniz Universität Hannover, Garbsen, Germany

^c Institute of Continuum Mechanics, Leibniz Universität Hannover, Hannover, Germany



ARTICLE INFO

Keywords:

Magnesium alloy
Porous scaffolds
Biodegradable implants
Osseointegration
Micro-tomography

ABSTRACT

Porous magnesium implants have been investigated for some time for their orthopaedic applicability as resorbable bone substitutes. The objective of this study was to evaluate the in vivo degradation behaviour and osseointegration of open-pored scaffolds made of the two magnesium alloys, LAE442 ($n = 40$) and Mg-La2 ($n = 40$). Cylindrical magnesium scaffolds (diameter 4 mm, length 5 mm) with defined interconnecting pore structure were produced by investment casting and coated with MgF_2 . Commercially available porous β -tricalcium phosphate scaffolds (TCP, $n = 40$) of the same dimensions served as control. The scaffolds were inserted in the cancellous part of the *greater trochanter of both femurs* in rabbits and evaluated over a period of 36 weeks using regular clinical, radiological and in vivo μ CT examinations. No clinical adverse reactions were observed in any of the scaffolds. The X-ray and μ CT image evaluation of La2 showed fast and inhomogeneous degradation behaviour with increased gas formation and a rapid loss of scaffold structure and shape from week 12 on. In comparison, the LAE442 scaffolds showed a slow, homogeneous degradation with low but continuous gas production over the entire study period. Furthermore, LAE442 scaffolds showed comparatively better osseointegration with more trabecular contacts than La2 scaffolds and retained their original scaffold structure. Although the TCP control group demonstrated the best osseointegration, it showed overly-rapid degradation. Based on the results of this study, the LAE442 scaffolds have promising properties for further investigations in weight-bearing bone defects.

1. Introduction

Impaired bone healing often occurs in large bone defects and must be treated by transplantation of autologous bone material or stabilized by means of osteosynthesis. This requires further surgical procedures to harvest the bone and/or subsequent procedures for metal implant removal. To reduce associated costs and possible complications for the patient, bioresorbable bone substitutes such as ceramics, polymers and metals have been researched for many years [1–3].

Among others, magnesium and its alloys have been investigated for their applicability in numerous studies due to their positive properties [4–7]. Compared to conventional implant materials such as titanium, cobalt chromium or stainless steel, magnesium has a similar Young's modulus to bone [7–9] and thus has a lower risk of stress shielding [10]. Due to its higher mechanical stability, magnesium is more resilient

than polymers or ceramics [5] and could be used in form of a suitable magnesium alloy to treat defects and fractures in weight-bearing bone [11,12]. In addition, magnesium is an essential element in many metabolic and enzymatic reactions in the body and is largely stored in the bone [13,14]. However, the disadvantage of magnesium as an implant material is rapid degradation and the associated accumulation of hydrogen and corrosion products in aqueous solution [5,15,16].

The production of magnesium alloys with the common elements aluminium, calcium, zinc or lithium can delay the degradation rate of pure magnesium [17]. Rare earth elements are also frequently added, which lead to an increase in stability and higher corrosion resistance [18]. Overall, magnesium alloys have already shown good biocompatibility in many in vitro [19,20] and in vivo studies [4,21,22]. The corrosion rate can also be reduced by additional coatings [23] or surface treatments [24]. Coatings with magnesium fluoride have proven to be especially

* Corresponding author.

E-mail address: ameylin@lmu.de (A. Meyer-Lindenberg).

<https://doi.org/10.1016/j.mta.2019.100436>

Received 6 August 2019; Accepted 10 August 2019

Available online 11 August 2019

2589-1529/© 2019 Published by Elsevier Ltd on behalf of Acta Materialia Inc.

suitable and show good compatibility in vivo [25–30]. Several studies have shown a significant reduction in the degradation of magnesium-based implants with a MgF₂ coating [26,29,31].

Porous magnesium implants in particular have an osteoconductive effect, as they allow bone to grow into the implant [20,23,32]. Interconnecting macropores between 150 and 500 µm seem to play an important role for the immigration of cells and blood vessels [33–36].

In contrast to most manufacturing techniques of porous magnesium scaffolds, the investment casting process enables the production of precisely defined and reproducible pore structures [37]. However, porous implants are more prone to corrosion than full body implants due to their increased surface area and should therefore be made of alloys that degrade as slowly as possible.

The LAE442 alloy has already been tested in various in vivo studies as pin, full-body cylinder or in plate screw systems, but not yet as an open-pored scaffold. Thereby the alloy LAE442 showed a relatively slow and homogeneous degradation behaviour [6,11,12,31,38–40]. In addition to lithium and aluminium, LAE442 also contains a varying mixture of numerous rare earth elements. Weizbauer et al. developed a new binary alloy Mg-La2 - consisting of magnesium and the rare earth element lanthanum - to improve reproducibility by using fewer components. This alloy already showed good cell compatibility and good material properties in vitro [41].

The porous magnesium scaffolds of the alloy LAE442 and Mg-La2 were developed and produced via investment casting by Julmi et al. [37]. Previous in vitro investigations have shown that the scaffolds have sufficient strength to withstand the forces in the rabbit bone [37]. The objective of this study was to compare the degradation behaviour and osseointegration of the open-pored scaffolds LAE442 and La2 in an in vivo model.

2. Material and methods

2.1. Scaffolds

For the present study, cylindrical scaffolds (Ø 4 mm, length 5 mm) with interconnecting pores (max. 500 µm, porosity 41.4%) were developed from the magnesium alloys LAE442 (4 wt.% Li, 4 wt.% Al, 2 wt.% rare earths) and Mg-La2 (2 wt.% La) (Fig. 1a). The geometry of the scaffolds was designed in order to correspond with the loading conditions of the bone at the implantation site (strut thickness 0.4 and 0.5 mm, surface area 266.88 mm², scaffold volume 38.37 mm³). The stress distributions were computed using the finite element method. 40 scaffolds of each magnesium alloy were produced by investment casting (Institut für Werkstoffkunde (Materials Science), Leibniz Universität Hannover) [37,42]. Using a 3D printer (T612, Solidscape, Inc., Merri-

mack, USA), wax models of the scaffolds were created and connected to a “wax casting tree”. The casting tree was embedded in a special plaster (Gilcast AM, BK Giulini GmbH, Ludwigshafen, Germany) and the wax was melted out of the mould after hardening. The investment casting was carried out with the help of an induction casting system (MC50, Indutherm GmbH, Walzbachtal-Wössingen, Germany). The furnace was heated to 740 °C and the molten alloy was poured into the mould. To support the filling of the mould, a protective gas (argon) with a pressure of 2 bar was introduced. Due to different cooling rates, the grain size varied within a scaffold (grain size range: LAE442 14 – 56 µm, La2 16 – 55 µm). After removing the plaster mould, the scaffolds were twisted off the casting tree and any remaining plaster was removed. Finally, the scaffolds were coated with magnesium fluoride using the conversion coating method and sterilized by gamma radiation (>25 kGy, BBF Sterilisationsservice GmbH, Kernern, Germany). Overall, 40 commercially available porous implants (Ø 4 mm, length 5 mm, pore size 5–500 µm (micro-, meso-, macro-pores), porosity 65%) made of β-tricalcium phosphate (TCP, Cerasorb M, Curasan AG, Kleinostheim, Germany) served as material for the control group.

2.2. Animal model

The animal experiment was approved by the regional government of Upper Bavaria under paragraph 8 of the Animal Welfare Act (approval number: 55.2–1–54–2532–181–2015). For the study, 60 mature female rabbits (Zika rabbits, Asamhof, Kissing, Germany) were divided into four groups (6, 12, 24 and 36 weeks) and evaluated over the respective trial period. For each time group, 10 scaffolds of both magnesium alloys and the TCP control group were randomly implanted. The surgical procedures were performed in a standardized manner by an experienced surgeon. The scaffolds were inserted into the cancellous part of the *greater trochanter* of both hind legs (Fig. 1b). Enrofloxacin (10 mg/kg, Enrobactin®, CP-Pharma GmbH, Burgdorf, Germany) and meloxicam (0.3 mg/kg, Rheumocam®, Albrecht GmbH, Aulendorf, Germany) were administered orally shortly before the procedure and for another 5 days afterwards. Anaesthesia was induced with intramuscular injections of ketamine (15 mg/kg, Anesketin®, Albrecht GmbH, Aulendorf, Germany) and medetomidine (0.25 mg/kg, Dorbene vet®, Zoetis Deutschland GmbH, Berlin, Germany). After endotracheal intubation and preparation for surgery, general anaesthesia was maintained with an isoflurane/oxygen mixture. Analgesia was achieved by intravenous administration of fentanyl (3 µg/kg, Fentadon®, Albrecht GmbH, Aulendorf, Germany) and the blood circulation of the animals was stabilized by infusion. Body temperature, end expiratory CO₂, oxygen saturation and heart rate were assessed for anaesthetic monitoring. A lateral approach to the proximal femur was performed directly above the *greater trochanter* with a 4 cm incision in skin and fascia. After separation of the muscles and detachment of the periosteum, an approximately 6 mm deep hole was drilled into the cancellous part of the *greater trochanter* in the direction of the femoral head using a 4 mm drill. After the scaffold had been inserted, the soft tissue was sutured in several layers (Monosyn violet 4/0, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Germany) and the skin was closed with individual sutures (Optilene blue 4/0, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Germany). Subsequently, the same surgical procedure was performed on the contralateral trochanter. As supplementary analgesia, the rabbits received buprenorphine (20 µg/kg, Bupresol®, CP-Pharma GmbH, Burgdorf, Germany) intravenously. Medetomidine was antagonized with an intramuscular administration of atipamezole (25 mg/kg, Atipam®, Albrecht GmbH, Aulendorf, Germany). The clinical condition of the animals and the wounds were examined daily, in particular the occurrence of pain, lameness and gas formation in the musculature was evaluated descriptively. The rabbits (Ø weight: 3.96 ± 0.27 kg, age: > 6 months) were kept in conventional cages under controlled conditions (water and hay ad libitum and rationed pellet food).

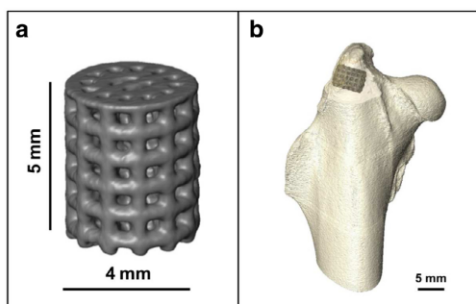


Fig. 1. (a) 3D model of implanted magnesium scaffolds; (b) 3D reconstruction of a rabbit femur demonstrating the implantation site.

Table 1
Scoring system for radiological and semi-quantitative μ CT evaluation, modified from Lalk et al. [43].

Parameters	Score 0	Score 1	Score 2
Position (1. scan)	Completely in cancellous bone; 1 mm underneath the bone contour	Mainly in cancellous bone	In medullary cavity/ through corticalis
Gas ^a	Not observed	Diffuse and few	Measurable bubble(s) (mm)
Bone like structures in adjoining muscle ^a	Not observed	1–3 structures / ≤ 2 mm	1–3 structures > 2 mm / > 3 structures
Periosteal bone formation in the adjacent periphery ^a	Not existing	≤ 7 mm long / ≤ 2 mm wide	>7 mm long / > 2 mm wide
Drill hole	Completely closed	Partially closed	Open
Integration of scaffold into bone	Broad contact area to adjacent cancellous bone (with many trabeculae), no/only fractional gap around scaffold	Contact to adjacent cancellous bone with few trabeculae, small gaps around scaffold	No contact to surrounding cancellous bone, manifest gap

^a Parameters applied for radiological evaluation; all parameters applied for semi-quantitative μ CT evaluation.

2.3. Radiological examination

All animals were radiologically examined immediately after surgery and every two weeks up to the twelfth week and every four weeks thereafter up to the end of the respective examination period. The X-ray images were taken with the settings 54.9 kV and 4.5 mAs (Multix Select DR, Siemens Healthcare GmbH, Erlangen, Germany) in HD position. The images were analysed by two observers using the dicomPACS® software (Version 8.3.20). An already established scoring system was adapted and used to evaluate the X-ray images [43]. Gas accumulation, radiopaque structures in the surrounding musculature (number/size in mm) and periosteal bone formation in the area of the drill hole (size in mm) were assessed descriptively. Score values between 0 and 2 were assigned for the individual parameters, where 0 stands for not existing and 2 for clear alteration (Table 1). The visibility of the scaffolds in the X-ray image were also evaluated (score 0 $\hat{=}$ visible, score 1 $\hat{=}$ not visible).

2.4. In vivo μ CT

In vivo μ CT images of the proximal femora (XtremeCT, Scanco Medical, Zurich, Switzerland) were taken under anaesthesia (medetomidine 0.25 mg/kg and ketamine 15 mg/kg) according to the same schedule as the radiological images. For this purpose, the rabbits were secured in supine position in a custom-made CT-holder. The scan region was defined by the area between the *minor trochanter* to just above the *major trochanter* of the two femora. The scan settings were set to 68 kV, 1000 projections/slice, 1470 μ A, 200 ms and an isotropic voxel size of 30.3 μ m. For the evaluation of the cross-sections of the scaffolds it was necessary to reorientate the scans. For this purpose, the implants were manually contoured in the longitudinal sections of the original scan and reoriented. The evaluations were performed with the software μ CT Evaluation Program V6.6 (Scanco Medical, Zurich, Switzerland) if the structure of the scaffolds could be identified. After loss of the scaffold structure, the affected scans were assessed descriptively.

2.4.1. Semi-quantitative evaluation

The μ CT images were evaluated semi-quantitatively by two observers using a modified scoring system by Lalk et al. (Table 1) [43]. All parameters except the bone-to-scaffold contact were evaluated in the original μ CT scans. The position of the scaffolds was assessed in the first scan performed directly postoperative. Gas was evaluated separately in several locations: inside the pores of the scaffold; in the immediate vicinity around the scaffold; in the medullary cavity and in the area of the diaphysis depicted in the scan as well as in the adjacent musculature (Fig. 2a). Bone-like structures in the surrounding tissue (number and size in mm) and periosteal bone formation (size in mm) in the area of the drill hole were evaluated equivalent to the radiographs (Fig. 2a). In addition, the closure of the drill hole above the scaffold was assessed. Bone-to-scaffold contacts were evaluated in the reoriented scans using six standardized cross-sections of scaffolds with surrounding cancellous bone (Figs. 2b and 3a).

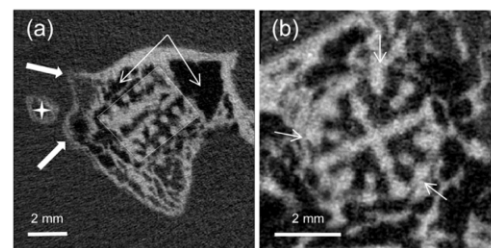


Fig. 2. In vivo μ CT images of LAE442 scaffold after 12 weeks of implantation: (a) longitudinal section; box: scaffold; thin arrows: appearance of gas around the scaffold; star: bone like structure in the adjoining muscle; thick arrows: periosteal bone formation in adjacent periphery (b) cross section; integration of scaffolds into bone; thin arrows: direct bone-to-scaffold contacts.

2.4.2. Quantitative evaluation

2.4.2.1. Scaffold degradation. The reoriented μ CT scans were used for quantitative evaluation. To evaluate the degradation of the scaffolds, a cylindrical region of interest (ROI) was placed over the scaffolds each time. The ROI (\varnothing 132 voxels = 3.99 mm; height 60 slices = 1.82 mm) corresponded to the centre area of the scaffolds and included two struts and two pores (Fig. 3b and c). A threshold (LAE442: 146, La2: 145 and TCP: 148) was determined for each material group and applied for the following evaluations: volume, density and surface area of the scaffolds.

The in vivo corrosion rate (CR) was calculated using the following equation according to Witte et al. [44].

$$CR = \frac{\Delta V}{A \times t}$$

ΔV is the difference between the volume of the scaffold to the previous time and the remaining scaffold volume. A stands for the surface of the scaffold that was exposed to corrosion and t for the time between the examination times. In order to determine a more precise temporal course of the corrosion behaviour, the corrosion rate of each material group was calculated based on the results of the consecutive μ CT scans.

2.4.2.2. Scaffold integration. To evaluate the integration of the scaffolds by the surrounding cancellous bone, a further ROI was set at the same level as the 1st ROI. For this purpose, a double ring was placed outside the scaffolds (Fig. 3b and d). The ring diameters (inside: 134 voxels (4.06 mm), outside: 159 voxels (4.82 mm)) were defined so that no scaffold material or cortex was included in the ROI. The threshold for the cancellous bone was set to 120 and was used for the following evaluations in the area between the two rings: bone volume, bone density, trabecular thickness, number of trabeculae and trabecular spacing. In order to obtain reference values for normal cancellous bone in this area,

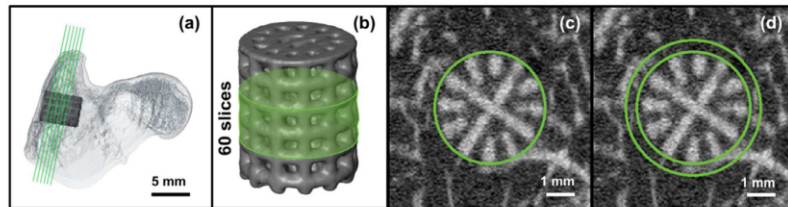


Fig. 3. (a) 3D reconstruction of the implantation site showing the 6 standardized cross sections for semi-quantitative μ CT evaluation of bone-to-scaffold contact; (b) Region of interest for quantitative μ CT evaluation: 60 slices in the centre of the scaffolds including two struts and two pores; (c) ROI with a diameter of 3.99 mm for the evaluation of scaffold degradation; (d) ROI with a diameter of 4.06 mm (inside) and 4.82 mm (outside) for evaluation of scaffold integration.

the ROI was also placed in five scanned *greater trochanters* without scaffold in rabbits of the same age and evaluated accordingly.

2.5. Statistics

The statistical evaluation of the data was carried out using Microsoft Excel and SPSS Statistics 25.0. The values of the quantitative evaluation were tested for normal distribution. Since they were not normally distributed, Kruskal-Wallis test was used for evaluation. Pair-wise comparisons were calculated with subsequent, single-functional ANOVA and adjusted using Bonferroni correction. Significance was set as p -values < 0.05 .

3. Results

3.1. Clinical examination

Clinically, no complications were observed in any of the animals. Slight postoperative swelling around the wound area had decreased after five days at the latest and redness of the skin only occurred until day 10 after removal of the stitches. Clinical signs of lameness or pain were not observed. Gas formation under the skin or in the muscles could not be palpated.

3.2. Radiological examination

The correct position of all scaffolds was proven postoperatively using X-rays. Gas accumulations with a similar distribution were visible in the musculature of 116/160 scaffolds (score 1: $n = 12$; score 2: $n = 104$) immediately after surgery. Further gas bubbles (score 2) occurred in three cases of La2 in week 2 and week 4. Diffuse gas accumulation (score 1) could be observed in LAE442 in two cases at week 4 and in one case at week 6 in the musculature. In one case, La2 also showed diffuse gas formation (score 1) in week 6. Gas could no longer be detected based on the X-ray images afterwards.

All material groups showed a strong increase in score values for radiopaque structures in the musculature between surgery and week 2, and for periosteal bone formation in the area of the drill hole between week 2 and week 6. A moderate increase in the score values for all material groups with similar characteristics could be determined for both parameters thereafter. All scaffolds were visible in the X-ray images up to week 8. Starting from week 10, the visibility decreased with TCP and from week 24, they could no longer be visualized. From week 12 onwards, 3/30 La2 scaffolds could not be identified precisely and from week 20 onwards there was no longer radiological evidence of the La2 scaffolds. In contrast, the LAE442 scaffolds were clearly detectable from the beginning to the end of the study period.

3.3. Semi-quantitative μ CT evaluation

The postoperative μ CT scans showed that all scaffolds were inserted into the cancellous part of the *greater trochanter*. With 45/160 scaffolds,

an optimal position could be achieved. The remaining scaffolds protruded slightly from or touched the drill hole or the opposite cortex, resulting in total scores of 0.71 for LAE442, 0.45 for La2 and 0.55 for TCP.

The score values for gas accumulation within the bone were similar at the three locations investigated (inside or directly outside the scaffolds, in the medullary cavity/diaphysis) and were therefore combined to a total score (Fig. 4a). The La2 scaffolds showed significantly higher gas formation within the bone between week 2 and week 6 compared to LAE442 ($p < 0.030$) and TCP ($p < 0.000$), which began to decrease again after week 12 (Fig. 4a). After week 28, no more gas could be detected for La2. LAE442 showed a slower increase in gas formation until week 20, which subsequently decreased to a mean score of 1.07 by week 36 and was significantly ($p < 0.000$) higher than La2 and TCP during this period. For TCP, no gas could be detected within the bone already from week 2 onwards.

In all scaffolds, postoperative gas could be detected in the musculature, which strongly decreased within 2 weeks (Fig. 4b). Further gas formation outside the bone was observed in La2 between week 8 and week 12 with significantly stronger values ($p < 0.004$) than in LAE442. The TCP group in contrast showed no gas accumulation in the surrounding tissue from week 4 and thus differed significantly from LAE442 ($p < 0.041$) and La2 ($p < 0.003$) until week 16. In the La2 and LAE442 group, there were only small amounts or no gas visible in the surrounding musculature thereafter.

Bone-like structures in the musculature were found in 107 of 160 scaffolds postoperatively, with La2 showing a lower score compared to LAE442 and TCP. The values for size and number stayed lower on average than those of LAE442 and TCP for the remaining period. Overall, the structures of all three material groups increased in size over the study period (Fig. 4c). The maximum size was 17.7 mm for TCP in week 24, 7.8 mm for La2 in week 28 and 7.2 mm for LAE442 in week 32.

Periosteal bone formations were sporadically visible from week 2 and increased strongly in size until week 4 in all scaffolds, whereby a score of 2 was usually achieved (Fig. 4d). The largest dimension was 21.5×6.8 mm at 10 weeks for TCP, followed by 20.6×3.7 mm at week 12 for La2 and 19.1×2.9 mm at week 20 for LAE442.

The evaluation of the drill hole showed that the majority of TCP (34/40) and LAE442 (21/40) were closed after week 6 (Fig. 4e). In La2, however, the majority (18/30) of the drill holes did not close until 12 weeks and achieved significantly higher scores between week 4 and week 10 compared to LAE442 ($p < 0.031$) and TCP ($p < 0.000$). In exceptional cases, the drill hole closure remained incomplete until the end of the test period (24-week group: TCP ($n = 1$), LAE442 ($n = 1$); 36-week group LAE442 ($n = 1$), La2 ($n = 2$)).

The postoperative evaluation of six cross sections per scaffold showed some direct contact with the surrounding spongiosa (Fig. 4f). Diffuse bone dense brightenings around the TCP implants were observed in week 2, which were later clearly identifiable as trabecula. Compared to LAE442 and La2, TCP implants showed significantly ($p < 0.000$) more contacts to cancellous bone from week 2. After 6 weeks this contact area was slowly traversed by trabecula. LAE442 slightly lost contact with the

N. Kleer, S. Julmi and A.-K. Gartzke et al.

Materialia 8 (2019) 100436

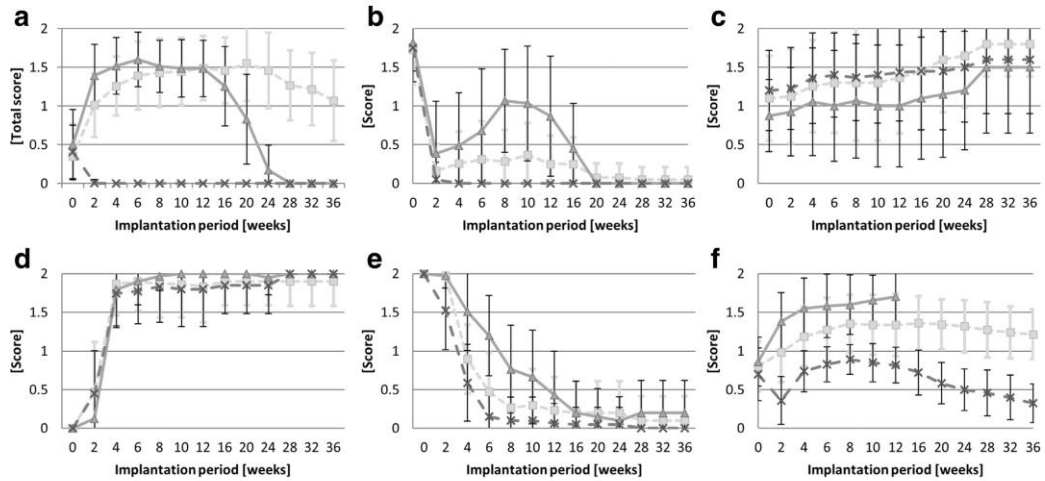


Fig. 4. Results of the semi-quantitative μ CT evaluation: Development of (a) total score mean values of gas formation inside bone, score mean values of (b) gas adjacent bone, (c) bone-like structures, (d) periosteal bone formation, (e) drill hole closure, (f) bone-to-scaffold contact; \square LAE442, Δ La2, X TCP; score values from 0 (not existing) to 2 (clear alteration).

cancellous bone until week 16 and showed an increasing contact area with the surrounding bone again until week 36. In La2, the bone-to-scaffold contact could only be evaluated up to week 12 due to rapid degradation. From weeks 4 to 12, La2 showed an average of only about one trabecular contact per evaluated cross-section with larger gaps between scaffold and cancellous bone. In contrast to La2, LAE442 had significantly more contacts to cancellous bone from week 2 to 6 ($p < 0.021$) and week 10 to 12 ($p < 0.023$).

From week 16 onwards, the scaffold structure of La2 could only be partially identified and was subsequently no longer recognizable. The

La2 scaffolds showed inhomogeneous degradation behaviour, with isolated bone dense areas in the direct surroundings. Overall, strong differences in corrosion rates were observed in the La2 group, with some scaffolds degrading much faster than the average. In addition, most La2 scaffolds showed faster degradation starting from the rim. Only few trabeculae around La2 could be identified and large gaps between the scaffold residues and the cancellous bone existed. From week 28 onwards, isolated bone dense brightenings in the original scaffold area of La2 increased strongly in density and extent, especially in the centre and as a ring-like structure at the outer edge until week 36 (Fig. 5).

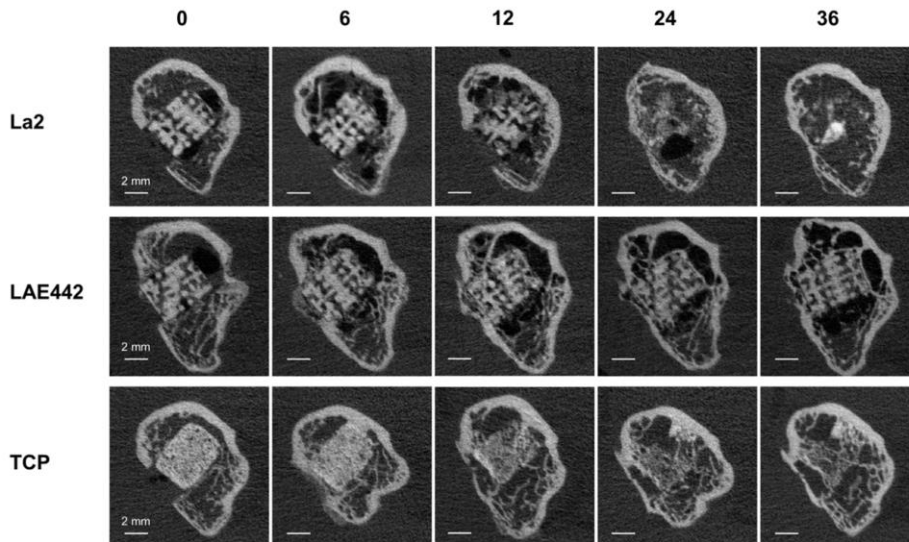


Fig. 5. μ CT images of longitudinal sections; Evolution of degradation of the scaffolds over 36 weeks.

3.4. Quantitative μ CT evaluation

3.4.1. Scaffold degradation

The analysis of the cylindrical ROI showed a very constant density and volume profile for LAE442 with a density loss of 1.2% and a volume loss of 11.1% (1.5 mm^3) up to week 36 (Fig. 6a and b). In contrast, La2 showed faster degradation, with a density loss of 15.7% by week 20 and a loss of its original volume of 72.8% (10 mm^3). Subsequently, the La2 scaffolds could no longer be evaluated using the ROI due to the strong degradation and the associated structural loss. Compared to LAE442, La2 showed a significantly lower volume ($p < 0.009$) from week 10 to week 20. For TCP, the density within the ROI increased by 7.8% in week 2 and then decreased again by 13.1% to week 36 (Fig. 6a and b). The volume of TCP showed a similar trend and, after an initial increase in week 2, decreased by a total of 75% (14.4 mm^3) of the original volume by week 36.

The corrosion rate for LAE442 was very constant with an average value of $3.710 \times 10^{-2} \text{ mm/y}$ (Fig. 7). In contrast, the La2 scaffolds showed significantly faster degradation with an average of $1.612 \times 10^{-1} \text{ mm/y}$ and a maximum corrosion rate of $6.769 \times 10^{-1} \text{ mm/y}$ between week 12 and week 16. All TCP implants initially had a nominally negative corrosion rate until week 2 and reached a maximum of 2.093 mm/y between week 4 and week 6 (Fig. 7).

3.4.2. Scaffold integration

As with the scaffold degradation, the second ROI (double ring) for La2 could only be evaluated until week 20.

In LAE442 and TCP, an increase in bone density was observed within the double ring up to week 36 (Fig. 8a). For LAE442 it resulted in a steady increase and reaching similar values corresponding to the density of the cancellous bone reference values from week 24 onwards. The bone density around the La2 scaffolds decreased by 3.7% by week 16 and increased by 2.4% by week 20. Within the double ring around TCP, the density values of the cancellous bone comparison values were reached at week 6 and subsequently showed a comparatively much higher bone density. The bone density values around the three material groups dif-

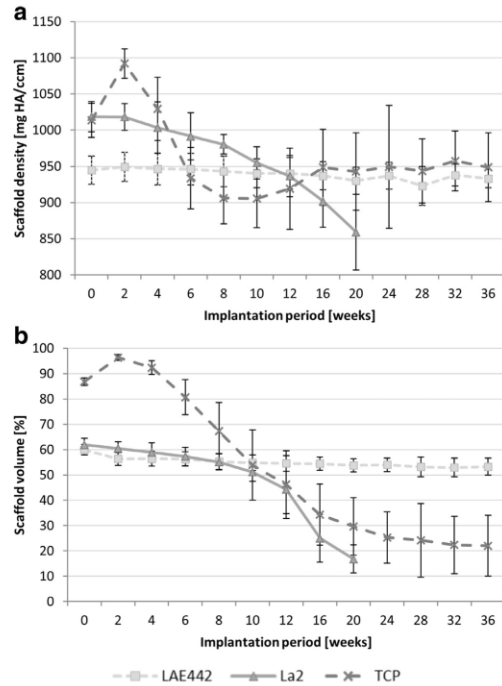


Fig. 6. Results of the quantitative μ CT evaluation (ROI corresponded to the centre area of the scaffolds): Scaffold degradation; (a) scaffold density, (b) scaffold volume.

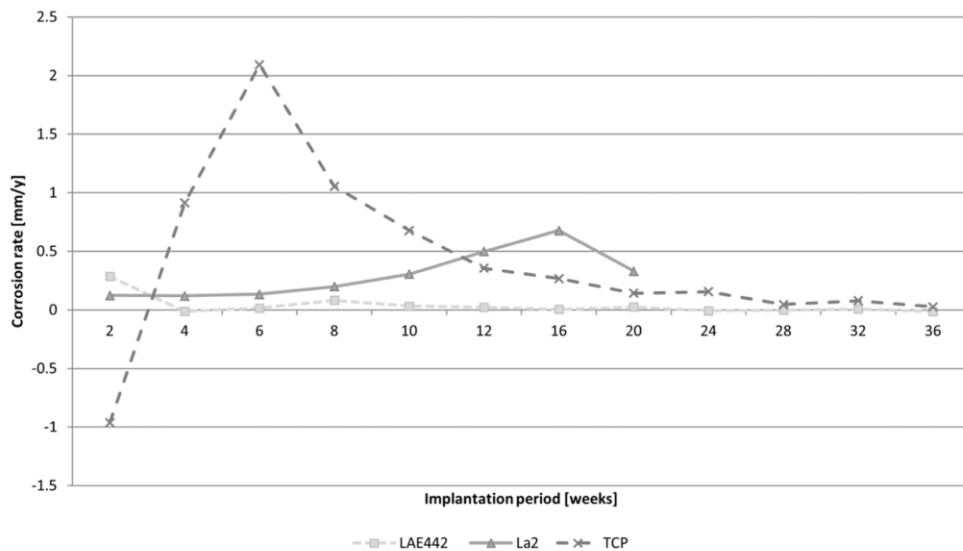


Fig. 7. Evolution of the in vivo corrosion rate of LAE442, La2 and TCP over 36 weeks.

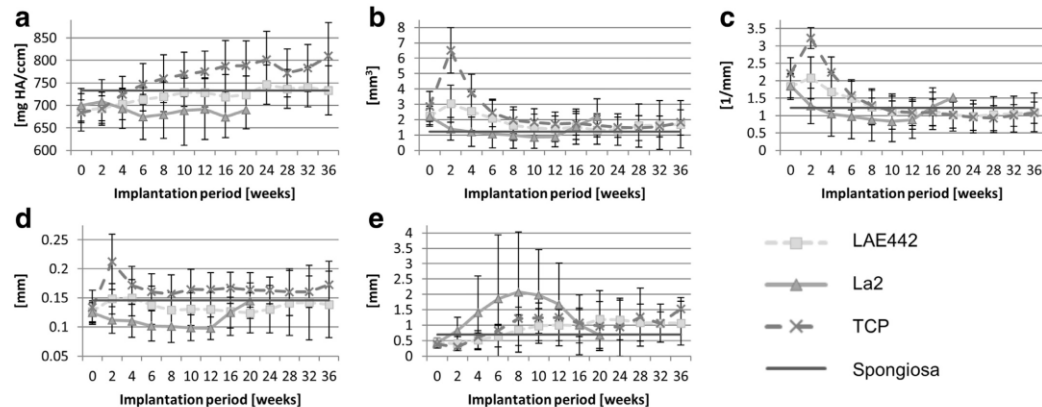


Fig. 8. Results of the quantitative μ CT evaluation (ROI corresponded to the area adjacent to the scaffolds centre): Scaffold integration: (a) bone density, (b) bone volume, (c) trabecular number, (d) trabecular thickness, (e) trabecular space.

ferred significantly ($p < 0.031$) between week 6 to week 12, with TCP showing the highest density values, followed by LAE442 and La2.

The bone volume within the double ring around LAE442 and TCP showed a similar overall course, with TCP bone volume more than doubling (3.6 mm^3) at week 2 and increasing by 40.8% (0.9 mm^3) in LAE442 (Fig. 8b). By the end of the study period, the TCP and LAE442 surroundings had a bone volume of 1.8 mm^3 and 1.7 mm^3 , the same as the cancellous bone equivalent (1.7 mm^3). The area around the La2 scaffolds lost a total of 60% (1.3 mm^3) bone volume by week 12 and then increased to 2.2 mm^3 by week 20. From week 2 to week 12, La2 showed significantly lower values for surrounding bone volume than the other two scaffolds LAE442 ($p < 0.037$) and TCP ($p < 0.000$).

The analysis of the bone trabeculae around the scaffolds showed that TCP and LAE442 achieved better values for trabecular number, trabecular thickness and trabecular spacing by week 12 compared to La2 (Fig. 8c–e). Between week 2 and week 6, LAE442 had significantly ($p < 0.001$) more trabeculae and smaller trabecular spacing compared to La2. Week 20 showed a reversed picture with significantly better values for trabecular number ($p = 0.009$) and spacing ($p = 0.016$) in La2. The bone trabeculae were significantly ($p < 0.012$) thicker between week 2 and week 12 in LAE442 compared to La2. TCP showed a significantly higher number of trabeculae up to week 4 compared to LAE442 ($p < 0.002$) and up to week 10 compared to La2 ($p < 0.042$). A significantly ($p = 0.014$) higher number of trabeculae showed La2 compared to TCP at week 20. The trabecular thickness of TCP remained permanently above the cancellous bone equivalent and was significantly thicker from week 2 compared to La2 ($p < 0.001$) and LAE442 ($p < 0.045$) until week 16 and week 24, respectively.

4. Discussion

The objective of the present study was to compare the osseointegration and degradation behaviour of resorbable, open-pored magnesium scaffolds made of the alloys LAE442 and Mg-La2. The commercially available implant material β -tricalcium phosphate (TCP) served as control group. The LAE442 alloy has already been promisingly tested in some studies as an intramedullary pin or full-body cylinder [11,12,31]. However, the binary alloy Mg-La2 has only been tested in vitro so far [40] but has proven to be suitable for successive in vivo investigations due to its good cytocompatibility. In two studies by Lalk et al. magnesium sponge structures with a random and irregular distribution of pores were evaluated [23,43]. In order to increase reproducibility of the tests

and stability of the implants, magnesium scaffolds from the two alloys mentioned above with defined interconnecting pores were investigated in this study. The MgF_2 coated scaffolds were evaluated in the cancellous bone of the greater trochanter of rabbits using regular radiographic and in vivo μ CT examinations for up to 36 weeks. The suitability of this localization for testing implants in the cancellous region has already been described by Lalk et al. [43].

As already investigated in vivo for other magnesium alloys [6,20,26] the two magnesium scaffolds LAE442 and La2 also showed good clinical tolerability.

Gas could be detected postoperatively for almost all scaffolds in the musculature and also within the bone to a lower extent. It is obvious that this accumulation of gas is air caused by the surgical intervention and not by the degradation of magnesium, since gas accumulated to the same extent in the TCP control group. In the TCP group it was almost completely resorbed by week 2. After initial resorption, an increase in gas formation could be observed in the magnesium scaffolds from week 2 onwards, which is presumably due to hydrogen release during the degradation of magnesium [5,16]. Accumulation of gas occurs when the hydrogen formed cannot be sufficiently absorbed and removed by the surrounding tissue and blood vessels [5]. Overall, it was observed that La2 produced significantly more gas than LAE442 at the earlier study time points from week 2 to week 6. The increased accumulation of gas within the first three months is associated with a faster degradation of the La2 scaffolds. In comparison, in LAE442 the almost constant accumulation of gas over the entire investigation period correlates with more constant degradation behaviour. The presence of gas had no clinical effect on the animals. Neither lameness nor signs of pain were observed, as was reported in other studies [45,46].

Semi-quantitative evaluations of all scaffolds showed similar changes in the bone regardless of the material. The development of periosteal bone formation could also be seen in other studies in empty defects [23,47] and is therefore not material dependent, but caused by other factors. This could be the procedure itself, possibly through injury to the periosteum or through the hole to create the implant site [23,48]. Since bone-like structures in the musculature had already been detected immediately after the operation, it can be assumed that these are drilling residues or small bone pieces that were produced during the operation.

The drill hole closure of TCP and LAE442 was found after 6 weeks on average and therefore faster than the La2 hole that closed after 12 weeks on average. This difference could be related to the increased gas formation of La2 during this period. In particular, the increased gas ac-

cumulation La2 in the musculature - partly directly in front of the drill hole - between week 6 and 12 suggests that the drill hole did not close until later for this reason. The study by Kraus et al. also reported that gas can reduce bone growth. The rapid degradation and the associated gas formation of ZX50 magnesium pins caused irritation of the growth plate in the juvenile rat femur with reduced length growth [49].

When evaluating the bone-to-scaffold contacts, the LAE442 scaffolds finally showed good integration with the surrounding cancellous bone. After an initial slight decrease in contact points, contacts between scaffold and cancellous bone with only small gaps became more frequent towards the end of the study period. Similar good results were achieved in the study by Thomann et al. in which more than half (53%) of the evaluated μ CT sections of intramedullary magnesium implants of the LAE442 alloy in rabbit tibia showed contact between trabecula and implant after 12 months [12]. In a similar study by Hampp et al. only a few trabecular contacts to the LAE442 pins were formed in rabbit tibia at 6 and 8 weeks [40]. The La2 scaffolds of the present study showed only little direct bone-to-scaffold contact with larger gaps up to week 12 and subsequent examination times could no longer be evaluated meaningfully due to the strong scaffold degradation. As described in other studies in large animal models (sheep) [33,35], the control group TCP was very well integrated into the surrounding cancellous bone and traversed by bone trabecula in the present study. However, TCP is inferior to the mechanical properties of bone and is therefore not suitable for use in weight-bearing bone defects.

In order to analyse the degradation of the scaffolds, density and volume within a set cylinder were determined quantitatively based on the study by Xu et al. [50]. The LAE442 scaffolds showed very slow degradation behaviour with a density loss of only 1.2% and a residual volume of 89% after 36 weeks. The corrosion rates, which were calculated over the entire investigation period, also showed a very constant course of corrosion for the LAE442 scaffolds, with an average of 3.710×10^{-2} mm/y. In the study by Witte et al. an even lower in vivo corrosion rate of 1.205×10^{-4} mm/y was determined after 18 weeks for intramedullary LAE442 rods in the femur of guinea pigs using SRmCT images [44]. These different in vivo corrosion rates could be related to the animal model, implantation site and different electrochemical conditions along the surface of the LAE442 scaffolds compared to the LAE442 rods [44].

In contrast to LAE442, La2 showed inhomogeneous and rapid degradation behaviour. The different degradation rates within the La2 group cannot be clarified in this study. However, it can be assumed that small deviations of the scaffold position have an influence on the degradation behaviour. Kraus et al. observed that implants degrade faster when placed in the medullary cavity compared to cortical bone [21]. For La2, higher corrosion rates over time were observed with an average corrosion rate of 1.612×10^{-1} mm/y and a maximum of 6.769×10^{-1} mm/y between week 12 and 16. So far, in vitro corrosion rates have only been determined for magnesium alloys with lanthanum. In a study by Willbold et al. the alloy Mg-La with a different composition (0.69 wt.% La) showed higher corrosion rates of 2.15 mm/y and 14.7 mm/y in vitro in the electrochemical corrosion test and the immersion test, respectively [18]. Furthermore, the in vitro study by Weizbauer et al. showed that the corrosion rate of Mg-La2 clearly depends on the medium to which the material is exposed to. Four different cell culture media provided a wide range of corrosion behaviour [41]. These strong differences show that in vivo and in vitro corrosion rates do not correlate well, as already described in other studies [44,51].

The phenomenon of a negative corrosion rate of TCP scaffolds cannot be clarified on the basis of the available data. However, the corrosion rate of the TCP implant is only a theoretical calculation, since the degradation of TCP is based on other mechanisms such as cell-mediated resorption [52].

Previous in vitro analyses of the two investigated magnesium scaffolds showed that the LAE442 scaffolds were able to be produced with smaller grain sizes on average than the La2 scaffolds [37] using the investment casting method. This could have an influence on the stronger

degradation of La2. In an in vivo study by Ullmann et al. the influence of different grain sizes on the degradation behaviour of the LAE442 alloy was investigated, whereby the implants with the smallest grain sizes had the lowest corrosion rate and the largest grain sizes the highest corrosion rate [38].

In the assessment of the immediate environment around the scaffolds, LAE442 achieved better osseointegration values in the first weeks compared to La2. LAE442 showed higher values for bone density, bone volume, trabecular number and thickness, i.e. also smaller values for trabecular spacing. These differences may be associated with the faster degradation of La2 and the associated unfavourable conditions for bone growth. Possible causes could be the increased accumulation of gas and/or increased alkalization of the direct scaffold environment, which impede the binding of osteocytes to the implant surface [21,53]. By week 20, La2 showed better values for surrounding cancellous bone than LAE442, with the exception of bone density. This can be explained by the fact that the conditions for bone growth improved after almost complete degradation and cessation of gas production. This phenomenon was also found in the study by Kraus et al. [21], where bone regenerated quickly after almost complete degradation of the ZX50 pins. However, the balance between bone ingrowth and scaffold degradation was not optimal, since the La2 scaffold degraded too quickly in this study. The bone dense brightening at the centre of the original scaffold localization observed from week 24 onwards in La2 could not be easily explained. These could possibly be corrosion products of the scaffolds, which remains to be clarified in further investigations.

5. Conclusion

Overall, the open-pored scaffolds LAE442 and La2 showed no clinical complications. In the present study it could be determined that the La2 scaffolds showed a relatively fast, inhomogeneous degradation with an inferior osseointegration compared to the LAE442 scaffolds. However, these showed a very slow, homogeneous degradation and maintained their original form until the end of the investigation period. Based on the results to date, the LAE442 scaffolds with their more homogeneous degradation behaviour and better osseointegration are suitable for examination in weight-bearing bone defects. However, it should also be investigated whether additional coatings to MgF₂ can further reduce gas formation. Subsequent histological investigations are, however, required to clarify the biocompatibility and ingrowth of bone more precisely.

Declaration of Competing Interest

None.

Acknowledgments

This research was funded by the German Research Foundation (DFG) within the project "Interfacial effects and integration behaviour of magnesium-based sponges as bioresorbable bone substitute material" (Grant No. 271761343). The authors gratefully appreciate the financial support. Moreover, the authors thank Lisa Wurm and Beatrix Limmer for excellent technical support.

References

- [1] H. Cao, N. Kuboyama, A biodegradable porous composite scaffold of PGA/beta-TCP for bone tissue engineering, *Bone* 46 (2) (2010) 386–395.
- [2] V. Karageorgiou, D. Kaplan, Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis, *Biomaterials* 26 (27) (2005) 5474–5491.
- [3] T. Kraus, F. Moszner, S. Fischerauer, M. Fiedler, E. Martinelli, J. Eichler, F. Witte, E. Willbold, M. Schinhammer, M. Meischel, P.J. Uggowitzer, J.F. Löffler, A. Weinberg, Biodegradable Fe-based alloys for use in osteosynthesis: outcome of an in vivo study after 52 weeks, *Acta Biomater.* 10 (7) (2014) 3346–3353.
- [4] E. Willbold, K. Kalla, I. Bartsch, K. Bobe, M. Braunis, S. Remennik, D. Shechtman, J. Nellesen, W. Tillmann, C. Vogt, F. Witte, Biocompatibility of rapidly solidified magnesium alloy RS66 as a temporary biodegradable metal, *Acta Biomater.* 9 (10) (2013) 8509–8517.

- [5] F. Witte, V. Kaese, H. Haferkamp, E. Switzer, A. Meyer-Lindenberg, C.J. Wirth, H. Windhagen, In vivo corrosion of four magnesium alloys and the associated bone response, *Biomaterials* 26 (17) (2005) 3557–3563.
- [6] N. Angrisani, J. Reifenrath, F. Zimmermann, R. Eifer, A. Meyer-Lindenberg, K. Vano-Herrera, C. Vogt, Biocompatibility and degradation of LAE442-based magnesium alloys after implantation of up to 3.5 years in a rabbit model, *Acta Biomater.* 44 (2016) 355–365.
- [7] M.P. Staiger, A.M. Pietak, J. Huadmai, G. Dias, Magnesium and its alloys as orthopedic biomaterials: a review, *Biomaterials* 27 (9) (2006) 1728–1734.
- [8] J. Nagels, M. Stokdijk, P.M. Rozing, Stress shielding and bone resorption in shoulder arthroplasty, *J. Shoulder Elbow Surg.* 12 (1) (2003) 35–39.
- [9] L. Xu, G. Yu, E. Zhang, F. Pan, K. Yang, In vivo corrosion behavior of Mg-Mn-Zn alloy for bone implant application, *J. Biomed. Mater. Res. Part A* 83 (3) (2007) 703–711.
- [10] M.P. Sealy, Y.B. Guo, Surface integrity and process mechanics of laser shock peening of novel biodegradable magnesium-calcium (Mg-Ca) alloy, *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* 3 (7) (2010) 488–496.
- [11] A. Krause, N. Von der Höh, D. Bormann, C. Krause, F.-W. Bach, H. Windhagen, A. Meyer-Lindenberg, Degradation behaviour and mechanical properties of magnesium implants in rabbit tibiae, *J. Mater. Sci.* 45 (3) (2010) 624–632.
- [12] M. Thomann, C. Krause, D. Bormann, N. Von der Höh, H. Windhagen, A. Meyer-Lindenberg, Comparison of the resorbable magnesium alloys LAE442 and MgCa0.8 concerning their mechanical properties, their progress of degradation and the bone-implant-contact after 12 months implantation duration in a rabbit model, *Mat.-wiss. u. Werkstofftech.* 40 (1-2) (2009) 82–87.
- [13] J. Vormann, Magnesium: nutrition and metabolism, *Mol. Aspects Med.* 24 (1-3) (2003) 27–37.
- [14] A. Hartwig, Role of magnesium in genomic stability, *Mutat. Res.* 475 (1-2) (2001) 113–121.
- [15] C. Janning, E. Willbold, C. Vogt, J. Nellesen, A. Meyer-Lindenberg, H. Windhagen, F. Thorey, F. Witte, Magnesium hydroxide temporarily enhancing osteoblast activity and decreasing the osteoclast number in peri-implant bone remodelling, *Acta Biomater.* 6 (5) (2010) 1861–1868.
- [16] G. Song, A. Atrens, Understanding magnesium corrosion—a framework for improved alloy performance, *Adv. Eng. Mater.* 5 (12) (2003) 837–858.
- [17] F. Witte, N. Hort, C. Vogt, S. Cohen, K.U. Kainer, R. Willumeit, F. Feyerabend, Degradable biomaterials based on magnesium corrosion, *Curr. Opin. Solid State Mater. Sci.* 12 (5-6) (2008) 63–72.
- [18] E. Willbold, X. Gu, D. Albert, K. Kalla, K. Bobe, M. Brauns, C. Janning, J. Nellesen, W. Czayka, W. Tillmann, Y. Zheng, F. Witte, Effect of the addition of low rare earth elements (lanthanum, neodymium, cerium) on the biodegradation and biocompatibility of magnesium, *Acta Biomater.* 11 (2015) 554–562.
- [19] X. Gu, Y. Zheng, Y. Cheng, S. Zhong, T. Xi, In vitro corrosion and biocompatibility of binary magnesium alloys, *Biomaterials* 30 (4) (2009) 484–498.
- [20] K. Bobe, E. Willbold, I. Morgenthal, O. Andersen, T. Studnitzky, J. Nellesen, W. Tillmann, C. Vogt, K. Vano, F. Witte, In vitro and in vivo evaluation of biodegradable, open-porous scaffolds made of sintered magnesium W4 short fibres, *Acta Biomater.* 9 (10) (2013) 8611–8623.
- [21] T. Kraus, S.F. Fischerauer, A.C. Hänzli, P.J. Uggowitzer, J.F. Löffler, A.M. Weinberg, Magnesium alloys for temporary implants in osteosynthesis: in vivo studies of their degradation and interaction with bone, *Acta Biomater.* 8 (3) (2012) 1230–1238.
- [22] D. Dziuba, A. Meyer-Lindenberg, J.M. Seitz, H. Waizy, N. Angrisani, J. Reifenrath, Long-term in vivo degradation behaviour and biocompatibility of the magnesium alloy ZEK100 for use as a biodegradable bone implant, *Acta Biomater.* 9 (10) (2013) 8548–8560.
- [23] M. Lalk, J. Reifenrath, N. Angrisani, A. Bondarenko, J.M. Seitz, P.P. Mueller, A. Meyer-Lindenberg, Fluoride and calcium-phosphate coated sponges of the magnesium alloy AX30 as bone grafts: a comparative study in rabbits, *J. Mater. Sci.: Mater. Med.* 24 (2) (2013) 417–436.
- [24] S.F. Fischerauer, T. Kraus, X. Wu, S. Tangl, E. Sorantin, A.C. Hänzli, J.F. Löffler, P.J. Uggowitzer, A.M. Weinberg, In vivo degradation performance of micro-arc-oxidized magnesium implants: a micro-CT study in rats, *Acta Biomater.* 9 (2) (2013) 5411–5420.
- [25] Z. Li, S. Shizhao, M. Chen, B.D. Fahlman, D. Liu, H. Bi, In vitro and in vivo corrosion, mechanical properties and biocompatibility evaluation of MgF₂-coated Mg-Zn-Zr alloy as cancellous screws, *Mater. Sci. Eng. C, Mater. Biol. Appl.* 75 (2017) 1268–1280.
- [26] M. Thomann, C. Krause, N. Angrisani, D. Bormann, T. Hassel, H. Windhagen, A. Meyer-Lindenberg, Influence of a magnesium-fluoride coating of magnesium-based implants (MgCa0.8) on degradation in a rabbit model, *J. Biomed. Mater. Res. Part A* 93 (4) (2010) 1609–1619.
- [27] H. Jiang, J. Wang, M. Chen, D. Liu, Biological activity evaluation of magnesium fluoride coated Mg-Zn-Zr alloy in vivo, *Mater. Sci. Eng. C* 75 (2017) 1068–1074.
- [28] M.Q. Cheng, T. Wahafu, G.F. Jiang, W. Liu, Y.Q. Qiao, X.C. Peng, T. Cheng, X.L. Zhang, G. He, X.Y. Liu, A novel open-porous magnesium scaffold with controllable microstructures and properties for bone regeneration, *Sci. Rep.* 6 (2016) 1–14.
- [29] W. Yu, H. Zhao, Z. Ding, Z. Zhang, B. Sun, J. Shen, S. Chen, B. Zhang, K. Yang, M. Liu, D. Chen, Y. He, In vitro and in vivo evaluation of MgF₂ coated AZ31 magnesium alloy porous scaffolds for bone regeneration, *Colloids Surf. B Biointerfaces* 149 (2017) 330–340.
- [30] W. Sun, G. Zhang, L. Tan, K. Yang, H. Ai, The fluoride coated AZ31B magnesium alloy improves corrosion resistance and stimulates bone formation in rabbit model, *Mater. Sci. Eng. C* 63 (2016) 506–511.
- [31] F. Witte, J. Fischer, J. Nellesen, C. Vogt, J. Vogt, T. Donath, F. Beckmann, In vivo corrosion and corrosion protection of magnesium alloy LAE442, *Acta Biomater.* 6 (5) (2010) 1792–1799.
- [32] M. Yazdimamaghani, M. Razavi, D. Vashae, K. Moharamzadeh, A.R. Boccacini, L. Tayebi, Porous magnesium-based scaffolds for tissue engineering, *Mater. Sci. Eng. C* 71 (2017) 1253–1266.
- [33] M. Bohner, G. Baroud, A. Bernstein, N. Doebelin, L. Galea, B. Hesse, R. Heuberger, S. Meille, P. Michel, B. Von Rechenberg, J. Sague, H. Seeherman, Characterization and distribution of mechanically competent mineralized tissue in micropores of β -tricalcium phosphate bone substitutes, *Mater. Today* 20 (3) (2017) 106–115.
- [34] V. Karageorgiou, D. Kaplan, Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis, *Biomaterials* 26 (27) (2005) 5474–5491.
- [35] M.C. von Doernberg, B. von Rechenberg, M. Bohner, S. Grünenfelder, G.H. van Lenthe, R. Müller, B. Gasser, R. Mathys, G. Baroud, J. Auer, In vivo behavior of calcium phosphate scaffolds with four different pore sizes, *Biomaterials* 27 (30) (2006) 5186–5198.
- [36] B. Otsuki, M. Takemoto, S. Fujibayashi, M. Neo, T. Kokubo, T. Nakamura, Pore throat size and connectivity determine bone and tissue ingrowth into porous implants: three-dimensional micro-CT based structural analyses of porous bioactive titanium implants, *Biomaterials* 27 (35) (2006) 5892–5900.
- [37] S. Julmi, A.-K. Krüger, A.-C. Waselau, A. Meyer-Lindenberg, P. Wriggers, C. Klose, H.J. Maier, Processing and coating of open-pored absorbable magnesium-based bone implants, *Mater. Sci. Eng. C* 98 (2019) 1073–1086.
- [38] B. Ullmann, J. Reifenrath, J.M. Seitz, D. Bormann, A. Meyer-Lindenberg, Influence of the grain size on the in vivo degradation behaviour of the magnesium alloy LAE442, *Proc. Inst. Mech. Eng., Part H: J. Eng. Med.* 227 (3) (2013) 317–326.
- [39] C. Rössig, N. Angrisani, P. Helmecke, S. Besdo, J.M. Seitz, B. Welke, N. Fedchenko, H. Kock, J. Reifenrath, In vivo evaluation of a magnesium-based degradable intramedullary nailing system in a sheep model, *Acta Biomater.* 25 (2015) 369–383.
- [40] C. Hampp, N. Angrisani, J. Reifenrath, D. Bormann, J.M. Seitz, A. Meyer-Lindenberg, Evaluation of the biocompatibility of two magnesium alloys as degradable implant materials in comparison to titanium as non-resorbable material in the rabbit, *Mater. Sci. Eng. C* 33 (1) (2013) 317–326.
- [41] A. Weizbauer, J.M. Seitz, P. Werle, J. Hegemann, E. Willbold, R. Eifer, H. Windhagen, J. Reifenrath, H. Waizy, Novel magnesium alloy Mg-2La caused no cytotoxic effects on cells in physiological conditions, *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* 41 (2014) 267–273.
- [42] S. Julmi, C. Klose, A.-K. Krüger, P. Wriggers, H.J. Maier, Development of sponge structure and casting conditions for absorbable magnesium bone implants, in: *Proceedings of the TMS 2017 146th Annual Meeting & Exhibition Supplemental Proceedings*, Springer, 2017, pp. 307–317.
- [43] M. Lalk, J. Reifenrath, D. Rittershaus, D. Bormann, A. Meyer-Lindenberg, Biocompatibility and degradation behaviour of degradable magnesium sponges coated with bioglass—method establishment within the framework of a pilot study, *Mat.-wiss. u. Werkstofftech.* 41 (12) (2010) 1025–1034.
- [44] F. Witte, J. Fischer, J. Nellesen, H.A. Crostack, V. Kaese, A. Pisch, F. Beckmann, H. Windhagen, In vitro and in vivo corrosion measurements of magnesium alloys, *Biomaterials* 27 (7) (2006) 1013–1018.
- [45] N. Erdmann, N. Angrisani, J. Reifenrath, A. Lucas, F. Thorey, D. Bormann, A. Meyer-Lindenberg, Biomechanical testing and degradation analysis of MgCa0.8 alloy screws: a comparative in vivo study in rabbits, *Acta Biomater.* 7 (3) (2011) 1421–1428.
- [46] C. Hampp, B. Ullmann, J. Reifenrath, N. Angrisani, D. Dziuba, D. Bormann, J.M. Seitz, A. Meyer-Lindenberg, Research on the biocompatibility of the new magnesium alloy LANd442—an in vivo study in the rabbit tibia over 26 weeks, *Adv. Eng. Mater.* 14 (3) (2012) B28–B37.
- [47] T.A. Huehnerschulte, J. Reifenrath, B. von Rechenberg, D. Dziuba, J.M. Seitz, D. Bormann, H. Windhagen, A. Meyer-Lindenberg, In vivo assessment of the host reactions to the biodegradation of the two novel magnesium alloys ZEK100 and AX30 in an animal model, *Biomed. Eng. Online* 11 (2012) 14.
- [48] N. Von der Höh, D. Bormann, A. Lucas, E. Martinelli, B. Denkena, C. Hackenbroich, A. Meyer-Lindenberg, Influence of different surface machining treatments of magnesium-based resorbable implants on the degradation behavior in rabbits, *Adv. Eng. Mater.* 11 (5) (2009) B47–B54.
- [49] T. Kraus, S. Fischerauer, S. Treichler, E. Martinelli, J. Eichler, A. Myrissa, S. Zötsch, P.J. Uggowitzer, J.F. Löffler, A.M. Weinberg, The influence of biodegradable magnesium implants on the growth plate, *Acta Biomater.* 66 (2018) 109–117.
- [50] Y. Xu, H. Meng, H. Yin, Z. Sun, J. Peng, X. Xu, Q. Guo, W. Xu, X. Yu, Z. Yuan, B. Xiao, C. Wang, Y. Wang, S. Liu, S. Lu, Z. Wang, A. Wang, Quantifying the degradation of degradable implants and bone formation in the femoral condyle using micro-CT 3D reconstruction, *Exp. Ther. Med.* 15 (1) (2018) 93–102.
- [51] B. Ullmann, J. Reifenrath, D. Dziuba, J.M. Seitz, D. Bormann, A. Meyer-Lindenberg, In vivo degradation behavior of the magnesium alloy LANd442 in rabbit tibiae, *Materials* 4 (12) (2011) 2197–2218.
- [52] N.L. Davison, B. ten Harkel, T. Schoenmaker, X. Luo, H. Yuan, V. Everts, F. Barrere-de Groot, J.D. de Bruijn, Osteoclast resorption of beta-tricalcium phosphate controlled by surface architecture, *Biomaterials* 35 (26) (2014) 7441–7451.
- [53] F. Seuss, S. Seuss, M. Turhan, B. Fabry, S. Virtanen, Corrosion of Mg alloy AZ91D in the presence of living cells, *J. Biomed. Mater. Res. Part B: Appl. Biomater.* 99 (2) (2011) 276–281.

2. Publikation II

Das Manuskript wurde am 07. Juli 2020 im Journal “Biomedical Materials“ zur Veröffentlichung eingereicht.

Biocompatibility and degradation of the open-pored magnesium scaffolds LAE442 and La2

N. Kleer-Reiter¹, S. Julmi², F. Feichtner¹, A.-C. Waselau¹, C. Klose², P. Wriggers³,

H.J. Maier², A. Meyer-Lindenberg¹

¹ Clinic of Small Animal Surgery and Reproduction, Ludwig-Maximilians-Universität, München, Germany

² Institut für Werkstoffkunde (Materials Science), Leibniz Universität Hannover, Garbsen, Germany

³ Institute of Continuum Mechanics, Leibniz Universität Hannover, Hannover, Germany

Abstract

Porous magnesium implants are of particular interest for application as resorbable bone substitutes, due to their mechanical strength and a Young's modulus similar to bone. The objective of the present study was to compare the biocompatibility, bone and tissue ingrowth, and the degradation behaviour of scaffolds made from the magnesium alloys LAE442 ($n = 40$) and Mg-La2 ($n = 40$) *in vivo*. For this purpose, cylindrical magnesium scaffolds (diameter 4 mm, length 5 mm) with defined, interconnecting pores were produced by investment casting and coated with MgF₂. The scaffolds were inserted into the cancellous part of the greater *trochanter ossis femoris* of rabbits. After implantation periods of 6, 12, 24 and 36 weeks, the bone-scaffold compounds were evaluated using *ex vivo* μ CT80 images, histological examinations and EDX analysis. The La2 scaffolds showed inhomogeneous and rapid degradation, with inferior osseointegration as compared to LAE442. For the early observation times, no bone and tissue could be observed in the pores of La2. Furthermore, the excessive amount of foreign body cells (FBCs) and fibrous capsule formation indicates insufficient biocompatibility of the La2 scaffolds. In contrast, the LAE442 scaffolds showed slow degradation and better osseointegration. Good vascularization, a moderate cellular response, bone and osteoid-like bone matrix at all implantation periods were observed in the pores of LAE442. In summary, porous LAE442 showed promise as a degradable scaffold for bone defect repair, based on its degradation behaviour and biocompatibility.

However, further studies are needed to show it would have the necessary mechanical properties required over time for weight-bearing bone defects.

Keywords: magnesium alloy, porous scaffold, μ CT, biocompatibility, osseointegration

1. Introduction

Currently, the treatment of large bone defects caused by trauma, infection or tumour constitute a serious medical problem, especially when defects of critical size lack the ability to heal and impaired bone healing occurs [1, 2]. Although autografts are the gold standard for the treatment of these defects, they are associated with the problems of limited availability, additional surgery and postoperative complications [3, 4]. For this reason, there is a great demand in orthopaedic surgery for alternatives to bone grafts for bone defects. Although the use of porous ceramics and polymers as degradable bone substitutes were some of the first implantable biomaterials, the use of degradable porous metals has become a focus of research in recent years [5-7].

Degradable bone substitutes should preferably have an osteoinductive and osteoconductive effect, as well as a good long-term biocompatibility and a degradation rate adapted to the formation of new bone [4, 5]. For successful osseointegration of scaffolds, certain structural properties such as high porosity, suitable pore size, and interconnecting pores are of particular importance [4, 8, 9]. The pores have a great influence on the immigration and ingrowth of cells and blood vessels, as well as for ensuring the nutritive supply to the ingrowing tissue. Scaffolds with macropores between 150 and 500 μ m proved to be particularly advantageous [5, 10, 11].

In addition, although it depends on the application and the stabilization technique, the bone substitutes should have similar mechanical properties to bone, both in the area of the defect and at the attachment to the surrounding bone. Current porous bone substitutes made of polymers or ceramics, such as β -tricalcium phosphate, can show good biocompatibility and osseointegration, but have low mechanical stability, so they are mainly used to fill smaller defects or are applied as coatings [12, 13]. For effective treatment of long tubular bone defects, cylindrical titanium mesh cages combined with a bone graft have been used to repair critical size bone defects [14, 15]. However, removal of the inserted titanium mesh cage is not

possible after it has been surrounded by bone. Therefore, leaving the titanium mesh cages in the bone may result in stress shielding, secondary bone absorption and fracture [14, 16].

The resorbable metal magnesium and its alloys have been investigated in numerous studies for orthopaedic use due to the positive properties in context with biomedical application [13, 17, 18]. Among these positive properties are a Young's modulus similar to bone [16, 17] and a significantly higher mechanical stability compared to polymers and ceramics [13]. Furthermore, magnesium is an essential element in the body and is involved in many metabolic and enzymatic reactions [19]. However, the comparatively rapid degradation and the associated accumulation of hydrogen and corrosion products in aqueous solution are the main disadvantages of magnesium-based implants [13, 20, 21].

So far, most magnesium alloys have only been investigated as solid implants with a comparably small surface area available for corrosion. Thus, the interaction with the host tissue and the bone to scaffold interface could only be assessed to a limited extent. In contrast, open porous implants provide a larger surface area that can enhance osseointegration, but also increase the degradation rate. Therefore, these scaffolds should consist of slowly degrading magnesium alloys to ensure sufficient mechanical stability when used as a bone substitute [7]. In order to control and reduce the rapid degradation, the resistance of magnesium alloys can be tailored by selecting appropriate alloying elements. Alloys containing the elements aluminium (Al), lithium (Li), zinc and rare earths (RE) have proven to be particularly resistant [22, 23]. Screws made of the magnesium alloy MgYREZr (MAGNEZIX®) are already used in human medicine [24, 25].

The magnesium alloy LAE442 contains Li, Al and RE as alloying elements and has proven to be very resistant and biocompatible in many *in vitro* and *in vivo* studies in the form of intramedullary pins, cylindrical solid bodies and screw-plate systems [26-31]. The binary alloy Mg-La2 with lanthanum, on the other hand, has only been tested *in vitro* so far and has demonstrated an improved reproducibility by using fewer alloy components [32]. In the study by Weizbauer *et al.*, the alloy showed good cell compatibility and good material properties for *in vivo* evaluation [32].

In addition, many studies have shown that coatings or surface treatments of magnesium implants have a corrosion retarding effect [33, 34]. Coating with MgF₂ showed a significant reduction in magnesium degradation in the initial phase, and direct contact to the surrounding bone [35, 36]. Furthermore, better attachment and

proliferation of cells could be achieved on MgF₂-coated magnesium implants compared to uncoated ones [37]. Compared to microarc oxidation and other surface treatments, MgF₂ coating is a simple and cost-effective method suitable for industrial production [38].

The production of reproducible, porous magnesium scaffolds can be a challenge, since most manufacturing techniques, such as powder metallurgy technology, only achieve undefined pore structures [6, 7, 39, 40]. However, with the investment casting process it is possible to obtain defined interconnecting pore structures of Mg-based scaffolds with a high design flexibility [41].

Using this method, porous scaffolds made of the alloys LAE442 and Mg-La₂ were produced and investigated by Julmi *et al.* [42]. The *in vitro* tests showed sufficient strength of the scaffolds to withstand the forces in rabbit bone with a compression weight-bearing capacity 3.4 times (La₂) and 5.6 times (LAE442) higher than the expected load [41, 42]. In the *in vivo* study by Kler *et al.* the two magnesium scaffolds LAE442 and La₂ with defined interconnecting pores and MgF₂ coating were evaluated using regular radiological and *in vivo* μ CT images over a period of 36 weeks [43]. In this study, slow degradation behaviour for the LAE442 scaffolds and comparatively fast degradation of the La₂ scaffolds with higher gas production could already be observed.

The objective of this study was to compare the biocompatibility and the degradation mechanisms of the porous magnesium scaffolds made of the alloys LAE442 and Mg-La₂ using high-resolution μ CT80 images, histological examinations and SEM/EDX analyses after an implantation period of up to 36 weeks.

2. Materials and methods

2.1 Scaffolds

For the present study, 80 cylindrical scaffolds (\varnothing 4 mm, length 5 mm), each with interconnecting pores (max. pore size 500 μ m, porosity 41.4%), were produced from the magnesium alloys La₂ ($n = 40$; 2 wt.% La) and LAE442 ($n = 40$; 4 wt.% Li, 4 wt.% Al, 2 wt.% rare earths) by investment casting [41]. The scaffolds were coated with MgF₂ using the conversion coating method (thickness between 450 and 1250 nm) and sterilized by gamma radiation (> 25 kGy, BBF Sterilisation Service GmbH, Kernen, Germany). The production process and the MgF₂ coating of the scaffolds is described in more detail in the literature [41]. A total of 40 commercially available, porous β -tricalcium phosphate implants (Cerasorb® M,

Curasan AG, Kleinostheim, Germany; TCP) with the same dimensions (\varnothing 4 mm, length 5 mm, total porosity 65%) served as a control group.

2.2 Animal model

The animal experiment was approved by the government of Upper Bavaria according to the Animal Welfare Act (approval number: 55.2-1-54-2532-181-2015). A total of 60 mature female Zika rabbits (Asamhof, Kissing, Germany; \varnothing weight: 3.96 ± 0.27 kg, age: > 6 months) were allocated to time groups of 6, 12, 24 and 36 weeks. For each time group, 10 scaffolds of both magnesium alloys and the TCP control group were randomly inserted into the cancellous part of the *trochanter major ossis femoris* of the rabbits. Using a 4 mm drill, an approximately 6 mm deep hole was drilled into the cancellous part of the greater *trochanter* and the scaffolds were inserted. The exact course of the surgical procedure, as well as anaesthesia and postoperative care, are described elsewhere [43]. After the respective implantation periods, the animals were sedated with ketamine (15 mg/kg, Anesektin®, Albrecht GmbH, Aulendorf, Germany) and medetomidine (0.25 mg/kg, Dorbene vet®, Zoetis Deutschland GmbH, Berlin, Germany), and euthanized by intravenous application of pentobarbital (182.3 mg/kg, Narkodorm®, CP-Pharma GmbH, Burgdorf, Germany) for the *ex vivo* examinations.

2.3 *Ex vivo* μ CT

Both femora were explanted, and all soft tissue was removed to harvest the implantation sites with a diamond band saw (Cut-grinder, patho-service GmbH, Oststeinbek, Germany). For the following investigations, the bone-scaffold compounds were fixed in a 4% formaldehyde solution for at least 14 days and positioned upright in plastic tubes fixed with foam sponges. Subsequently, *ex vivo* μ CT scans of the bone-scaffold compounds were performed with a μ CT80 (Scanco Medical AG, Brüttisellen, Switzerland). The scan settings were: 600 ms, 70 kVp and 114 μ A with a resolution of 10 μ m. The scaffolds were manually contoured in the original scans and reoriented (Software μ CT Evaluation Program V6.6, Scanco Medical, Zurich, Switzerland) to improve the comparability as the cross-sections allowed better assessment of the scaffolds with their immediate surroundings. In order to determine the degradation of the magnesium scaffolds, scans were performed before implantation with the same scan settings and compared with the *ex vivo* scans.

2.3.1 Semi-quantitative analysis

A semi-quantitative scoring system modified according to Lalk *et al.* was used to evaluate the μ CT80 images of all scaffolds [44]. The parameters scaffold degradation and scaffold shape, as well as the parameters gas within and in the direct surroundings of the scaffolds were evaluated. In addition, the structure of the surrounding cancellous bone was assessed in two areas of the scaffolds (upper and lower half of the scaffold). The integration of scaffold into bone (bone-to-scaffold contact) was evaluated on 10 cross-sections (5 pore and 5 strut levels each; cf. Fig. 1a). Based on these cross-sections, the bone within the scaffolds was evaluated in an outer and an inner ring (Fig. 1b). For the TCP control group, the parameters degradation and scaffold shape were not examined due to different material properties. Score values ranged from 0 for physiological/original to 4 for clearly altered (Table 1).

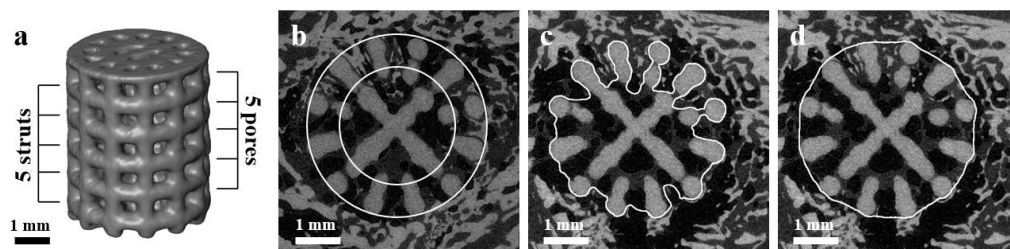


Fig.1 (a) geometry of the scaffolds featuring 5 pores and 5 struts and (b) cross section with outer and inner ring for semi-quantitative analysis; (c) basic contour and (d) extended contour for quantitative analysis of μ CT80 scans

Table 1

Scoring system for semi-quantitative μ CT80 evaluation, modified according to Lalk et al. [36]

Parameters	Score 0	Score 1	Score 2	Score 3	Score 4
Degradation	Not observed	Thin degradation layer	Clear degradation layer	> 50% of scaffold degraded	Complete degradation
Shape of scaffold	Original	Slight changes on surface	Small portions detached	Large scaffold parts detached, > 50% altered	Complete loss of shape
Gas within/directly around scaffold	Not observed	Diffuse and few small bubbles	> 25% pores or surface filled/covered	> 50% pores or surface filled/covered	Pores/surface completely filled/covered
Structure of cancellous bone in vicinity	Physiologically wide-meshed	Thick (> 100 μ m) and thin (< 100 μ m) trabeculae	Narrow-meshed (on average 50 μ m) with occasional thick (> 100 μ m) trabeculae	Small bone particles	No bone
Integration of scaffold into bone	Broad contact area to adjacent cancellous bone through many trabeculae, no/only fractional gap	Contact to adjacent cancellous bone through several trabeculae, sporadic gaps	Contact to adjacent cancellous bone through few trabeculae, clear gaps	One contact to adjacent cancellous bone, manifest gaps	No contact to adjacent cancellous bone, manifest gap
Bone within scaffold outer/inner ring	> 10% of pores with bone	6 - 10% of pores with bone	2 - 5% of pores with bone	1% of pores with bone	No bone

2.3.2 Quantitative analysis

A threshold (LAE442 160, La2 186, TCP 360) was determined for each material group and applied for the subsequent evaluations. In order to calculate the volume, density and surface area of the scaffolds after the respective implantation period of 6, 12, 24 or 36 weeks, the residual scaffolds in the reoriented scans were manually contoured by excluding the ingrown bone (basic contour; Fig. 1c). This analysis was also performed for the magnesium scaffolds before implantation to obtain the baseline values.

In order to determine the amount of bone inside the scaffolds, an extended contour was created based on the exact scaffold rims (Fig. 1d). Therefore, the difference between the extended and the basic contour was defined as ingrown bone.

A total of seven scaffolds per material and time group were quantitatively investigated. The analyses were performed using μ CT80 scans if scaffold material could be detected and contoured. Otherwise, the scans were assessed descriptively.

2.4 Histological examination

The bone-scaffold compounds were removed from the 4% buffered formaldehyde solution and were dehydrated in a series of increasingly concentrated alcohol solutions, ending in 100%. Subsequently, xylene served as the intermedium before the samples were embedded in a plastic resin based on methyl methacrylate (Technovit® 9100, Heraeus Kulzer, Wehrheim, Germany). Using the cutting and grinding technique according to Donath, cross-sections of 70 μ m thickness were produced [45]. A central cross-section (level with pores not struts) of each bone-scaffold compound was then stained with toluidine blue O (Waldeck, Münster, Germany) [46]. The histological examinations were performed using a Zeiss Axio Imager 2 microscope (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Germany) and Zeiss ZEN2 software (Carl Zeiss Microscopy, Jena, Germany). The samples were assessed semi-quantitatively using a scoring system, whereby score values between 0 and 3 were assigned for all parameters (Table 2).

Table 2

Scoring system for the histological evaluation of the bone-scaffold compound cross-sections

Parameters	Score 0	Score 1	Score 2	Score 3
Scaffold material	0%	1 - 25%	26 - 50%	> 50%
Cracks				
Gas within/adjacent				
Bone resorption				
Bone	0%	1 - 10%	11 - 25%	> 25%
Non-mineralized bone matrix				
Granulation tissue				
Fibrous capsule	none	mild	moderate	severe
Fibrous cells (tissue)	none	few	moderate	many
Vascularization (blood vessels)				
Macrophages	none	few	moderate	many
FBCs				
Lymphocytes				
Neutrophil granulocytes				

At 25x magnification, a circle with a 4 mm diameter was placed around the scaffolds and the amount of scaffold material (total/cracked), bone, non-mineralized bone matrix, granulation tissue and gas were examined (Fig. 2). Furthermore, the parameters resorption of bone and fibrous capsule formation in the immediate vicinity of the scaffolds were assessed. For the evaluation of gas bubbles, the presence of thin fibrocyte borders was investigated to distinguish between bubbles formed *in vivo* by degradation and those formed by the preparation process.

Blood vessels and cells (fibrocytes, macrophages, FBCs, neutrophil granulocytes and lymphocytes) were examined at 100x magnification in four areas: within a central, medial and peripheral ring in the scaffold, and direct scaffold vicinity (Fig. 2).

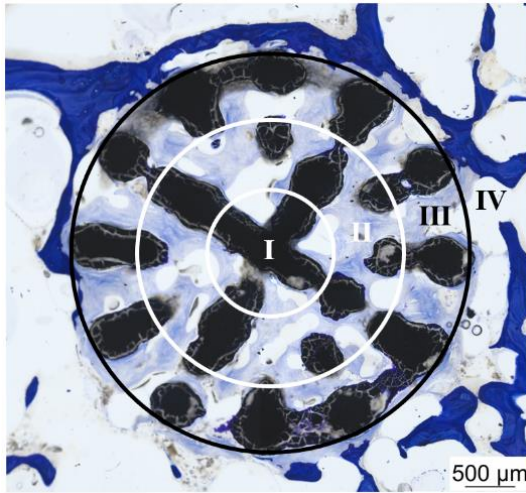


Fig. 2 Histological image of scaffold cross-section; evaluation at 25x magnification, subdivided in two areas: inside and outside black circle (4 mm); evaluation at 100x magnification, subdivided in four areas: central ring (I), medial ring (II) and peripheral ring (III), and direct scaffold vicinity (IV)

2.5 SEM/EDX

The *in vitro* and *ex vivo* degradation behaviour of the two scaffolds LAE442 and La2 was already comparatively investigated using scanning electron microscopy (SEM) and energy dispersive X-ray spectroscopy analysis (EDX) in an earlier study [2]. Based on these results and the histological results from the present study, selected SEM and EDX analyses were performed with a SUPRA 55 VP (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Germany) to investigate areas of special interest (degradation layer, MgF₂ coating, bone-to-scaffold contact, cell clusters). An acceleration voltage of 15 kV and a working distance of 20 - 25 mm for the overview images and 7.8 - 9.8 mm for the close-up images were used. Carbon and oxygen were excluded, as it is difficult to quantify their amount by EDX analysis.

2.6 Statistics

The data were statistically evaluated using SPSS Statistics 25.0. Since the data were not normally distributed, Kruskal-Wallis tests were used for the evaluation and a pairwise comparison was performed with subsequent single-functional ANOVA. Subsequently, adjustments were made using the Bonferroni correction. Quantitative data on the degradation of the magnesium scaffolds were investigated using the Mann-Whitney U-Test. In all analyses, a value of $p < 0.05$ was considered significant.

3. Results

3.1 *Ex vivo* μ CT

3.1.1 Semi-quantitative μ CT80 evaluations

Using μ CT80 images, the exact degradation behaviour of the scaffolds as well as the ingrowth of bone into the scaffolds were assessed (Fig. 3).

The LAE442 scaffolds showed an overall very slow and homogeneous degradation. After 6 and 12 weeks, only a thin degradation layer (score 1) was detected at the edge of the scaffolds. The scaffold shape remained unchanged (score 1) after 6 weeks and only slight surface changes (score 1) occurred after 12 weeks of implantation. After 24 and 36 weeks, all LAE442 (with one exception, week 24, score 1) showed a clearly recognizable degradation layer with small, detached parts of the scaffolds (score 2).

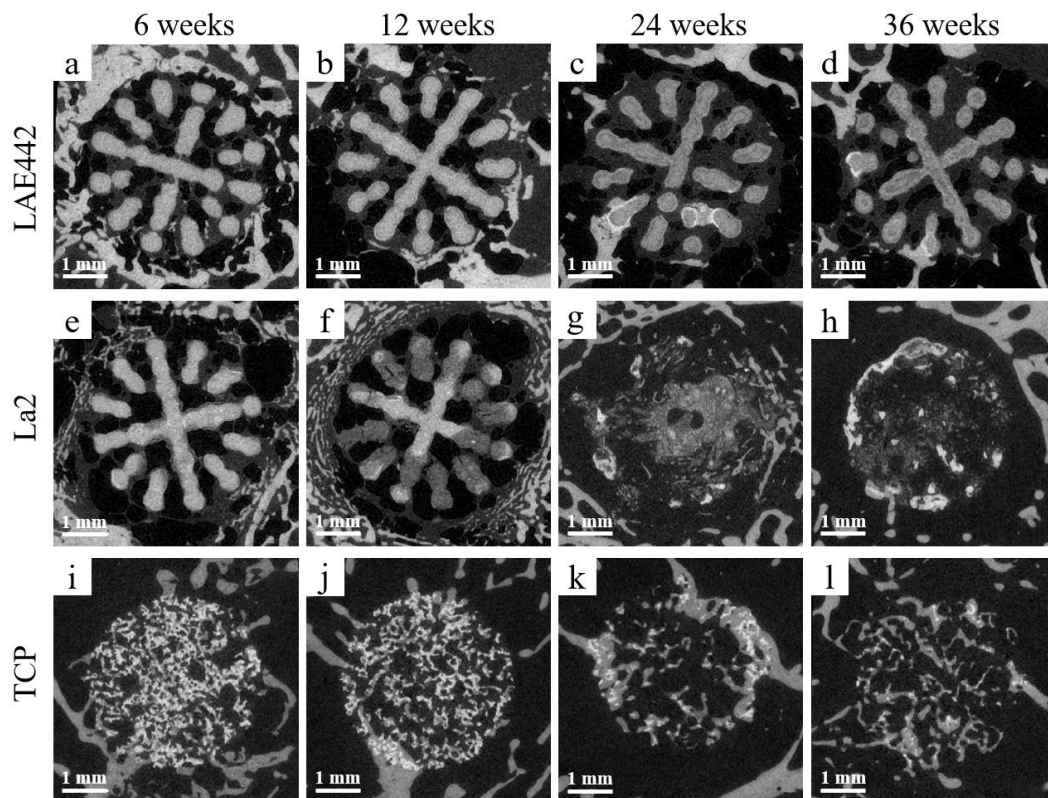


Fig. 3 μ CT80 images of cross-sections; progression of degradation of the scaffolds after implantation periods of 6, 12, 24 or 36 weeks; (a – d) LAE442, (e – h) La2 and (i – l) TCP

Bright inhomogeneous areas could be observed after 6 weeks on the LAE442 scaffolds (Fig. 4a), which increased strongly in size and number until week 36. In contrast, the La2 scaffolds showed rapid and inhomogeneous degradation. After 6 weeks, a clear degradation layer (score 2) was visible with detachment of increased small and occasionally large scaffold particles (score 2 and 3). A single La2 scaffold was already completely degraded (score 4). More than 50% of the La2 scaffolds were degraded after 12 weeks (score 3; with one exception, score 2), and large portions of the scaffolds were separated (score 3). From 24 weeks onwards, all La2 scaffolds (with one exception, week 24, score 3) were completely degraded and the shape of the scaffold was no longer recognizable (score 4). Overall, the La2 scaffolds showed significantly faster degradation and loss of shape in all week groups compared to the LAE442 scaffolds ($p < 0.001$).

In contrast to the TCP control group, accumulation of gas could be detected in the scaffolds made from the two magnesium alloys. The highest accumulation of gas was found in La2 after 12 weeks. More than 50% of the internal space (pores) was filled with gas and more than 50% of the direct surface was surrounded by gas. Subsequently, at week 24 only small amounts of gas were observed and at week 36 no gas was found. In contrast, LAE442 showed a relatively constant gas accumulation directly around the scaffolds, which covered at least 25% and sometimes more than 50% of the surface, over all observation times. Within the LAE442 scaffolds, more than 25% and up to 50% of the interstices were filled at the early implantation points, and mainly small gas bubbles were observed at the later implantation points.

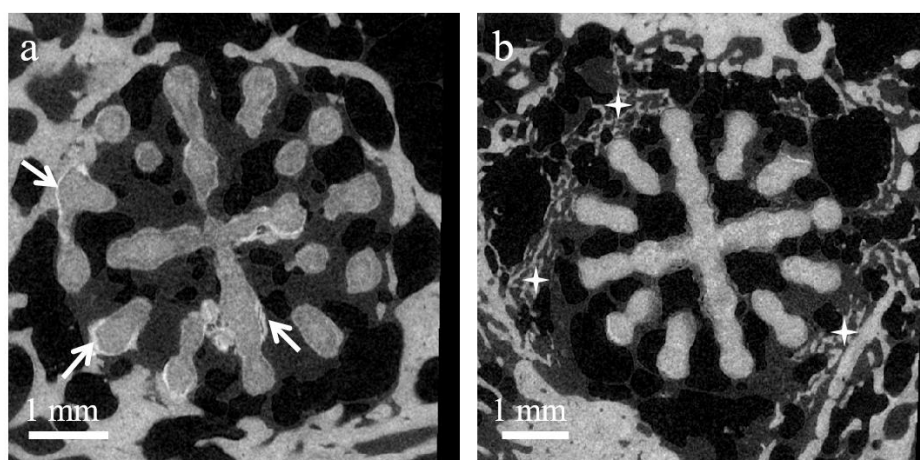


Fig. 4 μ CT80 images: (a) LAE442 scaffold 36 weeks after implantation, arrow: bright appearing deposits (Ca/P) on scaffold surface; (b) La2 scaffold 6 weeks after implantation, star: narrow-meshed bone trabeculae

In all time groups, bone in the vicinity of the LAE442 scaffolds mainly showed a mixture of thick and thin trabeculae, which was more pronounced in the upper half of the scaffolds near the drill hole (Fig. 5a). In the lower part near the medullary canal, thin, narrow-meshed bone trabeculae and occasionally only small bone particles could be observed around the LAE442 scaffolds. The structure of the cancellous bone around the La2 scaffolds was very inhomogeneous. In all week groups, often only very small bone fragments and in some cases a mixture of mostly thin and thick trabeculae occurred (Fig. 5a). In some cases of the 6 - and 36 - weeks group, no bone was found in the vicinity of the La2 scaffolds. An increased occurrence of thin, narrow-meshed bone trabeculae was observed after 12 and 24 weeks (Fig. 5b). The TCP control group showed mainly a widely cross-linked, spongy bone and occasionally a mixture of thick and thin trabeculae in all time groups (Fig. 5a).

For the parameter “integration of scaffold into bone”, LAE442 showed an average of one direct contact per cross-section at all observation times, with a slight increase after 36 weeks. Although several bone trabeculae and in some cases large bone bridges occurred around most of the LAE442 scaffolds, these did not have direct contact to the scaffold but were separated by narrow gaps. However, isolated LAE442 scaffold areas also showed larger distances to the surrounding cancellous bone (Fig. 5b). The La2 scaffolds also showed on average one direct contact per cross-section after 6 and 12 weeks. Compared to LAE442, the distances between the surrounding cancellous bone and the La2 scaffolds were considerably larger. In the La2 week group 24 and 36, increased contact between a few bone trabeculae and the degraded scaffold residues could be detected (Fig. 5b). The TCP implants showed close contact to the cancellous bone through several bone trabeculae punctuated with isolated gaps at all observation times (Fig. 5b).

For the parameter “bone in the scaffold”, about 2 - 5% bone was observed in the LAE442 scaffolds after 6 weeks in 5/10 scaffolds in the outer ring and about 1% bone in 3/10 scaffolds in the inner ring (Fig. 5c and d). In the remaining LAE442 scaffolds, no bone could be found after 6 weeks. At the subsequent implantation points, bone ingrowth in the pores became increasingly inhomogeneous, with the majority showing no bone or isolated small bone fragments in the outer area. However, in a few samples up to 10% bone within the pores of the LAE442 scaffolds could be observed. In comparison, no bone within the pores could be detected after 6 and 12 weeks in the La2 scaffolds. After 24 and 36 weeks, about 2

- 5% bone in the outer area between the degraded scaffold residues could be observed. In the inner area, small bone trabeculae occurred only in single cases after 24 weeks of implantation. After 36 weeks, no bone was visible in the centre (Fig. 5c and d). The TCP implants showed the best values within the pores after 6 and 12 weeks, with an average of about 6 - 10% bone in the outer ring and 2 - 5% in the inner ring. After 24 and 36 weeks, TCP had over 10% bone in the outer ring and about 6 - 10% in the inner ring (Fig. 5c and d). Within the TCP implants, significantly more bone was found at all observation times than in the magnesium scaffolds ($p < 0.001$). LAE442 showed significantly more bone in the outer ring after 6 and 12 weeks ($p < 0.001$) in comparison to La2. At the original implantation site of La2, significantly more bone was observed after 24 and 36 weeks ($p < 0.001$) as compared to LAE442.

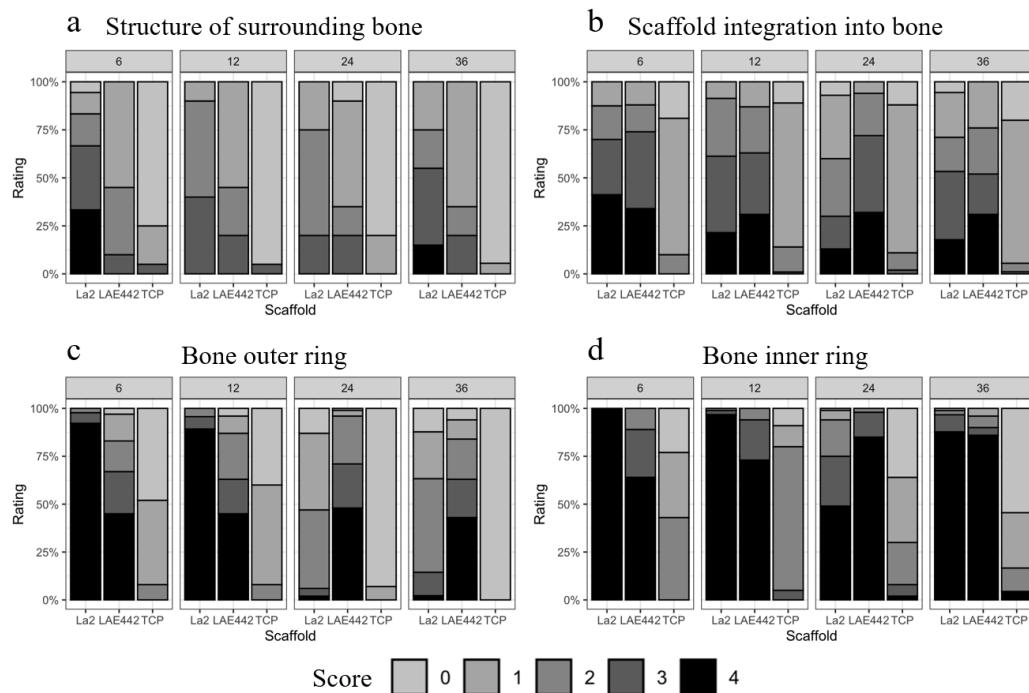


Fig. 5 Semi-quantitative analysis of the μ CT80 scans showing the parameters after the implantation periods of 6, 12, 24 and 36 weeks: (a) structure of surrounding bone, (b) scaffold integration into bone, (c) bone in outer ring and (d) bone in inner ring; score values ranged from 0 for physiological/original to 4 for clearly altered (Table1)

2.1.2 Quantitative μ CT80 evaluation

Due to the almost complete degradation of the La2 scaffolds after 24 and 36 weeks, the quantitative evaluations for these scaffolds could only be performed for the observation times 6 and 12 weeks.

Continuous and slow degradation of the scaffolds was observed in the LAE442 group, which was accompanied by a volume loss of 7.46% (2.7 mm^3) by week 36. In comparison, a volume loss of 62.72% (22 mm^3) with inhomogeneous degradation behaviour could already be observed in the La2 scaffolds after 12 weeks. The LAE442 scaffolds showed significantly more volume ($p = 0.001$) as compared to La2 at week 6 and 12. In terms of density, the LAE442 scaffolds showed a slight increase at all observation times as compared to their original density. A similar increase in density was observed in the La2 scaffolds after 6 and 12 weeks (Fig. 6a and b).

Analysis of the ingrown bone of LAE442 after 6 weeks revealed an average of 0.55 mm^3 bone-like fractions in the pores of the scaffolds. After 12 and 24 weeks, the proportion of bone in the pores decreased, and at 36 weeks an average of 0.36 mm^3 bone-like fractions within the pores could be observed (Fig. 6c). In the La2 scaffold, bone-like fractions averaging 0.05 mm^3 after 6 weeks and small bone fragments averaging 0.19 mm^3 after 12 weeks were observed in the outermost region of the already severely degraded scaffold sections (Fig. 6c). In the TCP control group, many small bone trabeculae between the implant residues (average 24.29 mm^3 bone) could be detected after 6 weeks. At all subsequent observation times, fewer but thicker bone trabeculae (average 18.64 mm^3 bone) occurred, which enclosed the remaining implant parts.

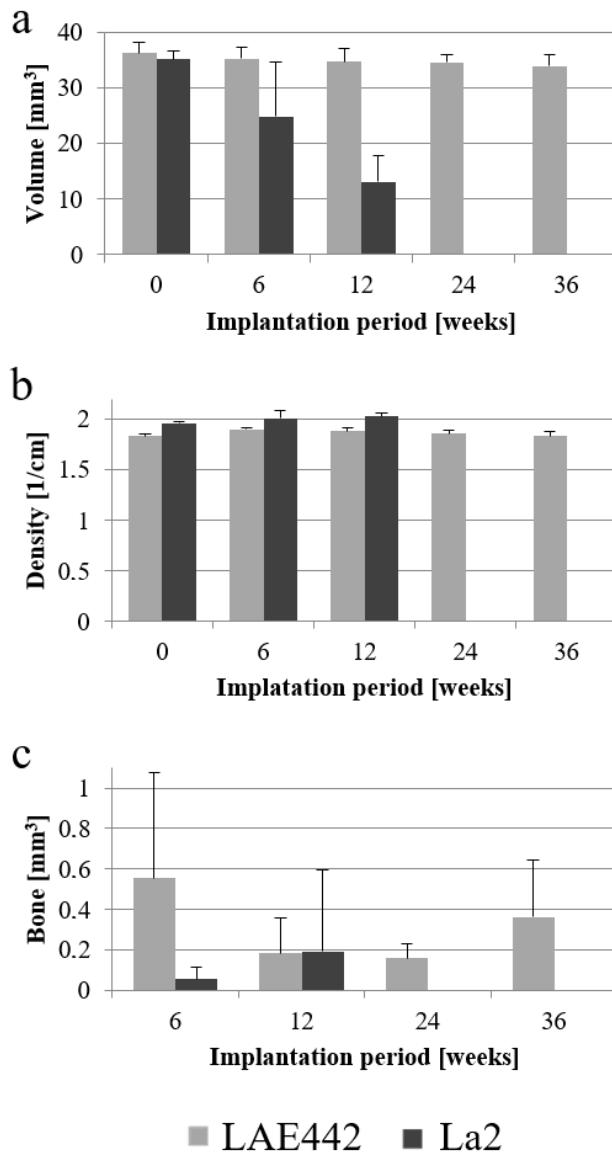


Fig. 6 Quantitative μ CT80 evaluation of magnesium scaffolds LAE442 and La2: (a) scaffold volume; (b) scaffold density, (c) bone within the scaffold pores; (La2 scaffolds after 24 and 36 weeks were non-evaluable)

3.2 Histological examination

In the evaluation of the central cross-section, the La2 scaffolds showed rapid degradation with significantly less scaffold material ($p < 0.001$) after 24 and 36 weeks as compared to LAE442 (Fig. 7a - h). In contrast, the LAE442 scaffolds remained relatively constant with respect to the amount of material and only showed an increasing amount of "cracked" degradation layer until week 36.

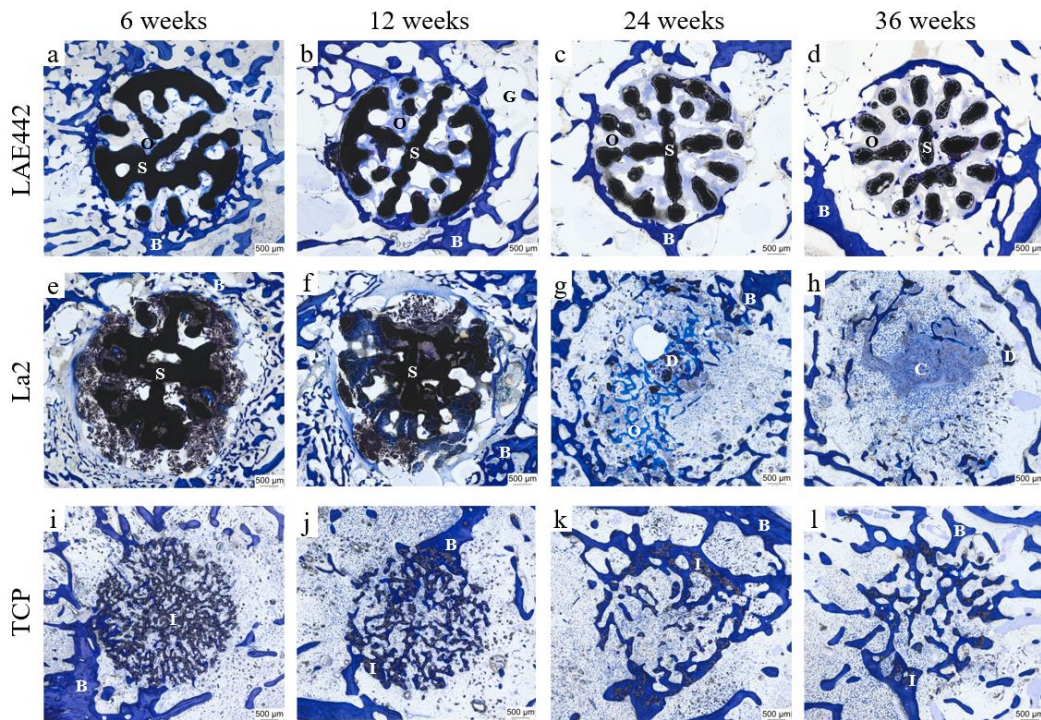


Fig. 7 Histological cross sections of LAE442, La2 and TCP, toluidine blue: (a – d) LAE442, (e – h) La2 and (i – l) TCP; B = bone, G = gas, O = osteoid-like non-mineralized bone matrix, S = scaffold material (magnesium), I = implant material (TCP), FC = fibrous capsule, D = debris, C = cell cluster

Until week 12, LAE442 showed more bone within the scaffolds in the central cross-section as compared to La2. After 24 weeks, more bone in the form of thin bone trabecula between the La2 residues was observed as compared to LAE442. These bone trabeculae decreased again after 36 weeks in the area of the original scaffold localization of La2 (Fig. 8b).

LAE442 in particular showed an increasing amount of poorly mineralized, osteoid-like bone matrix within the scaffold pores of more than 25% by week 24, with an increasing number of empty osteocyte lacunae over time. Between the remains of the La2 scaffolds, poorly mineralized bone matrix was also observed after 24 and 36 weeks (Fig. 8c).

After 6 and 12 weeks, granulation tissue was rarely present in La2 and only in the peripheral area of these scaffolds. The La2 scaffolds showed a strong accumulation of gas within the scaffolds. From week 24 onwards, a small accumulation of gas and more granulation tissue between the scaffold residues of La2 were observed. No gas could be detected in La2 after 36 weeks (Fig. 8a and d). Within the LAE442 scaffolds, the low to moderate gas accumulation as well as the amount of

granulation tissue (< 10%), which was also found in the scaffold centre, decreased slightly over the observation period (Fig. 8a and d). After 24 and 36 weeks, LAE442 showed significantly less granulation tissue ($p < 0.001$) and after 36 weeks significantly more gas ($p < 0.001$) compared to the La2 scaffolds. In the TCP control group, no gas in and around the scaffolds and more than 25% granulation tissue within the implants could be observed at all time groups (Fig. 8a and d).

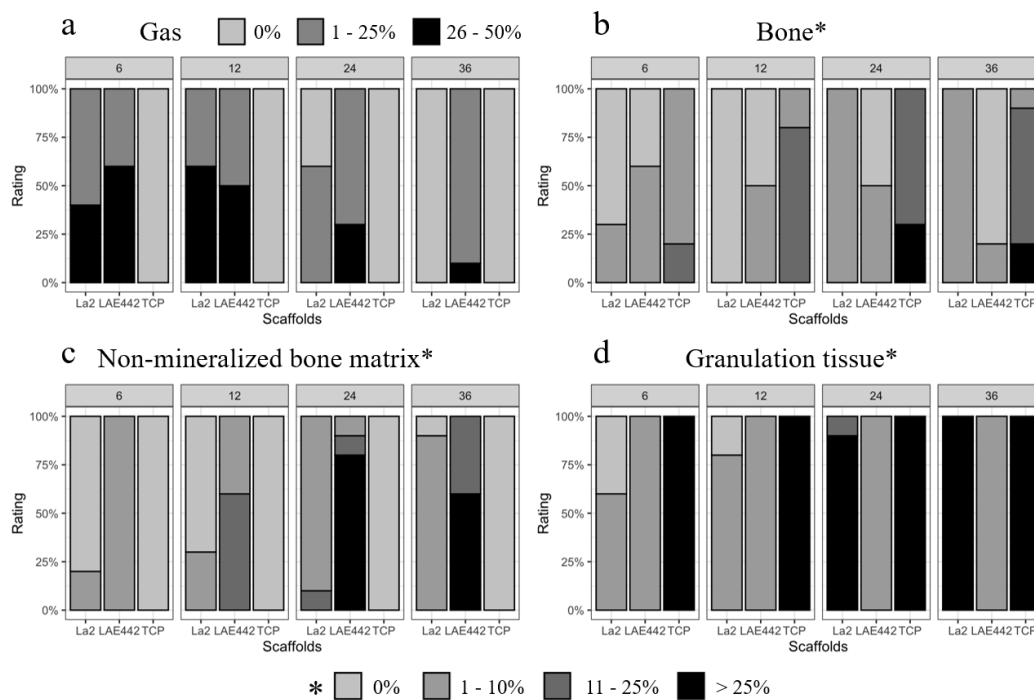


Fig. 8 Results of the histological evaluation (25x magnification) within the scaffold (4 mm diameter circle): (a) gas, (b) bone, (c) non-mineralized bone matrix, (d) granulation tissue

After 6 and 12 weeks, half of the La2 cross sections were surrounded by up to 50% by gas and in the other half over 50% of the implant surface was surrounded by gas. In two cases, after 24 weeks up to 25% of the remaining scaffold material was still covered by gas and after 36 weeks no gas was found around the La2 residues. In the LAE442 scaffolds, the gas accumulation in the direct vicinity of the scaffold remained relatively constant at all observation times between 25% - 50% (score 2) and over 50% (score 3) with a maximum after 24 weeks.

Direct bone-to-scaffold contact was observed only in single LAE442 cross-sections at several sites. In the majority of the LAE442 scaffolds, a connection between the scaffold material and the surrounding bone could be demonstrated via a poorly mineralized bone matrix (Fig 9a). The proportion of the poorly mineralized bone

substance surrounding the scaffold surface increased significantly over time. In La2, direct contact between the scaffold and the surrounding bone by isolated bone trabeculae was observed in individual cases after 6 and 12 weeks. Otherwise, strong resorption of the surrounding cancellous bone was visible. After 24 and 36 weeks, the remaining La2 scaffold residues were directly enclosed by bone.

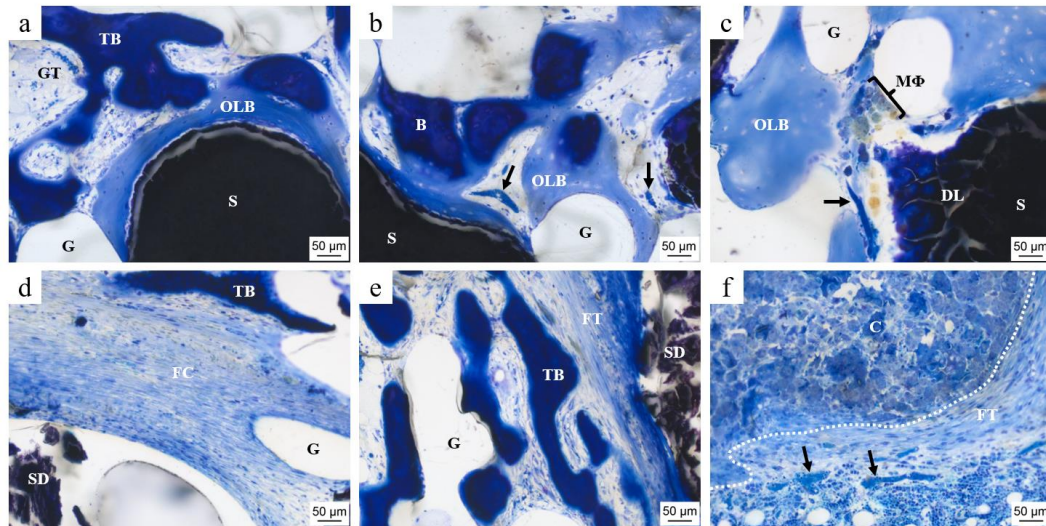


Fig. 9 Histological images, toluidine blue: (a, b) LAE442 after 6 weeks, (c) LAE442 after 24 weeks, (d, e) La2 after 12 weeks and (f) La2 after 36 weeks; S = scaffold, SD = scaffold debris, DL = degradation layer with cracks, B = bone, TB = trabecular bone, G = gas, GT = granulation tissue, OLB = osteoid-like bone matrix, FC = fibrous capsule, FT = fibrous tissue, C = cell cluster (macrophages and FBCs; marked with white dotted line), MΦ = macrophages (marked with black brace), black arrows = blood vessels

A fibrous capsule formation around the scaffolds was observed in La2 in varying degrees after 6 and 12 weeks (Fig. 9d and 10a). In addition, a strong network of thin trabeculae formed behind and between the fibrous tissue at some distance from the scaffolds (Fig. 9e). In comparison, only a moderate number of fibrocytes in the granulation tissue could be detected in LAE442 (Fig. 10a).

In the LAE442 scaffolds, a moderate number of blood vessels was found after 6 and 12 weeks (Fig. 9b and 10b), with slightly fewer blood vessels in the centre of the scaffolds as compared to the peripheral area. Subsequently, after 24 and 36 weeks, the number of blood vessels decreased and only a few were present within the scaffolds (Fig. 9c and 10b). In the La2 scaffolds, no or only isolated blood vessels could be observed in the marginal area of the scaffolds after 6 and 12 weeks of implantation. After 24 and 36 weeks, few blood vessels appeared between the

La2 residues. TCP showed a moderate number of blood vessels within the implant residues in all time groups (Fig. 10b).

LAE442 demonstrated an overall increasing but moderate number of macrophages and a few FBCs in and around the scaffolds over the entire observation period. In La2, no macrophages and FBCs were observed in the central or middle area of the scaffolds after 6 and 12 weeks. However, an increasing number of macrophages and FBCs occurred in the immediate vicinity of the La2 scaffolds (Fig. 10c and d). From week 24 onwards, a strong accumulation of macrophages and FBCs was observed in the centre of the original scaffold localization (Fig 9f). The TCP control group showed no foreign body reaction (macrophages and FBCs) and had sporadic neutrophil granulocytes. Overall, no signs of an inflammatory reaction could be observed in any material group.

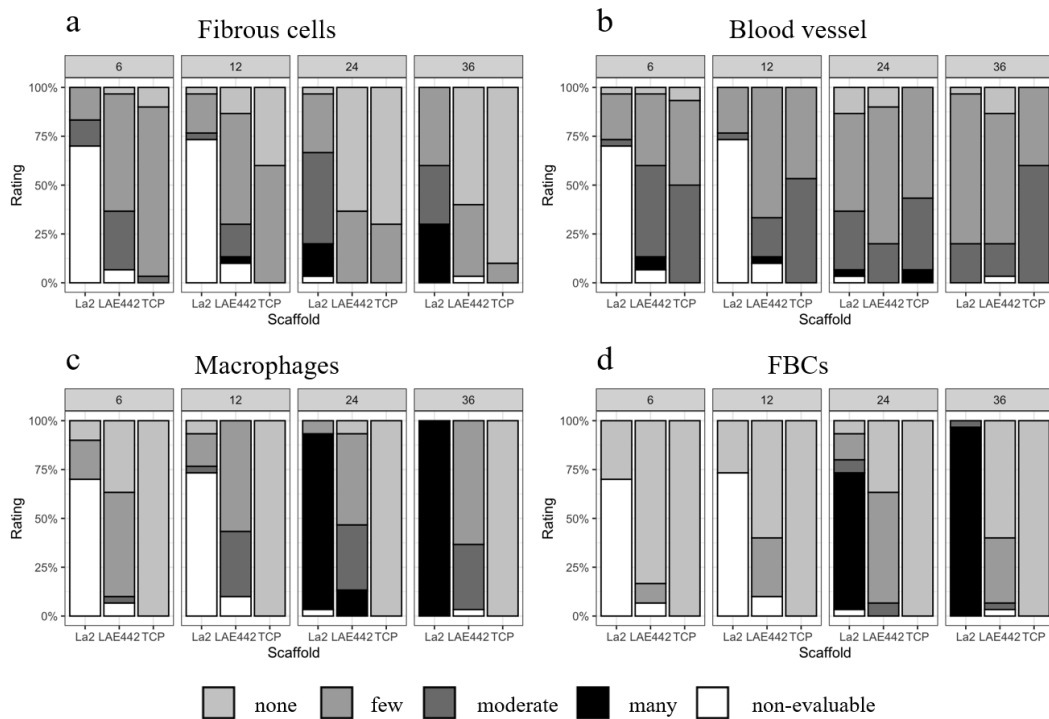


Fig. 10 Results of the histological evaluation (100x magnification) within the scaffold: (a) fibrous cells, (b) blood vessels, (c) macrophages, (d) FBCs in the scaffold

3.3 SEM/EDX

The SEM images of LAE442 revealed a darker degradation layer with increasing extent over time with an accumulation of calcium and phosphorus [2]. In some places the degradation layer had a double-layered structure with a bright outer and

a darker underlying part (Fig. 11 a and b). Comparing these two layers, the darker layer had a higher magnesium content and the brighter layer had a higher calcium and phosphorus content (Table 3). On the scaffold surface of LAE442, fluorine, a component of the MgF_2 coating, could be detected to varying extents depending on localization and implantation period. A general decrease could be observed to 0.8 wt.% fluorine after 36 weeks. Furthermore, the contact between the scaffold material of LAE442 and the surrounding bone was often observed via an intermediate matrix with calcium and phosphorus as the main components (Table 3). This scaffold-matrix-bone connection was increasingly observed in the implantation periods of 24 and 36 weeks (Fig. 11 c and d).

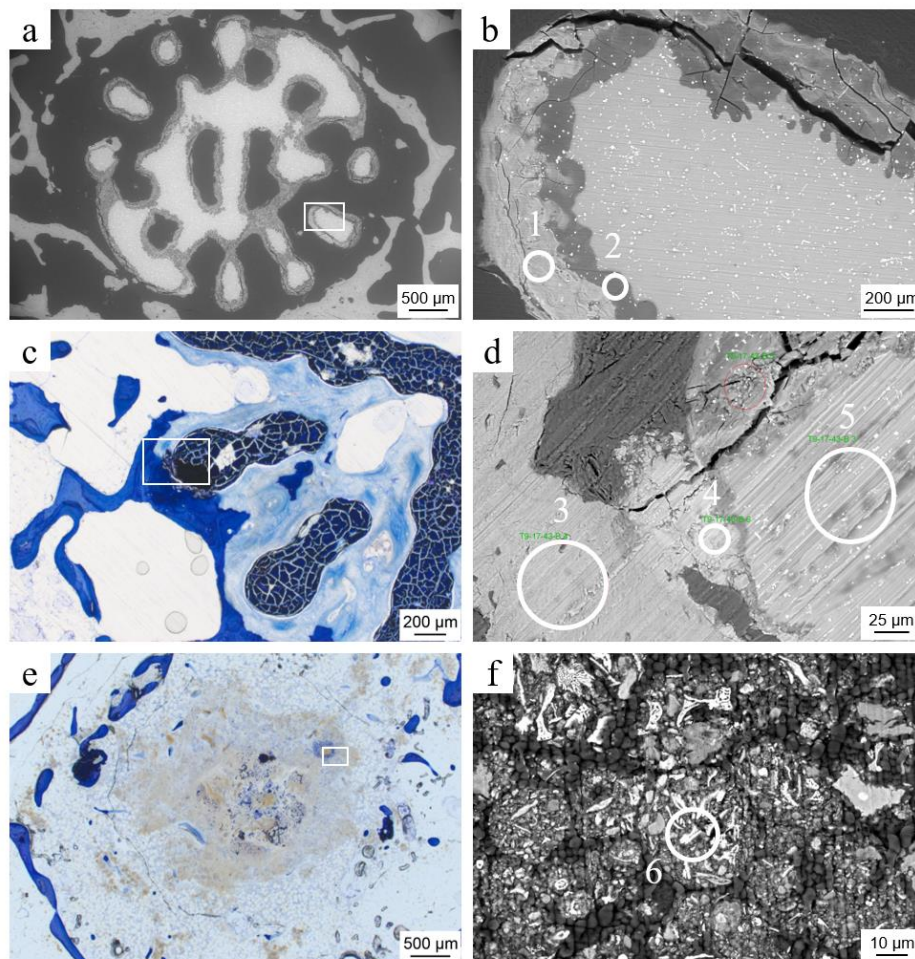


Fig. 11 SEM and histological images: (a, b) SEM images of LAE442 after 24 weeks, degradation layer, double-layered structure with bright outer (1) and darker underlying (2) part; (c) LAE442 after 36 weeks (d) magnification: intermediate matrix (4) as contact between bone (3) and scaffold (5); (e) La2 after 36 weeks: large cell clusters (macrophages and FBCs), (f) magnification: roundish structures with bright particles; positions (1 – 6) marked in (b), (b) and (f) indicate the locations of the EDX analyses presented in Table 3

In the La2 scaffolds, the scaffold material and the strongly increasing degradation layer could be identified in the SEM images only until 12 weeks after implantation. Thereby fluorine was detected on the scaffold surface with 22.8 wt.% after 6 weeks and 1.6 wt.% after 12 weeks. From week 24 on, small degraded scaffold particles, as well as bone and clusters of small, roundish structures (identified on the histological sections as cell clusters of macrophages and FBCs) could be observed in the original implantation area using SEM images (Fig. 11e and f). Within the described cell clusters, the EDX analysis of a La2 cross-section after 36 weeks showed a strong accumulation of lanthanum of up to 67.3 wt.% (Table 3).

Table 3

EDX data for LAE442 and La2 scaffolds: LAE442 after 24 weeks, degradation layer, dark part (position 1) and bright part (position 2); LAE442 after 36 weeks, bone-to-scaffold contact, bone (position 3), intermediate matrix (position 4), scaffold (position 5); La2 after 36 weeks, cell clusters, within a cell (position 6); Positions 1 to 6 are marked in Fig. 10

Element	Concentration in wt.%					
	LAE442 24 weeks		LAE442 36 weeks			La2 36 weeks
	1	2	3	4	5	6
Mg	72.7	32.0	7.8	23.1	89.2	1.0
Al	12.9	4.5	0.7	2.6	3.4	1.6
La	0.2				0.6	67.3
Ce	1.3	2.0			1.1	
Si	0.3	0.2	0.8	0.2	0.5	
P	3.8	17.7	26.3	17.6	1.6	18.7
Ca	6.8	41.4	62.4	53.9	3.0	9.2
Na	1.1	2.2	1.6	2.5		
S	0.1		0.4		0.6	1.1
K						0.2
Fe						1.0
Mn	0.4					
Cl	0.4			0.2		

4. Discussion

The objective of the present study was to compare the biocompatibility, the ingrowth of the surrounding tissue and the degradation behaviour of the magnesium scaffolds La2 and LAE442 with defined interconnecting pores *in vivo*. Commercially available porous β -tricalcium phosphate (TCP) implants of the same dimensions served as a control group. So far, the alloy LAE442 has been investigated in many *in vivo* studies only as solid implants, such as intramedullary pins or screws [27-29]. The binary alloy Mg-La2 exhibited good properties *in vitro*, allowing the investigation of this alloy *in vivo* [32]. Previous investigations focused mainly on magnesium scaffolds with a random and irregular pore distribution [7, 33, 40, 44, 47]. In order to increase the reproducibility and stability of the implants, magnesium scaffolds with defined pore structures were developed for this study. *In vitro* investigations by Julmi *et al.* showed sufficient stability of the open-pored magnesium scaffolds LAE442 and La2 to withstand the forces occurring in the rabbit bone [41]. In the study by Kleer *et al.*, these two alloys LAE442 and Mg-La2 were examined *in vivo* in the form of open-pored magnesium scaffolds in the rabbit model by means of clinical, radiological and μ CT analyses, and LAE442 in particular showed a slow and homogenous degradation [43]. In the present *in vivo* study, each bone-scaffold compound was examined in more detail after the respective observation time of 6, 12, 24 or 36 weeks using high-resolution μ CT80 scans. In addition, histological examinations were conducted to assess biocompatibility and EDX analyses were performed on cross-sections to evaluate the distribution of elements in areas of special interest.

Using *ex vivo* μ CT80 scans, the degradation of the scaffolds could be assessed in higher resolution compared to the *in vivo* μ CT images of the study by Kleer *et al.* [43]. The *ex vivo* scans revealed the degradation layer and bright deposits on the scaffolds. These bright deposits were probably the accumulation of calcium and phosphorus, as verified in the EDX analyses of the LAE442 scaffolds. In the μ CT80 images of LAE442 fine gaps were often visible between the surrounding bone trabeculae and the scaffold, which could not be detected in the *in vivo* investigations by Kleer *et al.* [43]. Using the histological sections these apparent gaps could be determined as an osteoid-like bone matrix. As described in other studies, this was a poorly mineralized bone matrix and therefore did not appear bone dense in the μ CT80 images [33, 48]. As a result, less frequent direct bone-to-scaffold contacts

were evaluated for LAE442 in the present study compared to the study by Kleer *et al.* [43]. As in the *in vivo* study [43], one direct bone-to-scaffold contact per cross-section was observed on average for the La2 scaffolds. In most cases, one thick bone trabecula grew from the periphery directly to the La2 scaffolds with otherwise large gaps to the surrounding cancellous bone. This observation of inhomogeneous integration also occurred in the study by Lalk *et al.* on porous AX30 magnesium scaffolds with CaP-coating. Many of the scaffolds had completely lost contact with the surrounding cancellous bone and exhibited wide gaps [33].

In the μ CT80 images, isolated bone dense islands within the pores of the LAE442 scaffolds were observed, most of which had no direct contact to the scaffold material. This phenomenon of isolated bone islands was also observed by Lalk *et al.* within the pores of the MgF_2 -coated AX30 scaffolds. These bony islands were surrounded by poorly mineralized bone matrix which did not appear bone dense in μ CT80 [33]. The presence of poorly mineralized bone matrix could be confirmed in the present study using the histological sections.

In assessing the structure of the surrounding bone, TCP mainly showed a physiological wide-meshed bone structure, as also observed in the control group "empty drill holes" after 12 and 24 weeks in the study by Lalk *et al.* [33]. This wide-meshed bone could only be observed after 24 weeks around the AX30 MgF_2 -coated scaffolds and only in half of the CaP-coated scaffolds [33]. The remaining CaP-coated scaffolds showed only a narrow-meshed bone structure at 24 weeks [33], which could also be observed within a certain range around the La2 scaffolds after 6 and 12 weeks. In comparison, the LAE442 scaffolds in the present study exhibited a better bone structure in the immediate vicinity with mostly a mixture of thin and thick trabeculae and only a few large gaps.

μ CT80 images of the bone-scaffold compounds showed, accumulation of gas within and directly around the magnesium scaffolds, but not in the TCP control group. During the degradation of magnesium, hydrogen is formed, which accumulates if it cannot be sufficiently absorbed or removed by the surrounding tissue and blood vessels [13, 20]. However, in the *in vivo* study by Kleer *et al.* and in other studies, the accumulation of gas inside the bone had no clinical effects such as lameness or signs of pain on the animals [43, 49, 50].

The histological evaluation of implants is one of the most important methods for assessing their biocompatibility [51]. In the present study, as well as in many other studies [44, 52, 53], parameters such as newly formed bone and osteoid, the amount

of blood vessels and fibrous tissue, as well as inflammatory reactions and foreign body reactions (particularly evident in the presence of macrophages and FBCs) were examined.

In addition, the evaluation of the scaffold material in the present histological examination revealed "cracks" in the degradation layer of the LAE442 scaffolds to an increasing extent over the implantation periods. Ullmann *et al.* microscopically observed cracks on the implant surface of LAE442 pins after an implantation period of 6 months [30]. In the study by Rössig *et al.*, cracks in the degradation layer of the LAE442 implants in the sheep model were visible in the histological sections after 24 weeks [54]. As early as 1900, while investigating Mg implants for vascular surgery, Payr reported a rough surface on the implants after 24 hours and many furrows and cracks in the implants after 3 to 4 days up to the complete dissolution of the metal [55]. However, the "cracks" in the present study could also be artefacts formed in the more unstable degradation layer during the preparation of the histological samples. In the study by Kraus *et al.*, cracks in the oxide layer of Fe-based implants were attributed to dehydration during sample preparation [56]. Subsequent investigations are necessary to clarify this phenomenon and the possible impact on the stability of the scaffolds.

More bone within the scaffolds was found in LAE442 compared to La2 by week 12. Small, thin bone trabeculae were detected after 24 weeks in the original scaffold localization of La2, after only residuals of the scaffolds and hardly any gas remained. This phenomenon of regeneration of the surrounding bone was also observed in the study by Kraus *et al.* after almost complete degradation of ZX50 implants and thus decreasing gas formation [57].

In the present study, an increasing amount of poorly mineralized, osteoid-like bone matrix was found over the implantation periods, especially within the pores of the LAE442 scaffolds. A few pores of LAE442 were completely filled with this poorly mineralized bone matrix. The study by Lalk *et al.* also revealed unusually wide osteoid formations of up to 220 μm in the area of porous AX30 magnesium scaffolds [33]. To a lesser extent, this was also observed in the original scaffold localization of the La2 scaffolds after 24 and 36 weeks in the form of thin, poorly mineralized trabeculae. Significantly more osteoid compared to the control group was also found in the study by Witte *et al.* in the peri-implant area around the porous AZ91D scaffolds [40]. Besides other factors, the fluoride in the coating could lead to increased osteoid formation by stimulating osteoblastic activity and delay the

mineralisation of new bone. This mechanism was described by Mousny *et al.* after oral application of fluoride in a mouse model [48]. Furthermore, there is a controversial discussion in the literature about whether aluminium, which is a component of the LAE442 alloy, has a negative influence on mineralisation and delays this process [58-60]. The exact mechanisms of incomplete mineralization could not be conclusively clarified in this study. However, it appears to be a multifactorial process, since the osteoid-like bone matrix was present in both magnesium alloys to a different extent.

Within the pores of LAE442 scaffolds, a moderate number of blood vessels could be detected histologically in the early time groups (6 and 12 weeks), as well as within the TCP implants at all implantation times. In contrast, no blood vessels were found within the La2 scaffolds after 6 and 12 weeks and subsequently (24 and 36 weeks), as with the LAE442 scaffolds, only a few blood vessels were observed. Vascularisation in the area of the bone graft substitutes is of critical importance for osseointegration [9]. In the study by Cheng *et al.*, the 400-PMg scaffolds with the larger pores in a rabbit model showed higher vascularisation compared to the smaller pore size, which could be the reason for the increased bone formation [47]. Overall, the TCP control group showed the best vascularization and osseointegration in the present study, as well as the largest amount of ingrown bone compared to both magnesium scaffolds. However, the mechanical properties such as the stability of β -TCP are not sufficient for the application in weight-bearing bone defects [12].

The presence of macrophages and FBCs, as well as the formation of granulation tissue, is considered to be a normal response to implanted degradable biomaterials [4]. In the long-term study by Angrisani *et al.*, investigating intramedullary LAE442 pins in a rabbit model, the presence of macrophages and giant cells for removal of corrosion products of the LAE442 pins was assessed as good cellular compatibility [26]. Therefore, the mild to moderate presence of macrophages and FBCs in the LAE442 scaffolds is considered as a normal reaction to the biomaterial during the degradation process and indicates good biocompatibility. In comparison, no or hardly any granulation tissue and thus no cells were detected due to gas within the pores of the La2 scaffolds after 6 and 12 weeks. Subsequently, a very strong accumulation of macrophages and FBCs was observed in the original scaffold localization of the La2 scaffolds after 24 and 36 weeks, partially surrounded by fibrous tissue. Only a moderate number of fibrocytes occurred in the granulation

tissue of the LAE442 scaffolds, but there was no capsule formation. In comparison, the La2 scaffolds in the present study showed an overly rapid degradation, associated with a distinct fibrous capsule formation after 6 and 12 weeks. This formation of a fibrous capsule around a biomaterial is induced by the body to protect the surrounding host tissue [4]. Furthermore, in the present study, the increased accumulation of gas around the La2 scaffolds may also have influenced the extent of capsule formation. According to the study by Nuss *et al.*, the combination of a thick fibrous capsule and a high number of macrophages and FBCs indicates insufficient biocompatibility [4], as can be assumed for the La2 scaffolds.

In addition, the EDX analysis in the area of these cell clusters (macrophages and FBCs), which were observed in La2 scaffolds after 36 weeks, showed an increased concentration of lanthanum of up to 67.3 wt.%. Free lanthanides have an affinity to accumulate in the bone due to their similar physicochemical properties to calcium [61]. A progressive loss of membrane integrity in macrophages was observed in the *in vitro* study by Southwick *et al.* after exposure to lanthanum [62]. Feyerabend *et al.* reported a reduction in cell viability of the macrophage cell line RAW 264.7 after a lanthanum exposure time of 24 h [63]. Thus, the large clusters of macrophages and FBCs in the original scaffold localization of La2 could probably be associated with apoptosis of these cells due to the lanthanum accumulation.

Furthermore, the MgF₂ coating was investigated by means of EDX analysis. In the present study, about 2/3 of the original fluoride disappeared from the scaffold surface after 6 weeks and hardly any fluoride could be detected after 12 weeks. In contrast, Witte *et al.* described less than 1 wt.% fluoride on the implant surface after only 4 weeks and thus a complete disappearance of the initial MgF₂ coating (thickness 150 – 200 μm) on the LAE442 implants [29]. Despite the same alloy and coating manufacturing process, fluoride lasted longer in the present study than by Witte *et al.*, although the initial coating was much thinner. Subsequent studies with more frequent investigation time points would be necessary to accurately evaluate the reduction of corrosion provided by the MgF₂ coating.

The EDX analysis of the LAE442 scaffolds showed both an accumulation of calcium and phosphorus in the degradation layer and a deposition of both elements on the scaffold surface, as already described earlier [2]. This fact could explain the increasing density of the LAE442 scaffolds observed in μCT80 over time. In many other *in vivo* studies, this accumulation of a mineralized phase of calcium and phosphorus in the degradation layer of magnesium implants has been observed [30,

35, 64]. In the present study, these deposits of calcium and phosphorus on the LAE442 scaffolds showed direct contact to the surrounding bone, also described by Witte *et al.* for porous AZ91D scaffolds in a rabbit model [13].

5. Conclusion

In summary, the present study showed an inhomogeneous and fast degradation for La2. In addition, the La2 scaffolds exhibited an inadequate osseointegration with fibrous capsule formation in the early implantation periods and a foreign body reaction at later implantation periods. LAE442, on the other hand, showed direct bone-to scaffold contact, a homogeneous degradation behaviour and almost maintained its original shape up to 36 weeks. Within the pores of the LAE442 scaffolds vascularization, moderate cellular response, as well as granulation tissue and bone were observed at all implantation periods. Furthermore, osteoid-like bone matrix was detected on the scaffold surface and within the pores of LAE442. Based on the results of this study, porous LAE442 showed promise as degradable scaffolds for bone defect repair in terms of degradation behaviour and biocompatibility. However, further studies are needed to show it would have the necessary mechanical properties required over time for weight-bearing bone defects. Moreover, additional coatings (for example CaP) could further delay the degradation rate and gas production and might have a positive effect on the mineralisation of the osteoid-like bone matrix.

Acknowledgment

The authors gratefully acknowledge the financial support by the German Research Foundation (DFG) within the project "Interfacial effects and integration behaviour of magnesium-based sponges as bioresorbable bone substitute material" (funding number 271761343). Furthermore, the authors thank Lisa Wurm and Beatrix Limmer for their excellent technical support, Yury Zablotski for his help with the statistical analysis and Brigitte von Rechenberg for her input regarding the histological evaluation.

References

- [1] Liang H, Li X, Shimer A L, Balian G and Shen F H 2014 A novel strategy of spine defect repair with a degradable bioactive scaffold preloaded with adipose-derived stromal cells *Spine J* 14 445-54
- [2] Maier H J, Julmi S, Behrens S, Klose C, Gartzke A-K, Wriggers P, Waselau A-C and Meyer-Lindenberg A 2020 Magnesium Alloys for Open-Pored Bioresorbable Implants *JOM* 72 1859–69
- [3] De Long W G, Jr., Einhorn T A, Koval K, McKee M, Smith W, Sanders R and Watson T 2007 Bone grafts and bone graft substitutes in orthopaedic trauma surgery. A critical analysis *J Bone Joint Surg Am* 89 649-58
- [4] Nuss K M and von Rechenberg B 2008 Biocompatibility issues with modern implants in bone - a review for clinical orthopedics *Open Orthop J* 2 66-78
- [5] Karageorgiou V and Kaplan D 2005 Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis *Biomaterials* 26 5474-91
- [6] Yazdimamaghani M, Razavi M, Vashae D, Moharamzadeh K, Boccaccini A R and Tayebi L 2017 Porous magnesium-based scaffolds for tissue engineering *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 71 1253-66
- [7] Bobe K, Willbold E, Morgenthal I, Andersen O, Studnitzky T, Nellesen J, Tillmann W, Vogt C, Vano K and Witte F 2013 *In vitro* and *in vivo* evaluation of biodegradable, open-porous scaffolds made of sintered magnesium W4 short fibres *Acta Biomater* 9 8611-23
- [8] Klenke F M, Liu Y, Yuan H, Hunziker E B, Siebenrock K A and Hofstetter W 2008 Impact of pore size on the vascularization and osseointegration of ceramic bone substitutes *in vivo J Biomed Mater Res A* 85 777-86
- [9] Mavrogenis A F, Dimitriou R, Parvizi J and Babis G C 2009 Biology of implant osseointegration *J Musculoskelet Neuronal Interact* 9 61-71
- [10] Bohner M, Baroud G, Bernstein A, Doebelin N, Galea L, Hesse B, Heuberger R, Meille S, Michel P and von Rechenberg B 2017 Characterization and distribution of mechanically competent mineralized tissue in micropores of β -tricalcium phosphate bone substitutes *Materials Today* 20 106-15
- [11] von Doernberg M C, von Rechenberg B, Bohner M, Grunenfelder S, van Lenthe G H, Muller R, Gasser B, Mathys R, Baroud G and Auer J 2006 *In vivo* behavior of calcium phosphate scaffolds with four different pore sizes *Biomaterials* 27 5186-98
- [12] Dorozhkin S V 2010 Bioceramics of calcium orthophosphates *Biomaterials* 31 1465-85
- [13] Witte F, Kaese V, Haferkamp H, Switzer E, Meyer-Lindenberg A, Wirth C J and Windhagen H 2005 *In vivo* corrosion of four magnesium alloys and the associated bone response *Biomaterials* 26 3557-63

- [14] Ayvaz M, Bekmez S, Yucekul A, Mermerkaya M U and Tokgozogl u A M 2018 Titanium mesh cage as an alternative reconstruction method for epiphyseal-sparing tumour resections in children *J Pediatr Orthop B* 27 350-355
- [15] Segal U and Shani J 2010 Surgical management of large segmental femoral and radial bone defects in a dog: through use of a cylindrical titanium mesh cage and a cancellous bone graft *Vet Comp Orthop Traumatol* 23 66-70
- [16] Nagels J, Stokdijk M and Rozing P M 2003 Stress shielding and bone resorption in shoulder arthroplasty *J Shoulder Elbow Surg* 12 35-9
- [17] Staiger M P, Pietak A M, Huadmai J and Dias G 2006 Magnesium and its alloys as orthopedic biomaterials: a review *Biomaterials* 27 1728-34
- [18] Willbold E, Kalla K, Bartsch I, Bobe K, Brauneis M, Remennik S, Shechtman D, Nellesen J, Tillmann W, Vogt C and Witte F 2013 Biocompatibility of rapidly solidified magnesium alloy RS66 as a temporary biodegradable metal *Acta Biomater* 9 8509-17
- [19] Vormann J 2003 Magnesium: nutrition and metabolism *Mol Aspects Med* 24 27-37
- [20] Song G and Atrens A 2003 Understanding magnesium corrosion—a framework for improved alloy performance *Advanced Engineering Materials* 5 837-858
- [21] Janning C, Willbold E, Vogt C, Nellesen J, Meyer-Lindenberg A, Windhagen H, Thorey F and Witte F 2010 Magnesium hydroxide temporarily enhancing osteoblast activity and decreasing the osteoclast number in peri-implant bone remodelling *Acta Biomater* 6 1861-8
- [22] Witte F, Hort N, Vogt C, Cohen S, Kainer K U, Willumeit R and Feyerabend F 2008 Degradable biomaterials based on magnesium corrosion *Current opinion in solid state and materials science* 12 63-72
- [23] Willbold E, Gu X, Albert D, Kalla K, Bobe K, Brauneis M, Janning C, Nellesen J, Czayka W, Tillmann W, Zheng Y and Witte F 2015 Effect of the addition of low rare earth elements (lanthanum, neodymium, cerium) on the biodegradation and biocompatibility of magnesium *Acta Biomater* 11 554-62
- [24] Acar B, Kose O, Unal M, Turan A, Kati Y A and Guler F 2020 Comparison of magnesium versus titanium screw fixation for biplane chevron medial malleolar osteotomy in the treatment of osteochondral lesions of the talus *Eur J Orthop Surg Traumatol* 30 163-173
- [25] Atkinson H D, Khan S, Lashgari Y and Ziegler A 2019 Hallux valgus correction utilising a modified short scarf osteotomy with a magnesium biodegradable or titanium compression screws - a comparative study of clinical outcomes *BMC Musculoskelet Disord* 20 334
- [26] Angrisani N, Reifenrath J, Zimmermann F, Eifler R, Meyer-Lindenberg A, Vano-Herrera K and Vogt C 2016 Biocompatibility and degradation of LAE442-based

magnesium alloys after implantation of up to 3.5 years in a rabbit model *Acta Biomater* 44 355-65

[27] Krause A, Von der Höh N, Bormann D, Krause C, Bach F-W, Windhagen H and Meyer-Lindenberg A 2010 Degradation behaviour and mechanical properties of magnesium implants in rabbit tibiae *J Mater Sci* 45 624-632

[28] Thomann M, Krause C, Bormann D, Von der Höh N, Windhagen H and Meyer-Lindenberg A 2009 Comparison of the resorbable magnesium alloys LAE442 und MgCa0.8 concerning their mechanical properties, their progress of degradation and the bone-implant-contact after 12 months implantation duration in a rabbit model *Materialwissenschaft und Werkstofftechnik: Entwicklung, Fertigung, Prüfung, Eigenschaften und Anwendungen technischer Werkstoffe* 40 82-87

[29] Witte F, Fischer J, Nellesen J, Vogt C, Vogt J, Donath T and Beckmann F 2010 *In vivo* corrosion and corrosion protection of magnesium alloy LAE442 *Acta Biomater* 6 1792-9

[30] Ullmann B, Reifenrath J, Seitz J M, Bormann D and Meyer-Lindenberg A 2013 Influence of the grain size on the *in vivo* degradation behaviour of the magnesium alloy LAE442 *Proc Inst Mech Eng H* 227 317-26

[31] Hampp C, Angrisani N, Reifenrath J, Bormann D, Seitz J M and Meyer-Lindenberg A 2013 Evaluation of the biocompatibility of two magnesium alloys as degradable implant materials in comparison to titanium as non-resorbable material in the rabbit *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 33 317-26

[32] Weizbauer A, Seitz J M, Werle P, Hegermann J, Willbold E, Eifler R, Windhagen H, Reifenrath J and Waizy H 2014 Novel magnesium alloy Mg-2La caused no cytotoxic effects on cells in physiological conditions *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 41 267-73

[33] Lalk M, Reifenrath J, Angrisani N, Bondarenko A, Seitz J M, Mueller P P and Meyer-Lindenberg A 2013 Fluoride and calcium-phosphate coated sponges of the magnesium alloy AX30 as bone grafts: a comparative study in rabbits *J Mater Sci Mater Med* 24 417-36

[34] Fischerauer S F, Kraus T, Wu X, Tangl S, Sorantin E, Hanzi A C, Löffler J F, Uggowitz P J and Weinberg A M 2013 *In vivo* degradation performance of micro-arc-oxidized magnesium implants: a micro-CT study in rats *Acta Biomater* 9 5411-20

[35] Thomann M, Krause C, Angrisani N, Bormann D, Hassel T, Windhagen H and Meyer-Lindenberg A 2010 Influence of a magnesium-fluoride coating of magnesium-based implants (MgCa0.8) on degradation in a rabbit model *J Biomed Mater Res A* 93 1609-19

[36] Yu W, Zhao H, Ding Z, Zhang Z, Sun B, Shen J, Chen S, Zhang B, Yang K, Liu M, Chen D and He Y 2017 *In vitro* and *in vivo* evaluation of MgF₂ coated AZ31 magnesium alloy porous scaffolds for bone regeneration *Colloids Surf B Biointerfaces* 149 330-40

- [37] Zhao N, Workman B and Zhu D 2014 Endothelialization of novel magnesium-rare earth alloys with fluoride and collagen coating *Int J Mol Sci* 15 5263-76
- [38] Li Z, Shizhao S, Chen M, Fahlman B D, Debaio L and Bi H 2017 *In vitro* and *in vivo* corrosion, mechanical properties and biocompatibility evaluation of MgF₂-coated Mg-Zn-Zr alloy as cancellous screws *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 75 1268-1280
- [39] Seyedraoufi Z S and Mirdamadi S 2013 Synthesis, microstructure and mechanical properties of porous Mg-Zn scaffolds *J Mech Behav Biomed Mater* 21 1-8
- [40] Witte F, Ulrich H, Palm C and Willbold E 2007 Biodegradable magnesium scaffolds: Part II: peri-implant bone remodeling *J Biomed Mater Res A* 81 757-65
- [41] Julmi S, Krüger A-K, Waselau A-C, Meyer-Lindenberg A, Wriggers P, Klose C and Maier H J 2019 Processing and coating of open-pored absorbable magnesium-based bone implants *Materials Science and Engineering: C* 98 1073-86
- [42] Julmi S, Klose C, Krüger A-K, Wriggers P and Maier H J, Development of Sponge Structure and Casting Conditions for Absorbable Magnesium Bone Implants, TMS 2017 146th Annual Meeting & Exhibition Supplemental Proceedings, Springer, 2017, pp. 307-17.
- [43] Kleer N, Julmi S, Gartzke A-K, Augustin J, Feichtner F, Waselau A-C, Klose C, Maier H, Wriggers P and Meyer-Lindenberg A J M 2019 Comparison of degradation behaviour and osseointegration of the two magnesium scaffolds, LAE442 and La₂, *in vivo Materialia* 8 100436
- [44] Lalk M, Reifenrath J, Rittershaus D, Bormann D and Meyer-Lindenberg A 2010 Biocompatibility and degradation behaviour of degradable magnesium sponges coated with bioglass—method establishment within the framework of a pilot study *Materialwissenschaft und Werkstofftechnik* 41 1025-34
- [45] Donath K and Breuner G 1982 A method for the study of undecalcified bones and teeth with attached soft tissues. The Sage-Schliff (sawing and grinding) technique *J Oral Pathol* 11 318-26
- [46] Huehnerschulte T A, Reifenrath J, von Rechenberg B, Dziuba D, Seitz J M, Bormann D, Windhagen H and Meyer-Lindenberg A 2012 *In vivo* assessment of the host reactions to the biodegradation of the two novel magnesium alloys ZEK100 and AX30 in an animal model *Biomed Eng Online* 11 14
- [47] Cheng M Q, Wahafu T, Jiang G F, Liu W, Qiao Y Q, Peng X C, Cheng T, Zhang X L, He G and Liu X Y 2016 A novel open-porous magnesium scaffold with controllable microstructures and properties for bone regeneration *Sci Rep* 6 24134
- [48] Mousny M, Omelon S, Wise L, Everett E T, Dumitriu M, Holmyard D P, Banse X, Devogelaer J P and Grynypas M D 2008 Fluoride effects on bone formation and mineralization are influenced by genetics *Bone* 43 1067-74

- [49] Hampp C, Ullmann B, Reifenrath J, Angrisani N, Dziuba D, Bormann D, Seitz J M and Meyer-Lindenberg A 2012 Research on the biocompatibility of the new magnesium alloy LANd442—an *in vivo* study in the rabbit tibia over 26 weeks *Advanced Engineering Materials* 14 B28-B37
- [50] Erdmann N, Angrisani N, Reifenrath J, Lucas A, Thorey F, Bormann D and Meyer-Lindenberg A 2011 Biomechanical testing and degradation analysis of MgCa0.8 alloy screws: a comparative *in vivo* study in rabbits *Acta Biomater* 7 1421-8
- [51] Jansen J A, Dhert W J, van der Waerden J P and von Recum A F 1994 Semi-quantitative and qualitative histologic analysis method for the evaluation of implant biocompatibility *J Invest Surg* 7 123-34
- [52] Hofmann S, Hilbe M, Fajardo R J, Hagenmuller H, Nuss K, Arras M, Muller R, von Rechenberg B, Kaplan D L, Merkle H P and Meinel L 2013 Remodeling of tissue-engineered bone structures *in vivo* *Eur J Pharm Biopharm* 85 119-29
- [53] von der Höh N, Bormann D, Lucas A, Denkena B, Hackenbroich C and Meyer-Lindenberg A 2009 Influence of different surface machining treatments of magnesium-based resorbable implants on the degradation behavior in rabbits *J Advanced Engineering Materials* 11 B47-B54
- [54] Rossig C, Angrisani N, Helmecke P, Besdo S, Seitz J M, Welke B, Fedchenko N, Kock H and Reifenrath J 2015 *In vivo* evaluation of a magnesium-based degradable intramedullary nailing system in a sheep model *Acta Biomater* 25 369-83
- [55] Payr E 1900 Beiträge zur Technik der Blutgefäß- und Nervennaht nebst Mittheilungen über die Verwendung eines resorbirbaren Metalles in der Chirurgie *Arch. Klin. Chir.* 62 67-93
- [56] Kraus T, Moszner F, Fischerauer S, Fiedler M, Martinelli E, Eichler J, Witte F, Willbold E, Schinhammer M, Meischel M, Uggowitz P J, Loffler J F and Weinberg A 2014 Biodegradable Fe-based alloys for use in osteosynthesis: outcome of an *in vivo* study after 52 weeks *Acta Biomater* 10 3346-53
- [57] Kraus T, Fischerauer S, Treichler S, Martinelli E, Eichler J, Myrissa A, Zotsch S, Uggowitz P J, Loffler J F and Weinberg A M 2018 The influence of biodegradable magnesium implants on the growth plate *Acta Biomater* 66 109-17
- [58] Sedman A B, Alfrey A C, Miller N L and Goodman W G 1987 Tissue and cellular basis for impaired bone formation in aluminum-related osteomalacia in the pig *J Clin Invest* 79 86-92
- [59] Talwar H S, Reddi A H, Menczel J, Thomas W C, Jr. and Meyer J L 1986 Influence of aluminum on mineralization during matrix-induced bone development *Kidney Int* 29 1038-42

-
- [60] Quarles L D, Dennis V W, Gitelman H J, Harrelson J M and Drezner M K 1985 Aluminum deposition at the osteoid-bone interface. An epiphenomenon of the osteomalacic state in vitamin D-deficient dogs *J Clin Invest* 75 1441-7
- [61] Li W P, Ma D S, Higginbotham C, Hoffman T, Ketring A R, Cutler C S and Jurisson S S 2001 Development of an *in vitro* model for assessing the *in vivo* stability of lanthanide chelates *Nucl Med Biol* 28 145-54
- [62] Southwick F S, Li W, Zhang F, Zeile W L and Purich D L 2003 Actin-based endosome and phagosome rocketing in macrophages: activation by the secretagogue antagonists lanthanum and zinc *Cell Motil Cytoskeleton* 54 41-55
- [63] Feyerabend F, Siemers C, Willumeit R and Rosler J 2009 Cytocompatibility of a free machining titanium alloy containing lanthanum *J Biomed Mater Res A* 90 931-9
- [64] von der Höh N, von Rechenberg B, Bormann D, Lucas A and Meyer-Lindenberg A 2009 Influence of different surface machining treatments of resorbable magnesium alloy implants on degradation-EDX-analysis and histology results *Mat.-wiss. u. Werkstofftech.* 40 88-93

3. Fachkongresse

Teilergebnisse dieser Dissertation wurden auf folgenden Fachkongressen präsentiert:

Osteologie 2019, 28. – 30. März 2019, Frankfurt am Main; Osteology – Bone Metabolism and Skeletal Diseases 2019; 28: p 50

***In-vivo* Vergleich der Osseointegration und des Degradationsverhaltens der beiden Magnesium-Scaffolds La2 und LAE442**

N. Kleer, S. Julmi, A.-C. Waselau, H. J. Maier, A. Meyer-Lindenberg

30th Annual Conference of the European Society for Biomaterials, together with the 26th annual Conference of the German Society for Biomaterials, 9. – 13. September 2019, Dresden; Bioactive Materials for Bone regeneration

Degradation behaviour and biocompatibility of open-pored magnesium scaffolds LAE442 and La2 *in vivo*

N. Kleer, S. Julmi, L. Wurm, F. Feichtner, C. Klose, A. Meyer-Lindenberg

IV. DISKUSSION

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die beiden Magnesiumlegierungen Mg-La₂ und LAE442 in Form von zylindrischen Scaffolds mit definierten, interkonnektierenden Poren hinsichtlich ihres Degradationsverhaltens, ihrer Biokompatibilität und ihrer Osseointegration vergleichend zu untersuchen. Hierfür wurden die Scaffolds LAE442 und La₂ sowie die Kontrollgruppe β -Tricalciumphosphat (TCP) in einem Kaninchenmodell über einen Zeitraum von 6, 12, 24 oder 36 Wochen evaluiert. Die Scaffolds wurden beidseitig in den nicht-lasttragenden, spongiösen Anteil des *Trochanter major ossis femoris* von Kaninchen implantiert. *In vivo* Untersuchungen erfolgten mittels regelmäßiger klinischer, radiologischer und *in vivo* μ CT-Kontrollen. Anschließend wurden hochauflösende *ex vivo* μ CT-Aufnahmen und histologische Untersuchungen sowie REM- und EDX-Analysen des Knochen-Scaffold-Verbundes durchgeführt. Ein weiteres Ziel war es, anhand dieser Ergebnisse eine geeignete Magnesiumlegierung für weitere Untersuchungen im gewichtstragenden Knochen auszuwählen, um das Problem der Versorgung von belasteten Critical Size Defekten zu adressieren.

Für die vorliegende Studie wurde das Kaninchen als Tiermodell gewählt, da es in der orthopädischen Forschung gut etabliert ist und im Vergleich zu Großtiermodellen früh die skelettale Reife erreicht (Wancket 2015). Die Eignung der Implantationsstelle im spongiösen Bereich des *Trochanter major ossis femoris* zur Prüfung von porösen Implantaten auf Mg-Basis wurde bereits in zwei Studien von Lalk *et al.* (2010, 2013) bestätigt. Poröse TCP-Zylinder mit den gleichen Abmessungen wie die zu untersuchenden Scaffolds wurden aufgrund ihrer guten Osseointegration bei vielen klinischen Untersuchungen als Kontrollgruppe verwendet (Zijderveld *et al.* 2005, Horch *et al.* 2006, Gruber 2017). Allerdings war es in der vorliegenden Arbeit nicht möglich, TCP-Zylinder mit der gleichen Porenstruktur wie die der Magnesiumscaffolds herzustellen, sodass kommerziell erhältliche Scaffolds zum Einsatz kamen. Der Knochenersatzstoff TCP gehört zur Gruppe der Biokeramiken und wird bereits seit über 10 Jahren erfolgreich in der Zahnmedizin und orthopädischen Chirurgie eingesetzt (Gruber 2017, Vallet-Regí und Salinas 2019). Indikationen zur klinischen Anwendung sind dabei häufig die Behandlung von Knochendefekten, die durch Tumore, Rheuma oder Traumata nach Unfällen entstanden sind. TCP stellt aufgrund seiner guten Osseointegration und

angepassten Resorption eine geeignete Alternative zur Behandlung von Knochendefekten mit autologem Knochen dar. Der Nachteil von TCP ist, dass es eine geringe mechanische Belastbarkeit aufweist und somit nur im unbelasteten Knochen eingesetzt werden kann (Gruber 2017).

Insgesamt wiesen beide Magnesiumscaffolds LAE442 und La2 in der vorliegenden Arbeit eine gute klinische Verträglichkeit auf - wie sie bereits auch für andere Mg-Legierungen beschrieben wurde (Thomann *et al.* 2010, Bobe *et al.* 2013, Angrisani *et al.* 2016). Bei allen Tieren konnte postoperativ eine leichte Schwellung und geringgradige Rötungen im Bereich der Wunde festgestellt werden, die spätestens nach dem Ziehen der Fäden zurückgingen und damit auf den operativen Eingriff zurückzuführen waren. Bei den weiteren klinischen Kontrollen traten während des gesamten Untersuchungszeitraumes weder Lahmheit noch Anzeichen für Schmerzen bei den Tieren auf. Im Gegensatz zu einer anderen *in vivo* Studie mit porösen Magnesiumschwämmen der Legierung AX30 (Lalk *et al.* 2013) konnten in der vorliegenden Arbeit keine Gasblasen unter der Haut oder in der Muskulatur palpirt werden. In der Literatur wird kontrovers diskutiert, ob die Gasblasen, welche bei der Degradation von Mg entstehen, tatsächlich aus Wasserstoff bestehen (Lambotte 1932, McBride 1938, Song und Atrens 2003), da sich der Nachweis des hochflüchtigen Gases schwierig gestaltet (Angrisani *et al.* 2012). Die Gasbildung steht jedoch unbestritten im Zusammenhang mit dem Abbau von Magnesiumimplantaten, da schnell-abbauende Legierungen größere Mengen an Gas produzieren (Angrisani *et al.* 2012). In der vorliegenden Arbeit zeigten die La2 Scaffolds eine höhere Gasbildung in den ersten 12 Wochen im Vergleich zu den LAE442 Scaffolds, die mit einer schnelleren Scaffolddegradation von La2 verbunden war. Bei der Kontrollgruppe TCP konnte materialbedingt keine Gasbildung beobachtet werden. Auch in anderen *in vivo* Studien konnte bei Magnesiumimplantaten abhängig von der Legierungszusammensetzung Gas in den radiologischen und μ CT-Untersuchungen beobachtet werden (Reifenrath *et al.* 2010, Reifenrath *et al.* 2013, Rossig *et al.* 2015). Eine Akkumulation von Gas tritt dann auf, wenn der gebildete Wasserstoff nicht schnell genug durch das umliegende Gewebe und die darin liegenden Blutgefäße abtransportiert werden kann (Witte *et al.* 2005). Die Anwesenheit von Gas hatte jedoch in der vorliegenden Arbeit sowie in der Literatur keinen klinischen Effekt auf die Tiere (Erdmann *et al.* 2011, Hampf *et al.* 2012, Lalk *et al.* 2013).

Bei den *in vivo* Untersuchungen der vorliegenden Arbeit kamen regelmäßige

radiologische und μ CT-Untersuchungen zum Einsatz. Mit den regelmäßigen Röntgenuntersuchungen konnten größere Gasblasen, periostale Zubildungen im Bereich des Bohrlochs und knöcherne Strukturen in der Muskulatur beurteilt werden. Jedoch waren die Scaffolds aufgrund ihrer ähnlichen Dichte wie die des Knochens auf den Röntgenbildern nicht deutlich abgrenzbar, sodass die Degradation und Osseointegration nicht beurteilt werden konnte. Dies wurde auch in anderen Studien für Mg-Implantate beschrieben (von der Höh *et al.* 2009, Lalk *et al.* 2010). Knöcherne Veränderungen, wie periostale Zubildungen um das Bohrloch und knöcherne Strukturen in der Muskulatur traten in der vorliegenden Arbeit in gleichem Ausmaß bei beiden Magnesiumscaffolds und der Kontrollgruppe TCP auf. Auch in anderen Studien konnten knöcherne Zubildungen bei Leerbohrungen am Kaninchenknochen beobachtet werden (Huehnerschulte *et al.* 2012, Lalk *et al.* 2013) und stehen damit nicht mit den eingesetzten Implantaten in Verbindung. Es ist zu vermuten, dass sich die Zubildungen aufgrund einer Verletzung des Periosts bei der Bohrung oder verbliebenes Bohrmehl entwickelt haben (von der Höh *et al.* 2009, Lalk *et al.* 2013).

Mit dem *in vivo* μ CT war es möglich eine Beurteilung der Scaffolds anhand einer dreidimensionalen, überlagerungsfreien Bildgebung durchzuführen. Parameter wie die Positionierung der Scaffolds in der Spongiosa, die Integration der Scaffolds in den Knochen sowie der Schluss des Bohrloches konnten mit Hilfe eines semi-quantitativen Scoringssystems untersucht werden. Die richtige Positionierung der Scaffolds in der Spongiosa wurde im ersten μ CT-Scan nach dem operativen Eingriff kontrolliert. Eine einheitliche Scaffoldposition ist sehr wichtig, da die Lokalisation von Magnesiumimplantaten starke Auswirkungen auf das Degradationsverhalten hat (Reifenrath *et al.* 2013). In der Studie von Kraus *et al.* (2012) konnte bei den beiden Magnesiumpins ZX50 und WZ21 eine schnellere Degradation der intramedullären Bereiche im Vergleich zu den kortikal gelegenen Anteilen beobachtet werden. Bei Untersuchungen von Magnesiumzylindern MgCa_{0,8} zeigten Implantate, die vermehrten Kontakt zum Knochenmark hatten, einen deutlich stärkeren Strukturverlust, als diejenigen, die hauptsächlich im spongiösem Anteil des distalen Femurs positioniert waren (von der Höh *et al.* 2009). Diese Unterschiede hinsichtlich der Degradationsgeschwindigkeit wurde auf die verstärkte Vaskularisation des Knochenmarks zurückgeführt, die unter anderem mit einem schnelleren Abtransport der Abbauprodukte und einer pH-Neutralisation zusammenhängen (Kraus *et al.* 2012).

Die Integration der Scaffolds in den umliegenden Knochen wurde in der vorliegenden Arbeit in regelmäßigen Abständen mittels *in vivo* μ CT-Untersuchungen über einen zeitlichen Verlauf von bis zu 36 Wochen durchgeführt. Dieser Parameter wurde auch anhand von hochauflösenden *ex vivo* μ CT-Scans nach Erreichen der jeweiligen Zeitgruppe 6, 12, 24 oder 36 Wochen untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass in den *in vivo* μ CT-Aufnahmen vor allem bei den LAE442 Scaffolds häufiger direkter Kontakt zwischen Scaffold und Knochen trabekel beurteilt wurde als mit den *ex vivo* μ CT-Aufnahmen. Erst in den hochauflösenden Aufnahmen stellten sich feine Lücken zwischen den Scaffolds und den Knochen trabekeln dar, sodass im Durchschnitt nur mehr ein direkter Kontakt pro Querschnitt beurteilt wurde. Diese scheinbaren Lücken, die im *ex vivo* μ CT auftraten, konnten anhand der histologischen Schliffe als osteoidähnliche Knochenmatrix identifiziert werden. Wie in anderen Studien beschrieben (Mousny *et al.* 2008, Lalk *et al.* 2013), handelte es sich dabei um eine schlecht mineralisierte Knochenmatrix, die in den *ex vivo* μ CT-Aufnahmen nicht knochendicht erscheint. Somit sind die *in vivo* μ CT-Aufnahmen aufgrund der niedrigeren Auflösung hinsichtlich der Bewertung einzelner Knochen trabekel und einer genauen Darstellung der Implantatstrukturen eingeschränkt, wie auch von Lalk *et al.* (2010) festgestellt wurde.

Resorbierbare Knochenersatzstoffe müssen in belasteten Defekten über eine ausreichende Stabilität verfügen und eine der Knochenheilung angepasste Degradationsgeschwindigkeit aufweisen (Gonzalez-Carrasco *et al.* 2019, Merolli 2019). In vorangegangenen *in vitro* Tests mit den porösen Scaffolds der vorliegenden Arbeit konnte eine ausreichende Festigkeit der Scaffolds gezeigt werden, um den Kräften in Kaninchenknochen mit einer 3,4-fach (La2) bzw. 5,6-fach (LAE442) höheren Druckbelastbarkeit als der maximal zu erwartenden Belastung standzuhalten (Julmi *et al.* 2019). In verschiedenen *in vivo* Studien wurde die mechanische Stabilität von Mg-Pins nach Entfernung aus dem Knochen mittels Dreipunkt-Biegetest beurteilt (Reifenrath *et al.* 2011, Angrisani *et al.* 2016). In der vorliegenden Arbeit wurden keine Untersuchungen zur Stabilität der Scaffold nach Explantation durchgeführt. Die zerstörungsfreie Präparation der verbliebenen Scaffolds aus dem Knochen-Scaffold-Verbund waren aufgrund der porösen Struktur der Scaffolds mit Einwachsen von Gewebe und Knochen nicht möglich. Daher ist die Etablierung eines geeigneten zerstörungsfreien und standardisierten Verfahrens zur Untersuchung der Stabilität von osseointegrierten, porösen

Implantaten in zukünftigen Studien notwendig.

In vielen Studien konnte bei der Untersuchung der Degradation von Mg-Implantaten ein starker Unterschied zwischen *in vitro* und *in vivo* Korrosionsraten festgestellt werden, sodass eine Untersuchung im lebenden Organismus notwendig ist (Witte *et al.* 2006, Zhang *et al.* 2010, Ullmann *et al.* 2011). Um das Degradationsverhalten in der vorliegenden Arbeit genauer zu beurteilen, wurden die Dichte, das Volumen und die Oberfläche der beiden Magnesiumscaffolds in den *in vivo* und *ex vivo* μ CT-Scans anhand eines materialspezifischen Threshold und einer sogenannte „Region of interest“ (ROI) ermittelt. Basierend auf den Untersuchungen von Xu *et al.* (2018), wurden für die *in vivo* μ CT-Scans zylindrische ROIs mit der Höhe von etwa 1,82 mm (entspricht ca. 30% der Scaffoldhöhe) im zentralen Bereich der Scaffolds gewählt. Aufgrund der geringeren Bildauflösung der *in vivo* μ CT-Scans und der ähnlichen Grautöne von Scaffolds und Knochen konnte die Degradationsschicht und der eingewachsene Knochen in der vorliegenden Untersuchung nicht aus den Berechnungen exkludiert werden. Im Gegensatz zu den *in vivo* μ CT-Analysen konnten die Magnesiumscaffolds der vorliegenden Arbeit in Anlehnung an die Literatur (Huehnerschulte *et al.* 2012, Lalk *et al.* 2013, Angrisani *et al.* 2016) in den hochauflösenden *ex vivo* μ CT-Scans manuell konturiert werden. Somit konnte Knochen, der in die Scaffoldporen eingewachsen war, von den Berechnungen ausgeschlossen werden (Lalk *et al.* 2013). Auch war es in der vorliegenden Arbeit möglich, die Degradationsschicht von dem verbliebenen Scaffoldmaterial mittels der hochauflösenden *ex vivo* μ CT-Aufnahmen und eines angepassten Thresholds zu unterscheiden.

Bei der Berechnung der Scaffolddichte zeigten vor allem die La2 Scaffolds bis 12 Wochen nach der Implantation Unterschiede zwischen den Werten, welche im *in vivo* und *ex vivo* μ CT gemessen wurden. Die Dichte der La2 Scaffolds nahm dabei im *in vivo* Verlauf ab, wohingegen die Dichte, die im *ex vivo* μ CT gemessen wurde, konstant blieb, da das degradierte Material nicht in die Berechnungen einbezogen wurden. Somit ist das hochauflösende *ex vivo* μ CT im Gegensatz zum *in vivo* μ CT zur Berechnung der Degradation und der Menge von mineralisiertem Knochen innerhalb der Scaffoldporen besser geeignet - wie bereits in der Studie von Lalk *et al.* (2010) beschrieben. Nachteile der hochauflösenden *ex vivo* μ CT-Untersuchungen sind jedoch eine längere Scandauer und limitierte Probengröße. Zudem ist eine Verlaufsuntersuchung nicht möglich, da diese hochauflösenden

Geräte nur *ex vivo* Untersuchungen zulassen.

Anhand der *ex vivo* μ CT-Aufnahmen konnten helle Auflagerungen auf den LAE442 Scaffolds dargestellt werden. Es handelte sich bei den hellen Auflagerungen vermutlich um die Anreicherung von Calcium und Phosphor, welche in den EDX-Analysen der LAE442 Scaffolds verifiziert wurden. Diese Auflagerungen führten bei den LAE442 Scaffolds zu einer ansteigenden Dichte.

Zur Beurteilung der Biokompatibilität von Implantaten und der Knochenreaktion ist die histologische Untersuchung eine unerlässliche Methode (Jansen *et al.* 1994). In der vorliegenden Arbeit sowie auch in anderen *in vivo* Studien (Hofmann *et al.* 2013, Lalk *et al.* 2013) wurden dazu Parameter wie neu gebildeter Knochen, Osteoid, fibröses Gewebe und die Menge an Blutgefäßen mittels Scoringsystem untersucht. Zusätzlich wurde das Auftreten von Entzündungs- und Fremdkörperreaktionen evaluiert.

Die histologische Beurteilung von offenporigen Magnesiumscaffolds sollte an Dickschnitten durchgeführt werden, die mittels Trenn-Dünnschliff-Technik hergestellt werden. Mit dieser Technik ist es möglich unentkalkte Knochenproben zu beurteilen und den gesamten Knochen-Implantat-Verbund vollständig zu untersuchen (Donath und Breuner 1982).

Histomorphometrische Untersuchungen zum Vergleich der beiden Magnesiumscaffolds waren aufgrund des ungleichmäßigen Degradationsverhaltens der La2 Scaffolds mit starken Farbvarianzen des Materials in der Toluidinblau-Färbung nicht umsetzbar. Für eine noch bessere Einschätzung der Biokompatibilität und eine bessere Vergleichbarkeit mit anderen Mg-Scaffolds wäre es jedoch sinnvoll die LAE442 Scaffolds in nachfolgenden Arbeiten zusätzlich histomorphometrisch zu untersuchen.

Bei der Beurteilung der Osseointegration konnte bei den La2 Scaffolds in Woche 6 und 12 kein Knochen in den Poren festgestellt werden. Erst mit Woche 24 konnten kleine, dünne Knochen trabekel nach fast vollständiger Degradation von La2 und abnehmender Gasansammlung im ursprünglichen Implantationsort beobachtet werden. Dieses Phänomen einer schnellen Knochenregeneration nach Degradation von ZX50-Pins und ausbleibender Gasbildung konnte auch in der Studie von Kraus *et al.* (2012) beschrieben werden.

Innerhalb der Poren von den LAE442 Scaffolds stellte sich Knochen als isolierte Inseln dar, die von einer nicht mineralisierten Knochenmatrix umgeben waren. Das Phänomen von isolierten Knocheninseln konnte auch bei MgF_2 beschichteten

AX30 Schwämmen am Kaninchenmodell beobachtet werden (Lalk *et al.* 2013). Die wenig mineralisierte, osteoid-ähnliche Knochenmatrix in den Poren der LAE442 Scaffolds nahm über den zeitlichen Verlauf zu. Dabei waren vereinzelte Poren vollständig mit der wenig mineralisierten Knochenmatrix gefüllt. Zudem konnte direkter Kontakt zwischen den LAE442 Scaffolds und dem neuen Knochen hauptsächlich über die Bildung von wenig mineralisierter Knochenmatrix an der Grenzfläche beobachtet werden. Auch bei den La2 Scaffolds traten nach 24 und 36 Wochen im ursprünglichen Implantationsbereich feine, wenig mineralisierte Knochentrabekel auf. Es konnte bereits in vielen Studien mit Magnesiumimplantaten ein vermehrtes Auftreten von Osteoid gezeigt werden (Witte *et al.* 2007, Janning *et al.* 2010, Lalk *et al.* 2013). Signifikant mehr Osteoid im Vergleich zur Kontrollgruppe konnte auch im periimplantären Bereich um poröse AZ91 Scaffolds festgestellt werden (Witte *et al.* 2007). Bei MgF₂ beschichteten Magnesiumschwämmen AX30 konnte eine deutlich stärkere Osteoidproduktion mit bis zu 220 µm breiten Säumen im Vergleich zu den CaP beschichteten Schwämmen beobachtet werden (Lalk *et al.* 2013). Die normale Osteoidschicht auf dem Knochen beträgt bei Hunden und Menschen durchschnittlich eine Dicke von 10 µm und zeigt bei der physiologischen Knochenregeneration ein Maximum von 20 µm (Raina 1972). Ursächlich für das vermehrte Auftreten von Osteoid könnte unter anderem Fluorid sein, welches in der vorliegenden Arbeit Bestandteil der Beschichtung war. In einer *in vivo* Studie führte die orale Applikation von Fluorid zu einer erhöhten Osteoidbildung durch Stimulation der osteoblastischen Aktivität und verzögerte die Mineralisation von neuem Knochen (Mousny *et al.* 2008). Zudem verursachte Fluorid in einer *in vitro* Studie die Produktion von strukturell modifizierten Proteoglykanen, wodurch die Zusammensetzung der Knochenmatrix verändert wurde und somit die nachfolgende Mineralisation negativ beeinflusst wurde (Waddington und Langley 2003). Des Weiteren wird in der Literatur kontrovers diskutiert, ob Aluminium, welches Bestandteil der LAE442-Legierung ist, einen negativen Einfluss auf die Mineralisation hat (Quarles *et al.* 1985, Talwar *et al.* 1986, Bellows *et al.* 1995). Es konnte *in vitro* gezeigt werden, dass das Vorhandensein von Al³⁺ sowohl die Initiations- als auch die Progressionsphase der Mineralisierung hemmt (Bellows *et al.* 1995). Bei hohen lokalen Al Konzentrationen in der demineralisierten Knochenmatrix konnten in einem *in vivo* Modell deutliche Auswirkungen auf alle Parameter, die mit dem Mineralisierungsprozess zusammenhängen, beobachtet

werden (Talwar *et al.* 1986). Im Gegensatz dazu beeinflusste in einer anderen Studie die Ablagerung von Aluminium im Vitamin D-defizienten osteomalakischen Knochen die Knochenmineralisierung nicht (Quarles *et al.* 1985). In der *in vivo* Studie von Witte *et al.* (2006) konnte kein Einfluss der beiden möglichen Faktoren Fluorid und Aluminium auf die Mineralisation beobachtet werden. Es traten direkte Kontakte zwischen dem mineralisierten Knochen und den MgF₂-beschichteten LAE442 Zylindern ohne übermäßiges Auftreten von Osteoid und Gas auf (Witte *et al.* 2006). Da offenporige Implantate eine große Oberfläche für Korrosion bieten (Bobe *et al.* 2013), zeigten die porösen LAE442 Scaffolds in der vorliegenden Arbeit eine vermehrte Gasbildung im Vergleich zu LAE442 Vollkörperzylindern von Witte *et al.* (2010). Möglicherweise könnte diese Ansammlung von Gas zu einer schlechteren Versorgung des Gewebes und somit zu einer verzögerten Mineralisation in der vorliegenden Arbeit geführt haben. Insgesamt handelt es sich bei der verzögerten/unzureichenden Mineralisation wahrscheinlich um ein multifaktorielles Geschehen, da die osteoid-ähnliche Knochengrundsubstanz in unterschiedlichem Ausmaß bei beiden Magnesiumlegierungen auftrat. Weitere Untersuchungen sind jedoch notwendig, um zu beurteilen, ob es nach einer vollständigen Degradation der LAE442 Scaffolds zu einer Mineralisation der osteoid-ähnlichen Knochengrundsubstanz kommt.

Insbesondere die Vaskularisation in der direkten Umgebung von Knochenersatzstoffen für den Prozess der Osseointegration von entscheidender Bedeutung (Mavrogenis *et al.* 2009). In der Studie von Cheng *et al.* (2016) wiesen poröse Magnesiumscaffold mit einer Porengröße von 400 µm im Kaninchenmodell eine höhere Vaskularisation im Vergleich zu der kleineren Porengröße (250 µm) auf, die für die verstärkte Knochenbildung, welche die Autoren in der Umgebung der größeren Porengröße beobachteten, mitverantwortlich sein könnten. In der vorliegenden Arbeit konnte in den Poren der LAE442 Scaffolds in Woche 6 und 12 eine moderate Anzahl an Blutgefäßen und in Woche 24 und 36 eine abnehmende Anzahl an Gefäßen beobachtet werden. Diese Abnahme könnte möglicherweise mit dem reduzierten Granulationsgewebe und der anhaltenden Gasansammlung in Zusammenhang stehen. Im Gegensatz dazu konnten bei La2 in Woche 6 und 12 keine Blutgefäße nachgewiesen werden, zu den späteren Zeitpunkten stiegen die Anzahl der Gefäße im ursprünglichen Implantationsbereich mit Ausbildung von Granulationsgewebe auf wenige an.

Zur Beurteilung der Biokompatibilität wurden in der vorliegenden Arbeit

Makrophagen, Fremdkörperriesenzellen (FBC), neutrophile Granulozyten und Lymphozyten sowie das Auftreten von Fibrozyten untersucht. Das Vorhandensein von Makrophagen sowie die Entwicklung von Granulationsgewebe ist erforderlich, um resorbierbare Implantate abzubauen (Nuss und von Rechenberg 2008). Bei von der Höh *et al.* (2009) konnte im Zytoplasma von Makrophagen Magnesium-implantatbestandteile aufgefunden werden. In einer Studie mit intramedulläre LAE442-Pins im Kaninchenmodell wurde das Vorhandensein von Makrophagen und Riesenzellen zum Abtransport von Korrosionsprodukten der LAE442-Pins als gute zelluläre Kompatibilität beurteilt (Angrisani *et al.* 2016). Daher ist auch in der vorliegenden Arbeit das milde bis moderate Auftreten von Makrophagen und FBCs sowie die moderate Anzahl an Fibrozyten ohne Kapselbildung, bei den LAE442 Scaffolds als normale Reaktion auf das Biomaterial während des Degradationsprozesses einzustufen und spricht für eine gute Biokompatibilität von LAE442.

Im Gegensatz dazu trat bei den La2 Scaffolds nach 6 und 12 Wochen eine teilweise stark ausgeprägte, fibröse Kapselbildung auf. Die Ausbildung einer fibrösen Kapsel um ein Biomaterial wird vom Körper zum Schutz des umliegenden Wirtsgewebes veranlasst und ist auf einen unzureichenden Abbau durch Makrophagen und FBCs zurückzuführen. Zusätzlich wird durch die Kapselbildung die Interaktion zwischen dem Implantat und dem Wirtsgewebe eingeschränkt (Nuss und von Rechenberg 2008). Aufgrund der Gasbildung konnte für die Zeitgruppen 6 und 12 Wochen kaum Granulationsgewebe innerhalb der Poren von La2 festgestellt werden. In den Zeitgruppen 24 und 36 Wochen konnten im ursprünglichen Implantationsbereich der La2 Scaffolds sehr starke Ansammlungen von Makrophagen und FBCs beobachtet werden. Die Kombination aus Kapselbildung und starker Anhäufung von Makrophagen und FBCs spricht für eine schlechte Biokompatibilität (Nuss und von Rechenberg 2008), sodass von einer unzureichenden Biokompatibilität der La2 Scaffolds auszugehen ist.

Für eine ausführlichere Beurteilung der Biokompatibilität wäre eine immun-histochemische Untersuchung der Makrophagen notwendig, um die verschiedenen Zelltypen von Makrophagen zu differenzieren. Es kann dabei zwischen dem proinflammatorischen Phänotyp (M1) und dem Reparatur-Phänotyp (M2) unterschieden werden (Yamane und Leung 2016). Diese Differenzierung war in der vorliegenden Arbeit mittels Toluidinblau-Färbung nicht möglich und bleibt weiteren Untersuchungen vorbehalten.

In der vorliegenden Arbeit konnte mit Hilfe der EDX-Analyse der histologischen Schliffe die Elementverteilung von Magnesium untersucht werden. Dabei konnte Magnesium mit einem abnehmenden Gradienten (vom Scaffoldzentrum nach außen) von dem ursprünglichen Scaffoldmaterial, über die Degradationsschicht bis in den umliegenden Knochen nachgewiesen werden. Wie bereits in einer anderen Studie beschrieben (Krause *et al.* 2010), reicherte sich das Aluminium der vorliegenden Arbeit in der Degradationsschicht der LAE442 Scaffolds an und könnte im Hinblick auf die Langzeitbiokompatibilität kritisch sein (Maier *et al.* 2020). Des Weiteren konnte eine Anreicherung von Calcium und Phosphor in der Degradationsschicht, als auch eine Auflagerung von beiden Elementen auf der Scaffoldoberfläche beobachtet werden. Wie bereits von Witte *et al.* (2005) bei Magnesiumstäben aus verschiedenen Legierungen im Meerschweinchen beschrieben, stellte diese Matrix aus Calcium und Phosphor in den untersuchten EDX-Schnitten dieser Arbeit hauptsächlich den Kontakt zwischen den LAE442 Scaffolds und dem umliegenden Knochen her und ist daher als positiv zu bewerten. Bei den La2 Scaffolds zeigte die EDX-Analyse im Bereich von Zellansammlungen (Makrophagen und FBCs) eine erhöhte Konzentration an Lanthan von bis zu 67,3 Ma.%. Insgesamt weisen freie Lanthanoide eine Affinität zu Knochen auf, da sie physikochemisch Kalzium ähneln (Li *et al.* 2001). In der *in vitro* Studie von Southwick *et al.* (2003) konnte ein progressiver Verlust der Membranintegrität bei Makrophagen nach Exposition von Lanthan beobachtet werden. Die großen Ansammlungen an Makrophagen und FBCs im ursprünglichen Implantationsbereich von den La2 Scaffolds könnten möglicherweise mit einer Apoptose der Zellen aufgrund der Lanthananreicherung erklärt werden. Weitere Untersuchungen sind jedoch notwendig, um diese Vermutung zu überprüfen.

Allgemein wurden die beiden Magnesiumscaffolds klinisch gut vertragen. Für die neue binäre Magnesiumlegierung Mg-La2 konnte jedoch eine schlechtere Osseointegration und eine inhomogene, schnelle Degradation mit starker Gasbildung festgestellt werden. Zudem zeigten die La2 Scaffolds eine teilweise ausgeprägte Kapselbildung und eine starke Fremdkörperreaktion. Die LAE442 Scaffolds zeigten hingegen eine bessere Osseointegration und eine langsame Degradation mit kontinuierlicher, geringerer Gasbildung. In den Poren der LAE442 Scaffolds konnte eine gute Vaskularisation, eine moderate zelluläre Antwort sowie Granulationsgewebe und neugebildeter Knochen zu allen Implantationszeitpunkten festgestellt werden. Eine zunehmende Menge an osteoid-ähnlicher Knochenmatrix

konnte mit direktem Kontakt zur Scaffoldoberfläche sowie innerhalb der Poren beobachtet werden. All dies spricht für eine geeignete Biokompatibilität und ein gutes Degradationsverhalten der LAE442 Scaffolds, um diese in nachfolgenden Arbeiten in lasttragenden Knochendefekten zu untersuchen. Erfolgreiche biologisch abbaubare Magnesiumimplantate sollten jedoch mit möglichst geringer Ansammlung von Gas korrodieren. Dabei könnten möglicherweise zusätzliche Calciumphosphat- oder Polymerbeschichtungen, die Degradationsgeschwindigkeit von den porösen LAE442 Scaffolds weiter reduzieren und möglicherweise einen positiven Effekt auf die Biokompatibilität haben.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Biokompatibilität, die Osseointegration und das Degradationsverhalten der beiden Magnesiumscaffolds La2 und LAE442 mit definierten, interkonnektierenden Poren *in vivo* vergleichend zu untersuchen.

Insgesamt wurden 60 weibliche Kaninchen in die Untersuchungen mit einbezogen. Von den beiden Magnesiumscaffolds sowie der Kontrollgruppe β -Tricalciumphosphat (TCP) wurden jeweils 40 Scaffolds randomisiert in die Hintergliedmaßen implantiert und die Tiere in vier Zeitgruppen von 6, 12, 24 und 36 Wochen eingeteilt. Die zylinderförmigen Scaffolds (Durchmesser 4 mm, Länge 5 mm; max. Porengröße 500 μ m) wurde dabei beidseits in ein 6 mm tiefes Bohrloch im spongösen Anteil des *Trochanter major ossis femoris* eingesetzt. Während der Versuchsdauer wurden regelmäßige klinische, radiologische und *in vivo* μ CT-Untersuchungen durchgeführt. Am Ende des Versuchs wurden die Tiere schmerzlos euthanasiert und der Knochen-Scaffold-Verbund explantiert. Hochauflösende *ex vivo* μ CT-Untersuchungen wurden erstellt und die Proben anschließend histologisch und mittels EDX-Analysen untersucht. Die beiden Magnesiumscaffolds sowie die TCP-Implantate waren klinisch gut verträglich. Die radiologischen und *in vivo* μ CT-Untersuchungen zeigten bei allen Materialgruppen periostale Knochenveränderungen mit ähnlichem Maße und eine degradationsbedingte Gasbildung bei den Magnesiumscaffolds. Anhand der *in vivo* μ CT-Scans konnte eine inhomogene und sehr schnelle Degradation der La2 Scaffolds mit einer starken Gasansammlung festgestellt werden. Die LAE442 Scaffolds zeigten hingegen einen langsamen Abbau mit kontinuierlicher, geringerer Gasbildung. Mittels der hochauflösenden *ex vivo* μ CT-Untersuchung konnte die Degradation und die Osseointegration sehr präzise beurteilt werden. Hinsichtlich der Osseointegration trat bei den La2 Scaffold eine Spaltbildung zur umliegenden Spongiosa auf mit nur wenigen direkten Knochen-Scaffold-Kontakten. Im Vergleich dazu konnte bei LAE442 eine bessere Osseointegration mit mehr Knochen trabekeln in der direkten Scaffoldumgebung und kleinen Knocheninseln in den Poren beobachtet werden. In den histologischen Untersuchungen zeigte sich um die La2 Scaffolds eine fibröse Kapselbildung und eine starke Ansammlung von Makrophagen und Fremdkörperriesenzellen nach fast vollständiger

Scaffolddegradation. In den Poren der LAE442 Scaffolds konnte eine gute Vaskularisation, eine moderate zelluläre Antwort sowie Granulationsgewebe und neugebildeter Knochen zu allen Implantationszeiten festgestellt werden. Eine zunehmende Menge an osteoid-ähnlicher Knochenmatrix konnte periimplantär und innerhalb der Poren beobachtet werden.

Insgesamt konnten die vorliegenden Untersuchungen eine bessere Biokompatibilität und Osseointegration sowie eine langsamere Degradation bei den LAE442 Scaffolds zeigen. Anhand dieser Ergebnisse scheinen die LAE442 Scaffolds als resorbierbarer Knochenersatzstoff vielversprechend. Die Eignung für den Einsatz in lasttragenden Knochendefekten muss in weiteren Studien geprüft werden.

VI. SUMMARY

The aim of the present study was to compare the biocompatibility, osseointegration and degradation behaviour of the two magnesium scaffolds La2 and LAE442 with defined interconnecting pores *in vivo*. A total of 60 female rabbits were included in the investigations. From each material group (LAE442, La2 and TCP), 40 scaffolds were randomly implanted in both hind legs and the animals were divided into four time groups of 6, 12, 24 and 36 weeks. The cylindrical scaffolds (diameter 4 mm, length 5 mm; max. pore size 500 μm) were inserted in a 6 mm deep borehole in the cancellous part of the *trochanter major ossis femoris*. Regular clinical, radiological and *in vivo* μCT examinations were performed. At the end of the experiment the animals were euthanized and the bone-scaffold compounds were explanted. High-resolution *ex vivo* μCT and histologically examinations were performed. In addition EDX analyses were conducted. The two magnesium scaffolds and TCP showed good clinical tolerability. The radiological and *in vivo* μCT examinations revealed similar periosteal bone changes for all material groups as well as degradation-related gas formation for the magnesium scaffolds. Based on the *in vivo* μCT scans an inhomogeneous and fast degradation with a strong gas accumulation could be detected for the La2 scaffolds. In contrast, the LAE442 scaffolds showed a slow degradation behaviour with continuous gas formation. Using high-resolution *ex vivo* μCT the degradation and osseointegration could be assessed precisely. With regard to osseointegration, the La2 scaffolds demonstrated a gap to the surrounding cancellous bone with only few direct bone-scaffold-contacts. In comparison, LAE442 showed better osseointegration with more bone trabeculae in the immediate scaffold vicinity and small bone islands in the pores. Histological examinations showed a fibrous capsule formation around the La2 scaffolds and strong accumulation of macrophages and foreign body giant cells after almost complete scaffold degradation. Within the pores of the LAE442 scaffolds, good vascularization, moderate cellular response, as well as granulation tissue and bone were observed at all observation periods. Furthermore, an increasing amount of osteoid-like bone matrix was identified in the scaffold vicinity and within the pores of LAE442. Overall, the present investigations showed improved biocompatibility and osseointegration, as well as slower degradation for the LAE442 scaffolds compared to the La2 scaffolds. Based on these results, the LAE442 scaffolds appear

promising as a resorbable bone substitute material. Their suitability for use in load-bearing bone defects must be tested in further studies.

VII. LITERATURVERZEICHNIS

Agarwal S, Curtin J, Duffy B, Jaiswal S

Biodegradable magnesium alloys for orthopaedic applications: A review on corrosion, biocompatibility and surface modifications.

Mater Sci Eng C. 2016; 68: 948-963

An YH, Martin KL

Handbook of histology methods for bone and cartilage.

New York NJ, Springer Science+Business Media, 2003

Angrisani N, Reifenrath J, Zimmermann F, Eifler R, Meyer-Lindenberg A, Vano-Herrera K, Vogt C

Biocompatibility and degradation of LAE442-based magnesium alloys after implantation of up to 3.5 years in a rabbit model.

Acta Biomater. 2016; 44: 355-365

Angrisani N, Seitz J-M, Meyer-Lindenberg A, Reifenrath J

Rare earth metals as alloying components in magnesium implants for orthopaedic applications.

In: New Features on Magnesium Alloys, Rijeka, InTech, 2012

Anselme K

Osteoblast adhesion on biomaterials.

Biomaterials. 2000; 21(7): 667-681

Bellows CG, Aubin JE, Heersche JN

Aluminum inhibits both initiation and progression of mineralization of osteoid nodules formed in differentiating rat calvaria cell cultures.

J Bone Miner Res. 1995; 10(12): 2011-2016

Bobbe K, Willbold E, Morgenthal I, Andersen O, Studnitzky T, Nellesen J, Tillmann W, Vogt C, Vano K, Witte F

In vitro and *in vivo* evaluation of biodegradable, open-porous scaffolds made of sintered magnesium W4 short fibres.

Acta Biomater. 2013; 9(10): 8611-8623

Bonath KH, Prieur WD

Kleintierkrankheiten: Orthopaedische Chirurgie und Traumatologie.
Stuttgart, UTB-Verlag, 1998

Castner DG, Ratner BD

Biomedical surface science: Foundations to frontiers.
Surface Science. 2002; 500(1-3): 28-60

Chen G, Kawazoe N

Porous Scaffolds for Regeneration of Cartilage, Bone and Osteochondral Tissue.
In: Osteochondral Tissue Engineering. Nanotechnology, Scaffolding-Related Developments and Translation Bd. 1058, Cham, Springer International Publishing AG, 2018

Chen S, Guan S, Li W, Wang H, Chen J, Wang Y, Wang H

In vivo degradation and bone response of a composite coating on Mg-Zn-Ca alloy prepared by microarc oxidation and electrochemical deposition.
J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 2012; 100(2): 533-543

Cheng MQ, Wahafu T, Jiang GF, Liu W, Qiao YQ, Peng XC, Cheng T, Zhang XL, He G, Liu XY

A novel open-porous magnesium scaffold with controllable microstructures and properties for bone regeneration.
Sci Rep. 2016; 6: 24134

Clark D, Badea C

Micro-CT of rodents: state-of-the-art and future perspectives.
Physica medica. 2014; 30(6): 619-634

Dadsetan M, Guda T, Runge MB, Mijares D, LeGeros RZ, LeGeros JP, Silliman DT, Lu L, Wenke JC, Brown Baer PR, Yaszemski MJ

Effect of calcium phosphate coating and rhBMP-2 on bone regeneration in rabbit calvaria using poly(propylene fumarate) scaffolds.
Acta Biomater. 2015; 18: 9-20

Dai W, Kawazoe N, Lin X, Dong J, Chen G

The influence of structural design of PLGA/collagen hybrid scaffolds in cartilage tissue engineering.

Biomaterials. 2010; 31(8): 2141-2152

de Baaij JH, Hoenderop JG, Bindels RJ

Magnesium in man: implications for health and disease.

Physiol Rev. 2015; 95(1): 1-46

Delling G, Hahn M, Bonse U, Busch F, Günnewig O, Beckmann F, Uebbing H, Graeff W

[New possibilities for structural analysis of bone biopsies using microcomputer tomography (muCT)].

Pathologe. 1995; 16(5): 342-347

Dempster DW, Compston JE, Drezner MK, Glorieux FH, Kanis JA, Malluche H, Meunier PJ, Ott SM, Recker RR, Parfitt AM

Standardized nomenclature, symbols, and units for bone histomorphometry: a 2012 update of the report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee.

J Bone Miner Res. 2013; 28(1): 2-17

Donath K, Breuner G

A method for the study of undecalcified bones and teeth with attached soft tissues. The Sage-Schliff (sawing and grinding) technique.

J Oral Pathol. 1982; 11(4): 318-326

Dorozhkin SV

Bioceramics of calcium orthophosphates.

Biomaterials. 2010; 31(7): 1465-1485

Erdmann N, Angrisani N, Reifenrath J, Lucas A, Thorey F, Bormann D, Meyer-Lindenberg A

Biomechanical testing and degradation analysis of MgCa0.8 alloy screws: a comparative *in vivo* study in rabbits.

Acta Biomater. 2011; 7(3): 1421-1428

Erdmann N, Bondarenko A, Hewicker-Trautwein M, Angrisani N, Reifenrath J, Lucas A, Meyer-Lindenberg A

Evaluation of the soft tissue biocompatibility of MgCa0.8 and surgical steel 316L *in vivo*: a comparative study in rabbits.

Biomed Eng Online. 2010; 9: 63

Fischerauer SF, Kraus T, Wu X, Tangl S, Sorantin E, Hanzi AC, Loffler JF, Uggowitzer PJ, Weinberg AM

In vivo degradation performance of micro-arc-oxidized magnesium implants: a micro-CT study in rats.

Acta Biomater. 2013; 9(2): 5411-5420

Friedrich HE, Mordike BL

Technology of magnesium and magnesium alloys.

In: Magnesium Technology: Metallurgy, Design Data, Applications, Berlin, Heidelberg, Springer-Verlag, 2006

Gómez-Barrena E, Rosset P, Lozano D, Stanovici J, Ermthaller C, Gerbhard F

Bone fracture healing: cell therapy in delayed unions and nonunions.

Bone. 2015; 70: 93-101

Gonzalez-Carrasco J, Cifuentes Cuellar S, Lieblich Rodriguez M

Metals.

In: Bone Repair Biomaterials, Duxford, Woodhead Publishing, 2019

Gruber A

Knochenersatz mit Cerasorb in der orthopädischen Chirurgie, Unfallchirurgie und Handchirurgie Langzeitbeobachtung über 10 Jahre.

Orthopädische und Unfallchirurgie Praxis. 2017; 6(3)

Gu XN, Li N, Zhou WR, Zheng YF, Zhao X, Cai QZ, Ruan L

Corrosion resistance and surface biocompatibility of a microarc oxidation coating on a Mg-Ca alloy.

Acta Biomater. 2011; 7(4): 1880-1889

Hampp C, Angrisani N, Reifenrath J, Bormann D, Seitz JM, Meyer-Lindenberg A

Evaluation of the biocompatibility of two magnesium alloys as degradable implant materials in comparison to titanium as non-resorbable material in the rabbit.

Mater Sci Eng C. 2013; 33(1): 317-326

Hampp C, Ullmann B, Reifenrath J, Angrisani N, Dziuba D, Bormann D, Seitz JM, Meyer-Lindenberg A

Research on the biocompatibility of the new magnesium alloy LANd442 - an *in vivo* study in the rabbit tibia over 26 weeks.

Advanced Engineering Materials. 2012; 14(3): B28-B37

Han Z, Bhavsar M, Leppik L, Oliveira KMC, Barker JH

Histological Scoring Method to Assess Bone Healing in Critical Size Bone Defect Models.

Tissue Eng Part C. 2018; 24(5): 272-279

Hara T, Tanck E, Homminga J, Huiskes R

The influence of microcomputed tomography threshold variations on the assessment of structural and mechanical trabecular bone properties.

Bone. 2002; 31(1): 107-109

Hartwig A

Role of magnesium in genomic stability.

Mutat Res. 2001; 475(1-2): 113-121

Hayes JS, Richards RG

The use of titanium and stainless steel in fracture fixation.

Expert Rev Med Devices. 2010; 7(6): 843-853

Hench LL

Bioceramics: from concept to clinic.

Journal of the American Ceramic Society. 1991; 74(7): 1487-1510

Heyland M, Duda GN, Märdian S, Schütz M, Windolf M

[Steel or titanium for osteosynthesis : A mechanobiological perspective].

Unfallchirurg. 2017; 120(2): 103-109

Hofmann GO

Biodegradable implants in traumatology: a review on the state-of-the-art.

Arch Orthop Trauma Surg. 1995; 114(3): 123-132

Hofmann S, Hilbe M, Fajardo RJ, Hagenmuller H, Nuss K, Arras M, Muller R, von Rechenberg B, Kaplan DL, Merkle HP, Meinel L

Remodeling of tissue-engineered bone structures *in vivo*.

Eur J Pharm Biopharm. 2013; 85(1): 119-129

Holdsworth DW, Thornton MM

Micro-CT in small animal and specimen imaging.

Trends in Biotechnology. 2002; 20(8): S34-S39

Horch HH, Sader R, Pautke C, Neff A, Deppe H, Kolk A

Synthetic, pure-phase beta-tricalcium phosphate ceramic granules (Cerasorb) for bone regeneration in the reconstructive surgery of the jaws.

Int J Oral Maxillofac Surg. 2006; 35(8): 708-713

Huehnerschulte TA, Reifenrath J, von Rechenberg B, Dziuba D, Seitz JM, Bormann D, Windhagen H, Meyer-Lindenberg A

In vivo assessment of the host reactions to the biodegradation of the two novel magnesium alloys ZEK100 and AX30 in an animal model.

Biomed Eng Online. 2012; 11: 14

Janning C, Willbold E, Vogt C, Nellesen J, Meyer-Lindenberg A, Windhagen H, Thorey F, Witte F

Magnesium hydroxide temporarily enhancing osteoblast activity and decreasing the osteoclast number in peri-implant bone remodelling.

Acta Biomater. 2010; 6(5): 1861-1868

Jansen JA, Dhert WJ, van der Waerden JP, von Recum AF

Semi-quantitative and qualitative histologic analysis method for the evaluation of implant biocompatibility.

J Invest Surg. 1994; 7(2): 123-134

Julmi S, Krüger A-K, Waselau A-C, Meyer-Lindenberg A, Wriggers P, Klose C, Maier HJ

Processing and coating of open-pored absorbable magnesium-based bone implants.

Mater Sci Eng C. 2019; 98: 1073-1086

Kaese V

Beitrag zum korrosionsschützenden Legieren von Magnesiumwerkstoffen.

Düsseldorf, VDI, 2002

Karageorgiou V, Kaplan D

Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis.

Biomaterials. 2005; 26(27): 5474-5491

Kaur G, Kumar V, Bains F, Mauro JC, Pickrell G, Evans I, Bretcanu O

Mechanical properties of bioactive glasses, ceramics, glass-ceramics and composites: State-of-the-art review and future challenges.

Mater Sci Eng C. 2019; 104: 109895

Klenke FM, Liu Y, Yuan H, Hunziker EB, Siebenrock KA, Hofstetter W

Impact of pore size on the vascularization and osseointegration of ceramic bone substitutes *in vivo*.

J Biomed Mater Res A. 2008; 85(3): 777-786

Klinck RJ, Campbell GM, Boyd SK

Radiation effects on bone architecture in mice and rats resulting from *in vivo* micro-computed tomography scanning.

Med Eng Phys. 2008; 30(7): 888-895

König HE, Liebich H-G

Anatomie der Haustiere: Lehrbuch und Farbatlas für Studium und Praxis.

Stuttgart, Georg Thieme Verlag, 2019

Kraus T, Fischerauer SF, Hanzi AC, Uggowitzer PJ, Löffler JF, Weinberg AM

Magnesium alloys for temporary implants in osteosynthesis: *in vivo* studies of their degradation and interaction with bone.

Acta Biomater. 2012; 8(3): 1230-1238

Kraus T, Moszner F, Fischerauer S, Fiedler M, Martinelli E, Eichler J, Witte F, Willbold E, Schinhammer M, Meischel M, Uggowitzer PJ, Loffler JF, Weinberg A

Biodegradable Fe-based alloys for use in osteosynthesis: outcome of an *in vivo* study after 52 weeks.

Acta Biomater. 2014; 10(7): 3346-3353

Krause A

Untersuchung der Degradation und Biokompatibilität von degradablen, intramedullären Implantaten auf Magnesiumbasis im Kaninchenmodell. Hannover, Tierärztliche Hochschule 2008

Krause A, von der Höh N, Bormann D, Krause C, Bach F-W, Windhagen H, Meyer-Lindenberg A

Degradation behaviour and mechanical properties of magnesium implants in rabbit tibiae.

J Mater Sci. 2010; 45(3): 624-632

Krefting ER

Quantitative Elektronenstrahl-Mikroanalyse im Rasterelektronenmikroskop.

In: Praxis der Rasterelektronenmikroskopie und Mikrobereichsanalyse, Renningen-Malmsheim, expert verlag, 1994

Lalk M, Reifenrath J, Angrisani N, Bondarenko A, Seitz JM, Mueller PP, Meyer-Lindenberg A

Fluoride and calcium-phosphate coated sponges of the magnesium alloy AX30 as bone grafts: a comparative study in rabbits.

J Mater Sci Mater Med. 2013; 24(2): 417-436

Lalk M, Reifenrath J, Rittershaus D, Bormann D, Meyer-Lindenberg A

Biocompatibility and degradation behaviour of degradable magnesium sponges coated with bioglass—method establishment within the framework of a pilot study.

Materialwissenschaft und Werkstofftechnik. 2010; 41(12): 1025-1034

Lambotte A

L'utilisation du magnésium comme matériel perdu dans l'osteosynthèse.

Bull Mem Soc Nat Chir. 1932; 28(3): 1325-1334

Lang G

Histotechnik: Praxislehrbuch für die biomedizinische Analytik.

Wien, Springer-Verlag, 2012

Li WP, Ma DS, Higginbotham C, Hoffman T, Ketring AR, Cutler CS, Jurisson SS

Development of an *in vitro* model for assessing the *in vivo* stability of lanthanide chelates.

Nucl Med Biol. 2001; 28(2): 145-154

Li Z, Shizhao S, Chen M, Fahlman BD, Debao L, Bi H

In vitro and *in vivo* corrosion, mechanical properties and biocompatibility evaluation of MgF₂-coated Mg-Zn-Zr alloy as cancellous screws.

Mater Sci Eng C. 2017; 75: 1268-1280

Lu H, Kawazoe N, Kitajima T, Myoken Y, Tomita M, Umezawa A, Chen G, Ito Y

Spatial immobilization of bone morphogenetic protein-4 in a collagen-PLGA hybrid scaffold for enhanced osteoinductivity.

Biomaterials. 2012; 33(26): 6140-6146

Lüllmann-Rauch R, Asan E

Taschenlehrbuch Histologie.

Stuttgart, Georg Thieme Verlag, 2015

Maier HJ, Julmi S, Behrens S, Klose C, Gartzke A-K, Wriggers P, Waselau A-C, Meyer-Lindenberg A

Magnesium Alloys for Open-Pored Bioresorbable Implants.

JOM. 2020; 72(5): 1859–1869

Mavrogenis AF, Dimitriou R, Parvizi J, Babis GC

Biology of implant osseointegration.

J Musculoskelet Neuronal Interact. 2009; 9(2): 61-71

McBride ED

Absorbable metal in bone surgery: A further report on the use of magnesium alloys.

Journal of the American Medical Association. 1938; 111(27): 2464-2467

Merolli A

Bone repair materials in orthopedic surgery.

In: Bone Repair Biomaterials, Duxford, Woodhead Publishing, 2019

Mousny M, Omelon S, Wise L, Everett ET, Dumitriu M, Holmyard DP, Banse X, Devogelaer JP, Grynepas MD

Fluoride effects on bone formation and mineralization are influenced by genetics.

Bone. 2008; 43(6): 1067-1074

Müller R, van Campenhout H, van Damme B, van der Perre G, Dequeker J, Hildebrand T, Rüegeegger P

Morphometric analysis of human bone biopsies: a quantitative structural comparison of histological sections and micro-computed tomography.

Bone. 1998; 23(1): 59-66

Nagels J, Stokdijk M, Rozing PM

Stress shielding and bone resorption in shoulder arthroplasty.

J Shoulder Elbow Surg. 2003; 12(1): 35-39

Nair LS, Laurencin CT

Biodegradable polymers as biomaterials.

Progress in Polymer Science. 2007; 32(8-9): 762-798

Nickel R, Schummer A, Seiferle E

Lehrbuch der Anatomie der Haustiere. Band 1: Bewegungsapparat.

Stuttgart, Parey, 2004

Nuss KM, Auer JA, Boos A, von Rechenberg B

An animal model in sheep for biocompatibility testing of biomaterials in cancellous bones.

BMC Musculoskeletal Disorders. 2006; 7(1): 67

Nuss KM, von Rechenberg B

Biocompatibility issues with modern implants in bone - a review for clinical orthopedics.

Open Orthop J. 2008; 2: 66-78

Parfitt AM, Drezner MK, Glorieux FH, Kanis JA, Malluche H, Meunier PJ, Ott SM, Recker RR

Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols, and units. Report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee.

J Bone Miner Res. 1987; 2(6): 595-610

Pawelec KM

Introduction to the challenges of bone repair.

In: Bone Repair Biomaterials, Duxford, Woodhead Publishing, 2019

Pawelec KM, White AA, Best SM

Properties and characterization of bone repair materials.

In: Bone Repair Biomaterials, Duxford, Woodhead Publishing, 2019

Payr E

Beiträge zur Technik der Blutgefäß- und Nervennaht nebst Mittheilungen über die Verwendung eines resorbirbaren Metalles in der Chirurgie.

Arch. Klin. Chir. 1900; 62: 67-93

Quarles LD, Dennis VW, Gitelman HJ, Harrelson JM, Drezner MK

Aluminum deposition at the osteoid-bone interface. An epiphenomenon of the osteomalacic state in vitamin D-deficient dogs.

J Clin Invest. 1985; 75(5): 1441-1447

Rahaman MN, Yao A, Bal BS, Garino JP, Ries MD

Ceramics for prosthetic hip and knee joint replacement.

Journal of the American Ceramic Society. 2007; 90(7): 1965-1988

Raina V

Normal osteoid tissue.

J Clin Pathol. 1972; 25(3): 229-232

Reifenrath J, Angrisani N, Erdmann N, Lucas A, Waizy H, Seitz JM, Bondarenko A, Meyer-Lindenberg A

Degrading magnesium screws ZEK100: biomechanical testing, degradation analysis and soft-tissue biocompatibility in a rabbit model.

Biomed Mater. 2013; 8(4): 045012

Reifenrath J, Bormann D, Meyer-Lindenberg A

Magnesium alloys as promising degradable implant materials in orthopaedic research.

In: Magnesium Alloys-Corrosion and Surface Treatments, Rijeka, InTech, 2011

Reifenrath J, Krause A, Bormann D, von Rechenberg B, Windhagen H, Meyer-Lindenberg A

Profound differences in the in-vivo-degradation and biocompatibility of two very similar rare-earth containing Mg-alloys in a rabbit model.

Materialwissenschaft und Werkstofftechnik. 2010; 41(12): 1054-1061

Reifenrath J, Roessig C, Wolters L, Seitz J, Helmecke P, Angrisani N

Implant location strongly influences degradation and applicability of magnesium alloys for orthopaedic application.

European Cells and Materials. 2013; 26(5): 51

Rey-Vinolas S, Engel E, Mateos-Timoneda M

Polymers for bone repair.

In: Bone Repair Biomaterials, Duxford, Woodhead Publishing, 2019

Rodríguez GR, Patrício T, López JD

Natural polymers for bone repair.

In: Bone Repair Biomaterials, Duxford, Woodhead Publishing, 2019

Rossig C, Angrisani N, Helmecke P, Besdo S, Seitz JM, Welke B, Fedchenko N, Kock H, Reifenrath J

In vivo evaluation of a magnesium-based degradable intramedullary nailing system in a sheep model.

Acta Biomater. 2015; 25: 369-383

Rostock P

Ist das Magnesium als Naht- und Schienungsmaterial für Knochenoperationen geeignet?

Archiv für orthopädische und Unfall-Chirurgie. 1937; 38(3): 486-492

Rüeggsegger P, Koller B, Müller R

A microtomographic system for the nondestructive evaluation of bone architecture.
Calcif Tissue Int. 1996; 58(1): 24-29

Salomon F-V, Geyer H, Gille U

Anatomie für die Tiermedizin.
Stuttgart, Enke Verlag, 2015

Santavirta S, Konttinen YT, Saito T, Grönblad M, Partio E, Kemppinen P, Rokkanen P

Immune response to polyglycolic acid implants.
J Bone Joint Surg Br. 1990; 72(4): 597-600

Schemitsch EH

Size Matters: Defining Critical in Bone Defect Size!
J Orthop Trauma. 2017; 31: S20-S22

Schmidt PF

Einführung in die Rasterelektronenmikroskopie.
In: Praxis der Rasterelektronenmikroskopie und Mikrobereichsanalyse, Renningen-Malmsheim, expert verlag, 1994

Sinowatz F, Hees H

Histologie-Kurzlehrbuch der Zytologie und mikroskopischen Anatomie.
München, Prof. Dr. Sinowatz, 2012

Song G

Control of biodegradation of biocompatible magnesium alloys.
Corrosion Science. 2007; 49(4): 1696-1701

Song G, Atrens A

Understanding magnesium corrosion—a framework for improved alloy performance.
Advanced Engineering Materials. 2003; 5(12): 837-858

Southwick FS, Li W, Zhang F, Zeile WL, Purich DL

Actin-based endosome and phagosome rocketing in macrophages: activation by the secretagogue antagonists lanthanum and zinc.

Cell Motil Cytoskeleton. 2003; 54(1): 41-55

Staiger MP, Pietak AM, Huadmai J, Dias G

Magnesium and its alloys as orthopedic biomaterials: a review.

Biomaterials. 2006; 27(9): 1728-1734

Sutherland D, Bostrom M

Grafts and bone graft substitutes.

In: Bone Regeneration and Repair, Totowa, Humana Press, 2005

Switzer E

Resorbierbares metallisches Osteosynthesematerial. Hannover, Tierärztliche Hochschule, 2005

Talwar HS, Reddi AH, Menczel J, Thomas WC, Jr., Meyer JL

Influence of aluminum on mineralization during matrix-induced bone development.

Kidney Int. 1986; 29(5): 1038-1042

Thomann M, Krause C, Angrisani N, Bormann D, Hassel T, Windhagen H, Meyer-Lindenberg A

Influence of a magnesium-fluoride coating of magnesium-based implants (MgCa0.8) on degradation in a rabbit model.

J Biomed Mater Res A. 2010; 93(4): 1609-1619

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

Comparison of the resorbable magnesium alloys LAE442 und MgCa0.8 concerning their mechanical properties, their progress of degradation and the bone-implant-contact after 12 months implantation duration in a rabbit model.

Materialwissenschaft und Werkstofftechnik. 2009; 40(1-2): 82-87

Trinidad J, Arruebarrena G, Marco I, Hurtado I, Sáenz de Argandoña E

Effectivity of fluoride treatment on hydrogen and corrosion product generation in temporal implants for different magnesium alloys.

Proc Inst Mech Eng H. 2013; 227(12): 1301-1311

Ullmann B, Reifenrath J, Dziuba D, Seitz JM, Bormann D, Meyer-Lindenberg A

In Vivo Degradation Behavior of the Magnesium Alloy LANd442 in Rabbit Tibiae. *Materials* (Basel). 2011; 4(12): 2197-2218

Vallet-Regí M, Salinas AJ

Ceramics as bone repair materials.

In: *Bone Repair Biomaterials*, Duxford, Woodhead Publishing, 2019

van der Elst M, Patka P, van der Werken C

[Biodegradable implants in fracture fixation: state of the art].

Unfallchirurg. 2000; 103(3): 178-182

Van Laecke S

Hypomagnesemia and hypermagnesemia.

Acta Clin Belg. 2019; 74(1): 41-47

von der Höh N, Bormann D, Lucas A, Denkena B, Hackenbroich C, Meyer-Lindenberg A

Influence of different surface machining treatments of magnesium-based resorbable implants on the degradation behavior in rabbits.

J Advanced Engineering Materials. 2009; 11(5): B47-B54

von der Höh N, von Rechenberg B, Bormann D, Lucas A, Meyer-Lindenberg A

Influence of different surface machining treatments of resorbable magnesium alloy implants on degradation–EDX-analysis and histology results.

Mat.-wiss. u. Werkstofftech. 2009; 40(1-2): 88-93

von Doernberg MC, von Rechenberg B, Bohner M, Grunfelder S, van Lenthe GH, Muller R, Gasser B, Mathys R, Baroud G, Auer J

In vivo behavior of calcium phosphate scaffolds with four different pore sizes.

Biomaterials. 2006; 27(30): 5186-5198

von Engelhardt W, Breves G, Diener M, Gäbel G

Physiologie der Haustiere.

Stuttgart, Enke Verlag, 2015

Vormann J

Magnesium: nutrition and metabolism.

Mol Aspects Med. 2003; 24(1-3): 27-37

Wachter NJ, Augat P, Krischak GD, Mentzel M, Kinzl L, Claes L

Prediction of cortical bone porosity *in vitro* by microcomputed tomography.

Calcif Tissue Int. 2001; 68(1): 38-42

Waddington RJ, Langley MS

Altered expression of matrix metalloproteinases within mineralizing bone cells *in vitro* in the presence of fluoride.

Connect Tissue Res. 2003; 44(2): 88-95

Wancket LM

Animal Models for Evaluation of Bone Implants and Devices: Comparative Bone Structure and Common Model Uses.

Vet Pathol. 2015; 52(5): 842-850

Wang J, Tang J, Zhang P, Li Y, Wang J, Lai Y, Qin L

Surface modification of magnesium alloys developed for bioabsorbable orthopedic implants: a general review.

J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 2012; 100(6): 1691-1701

Weiler A, Helling H, Kirch U, Rehm K

Tierexperimentelle Langzeituntersuchung über Fremdkörperreaktionen und Osteolysen nach Verwendung von Polyglykolidimplantaten.

Unfallchirurg. 1998; 265: 146-159

Weizbauer A, Seitz JM, Werle P, Hegermann J, Willbold E, Eifler R, Windhagen H, Reifenrath J, Waizy H

Novel magnesium alloy Mg-2La caused no cytotoxic effects on cells in physiological conditions.

Mater Sci Eng C. 2014; 41: 267-273

Welsch U, Kummer W, Deller T

Histologie- Zytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie.

München, Elsevier, 2018

Willbold E, Gu X, Albert D, Kalla K, Bobe K, Brauneis M, Janning C, Nellesen J, Czayka W, Tillmann W, Zheng Y, Witte F

Effect of the addition of low rare earth elements (lanthanum, neodymium, cerium) on the biodegradation and biocompatibility of magnesium.

Acta Biomater. 2015; 11: 554-562

Witte F, Fischer J, Nellesen J, Crostack HA, Kaese V, Pisch A, Beckmann F, Windhagen H

In vitro and *in vivo* corrosion measurements of magnesium alloys.

Biomaterials. 2006; 27(7): 1013-1018

Witte F, Fischer J, Nellesen J, Vogt C, Vogt J, Donath T, Beckmann F

In vivo corrosion and corrosion protection of magnesium alloy LAE442.

Acta Biomater. 2010; 6(5): 1792-1799

Witte F, Hort N, Vogt C, Cohen S, Kainer KU, Willumeit R, Feyerabend F

Degradable biomaterials based on magnesium corrosion.

Current Opinion in Solid State and Materials Science. 2008; 12(5-6): 63-72

Witte F, Kaese V, Haferkamp H, Switzer E, Meyer-Lindenberg A, Wirth CJ, Windhagen H

In vivo corrosion of four magnesium alloys and the associated bone response.

Biomaterials. 2005; 26(17): 3557-3563

Witte F, Ulrich H, Palm C, Willbold E

Biodegradable magnesium scaffolds: Part II: peri-implant bone remodeling.

J Biomed Mater Res A. 2007; 81(3): 757-765

Wolters L, Besdo S, Angrisani N, Wriggers P, Hering B, Seitz JM, Reifenrath J

Degradation behaviour of LAE442-based plate-screw-systems in an *in vitro* bone model.

Mater Sci Eng C. 2015; 49: 305-315

Wu Y, Wang YM, Zhao DW, Zhang N, Li H, Li J, Wang Y, Zhao Y, Yan J, Zhou Y

In vivo study of microarc oxidation coated Mg alloy as a substitute for bone defect repairing: Degradation behavior, mechanical properties, and bone response.

Colloids Surf B Biointerfaces. 2019; 181: 349-359

Xu Y, Meng H, Yin H, Sun Z, Peng J, Xu X, Guo Q, Xu W, Yu X, Yuan Z, Xiao B, Wang C, Wang Y, Liu S, Lu S, Wang Z, Wang A

Quantifying the degradation of degradable implants and bone formation in the femoral condyle using micro-CT 3D reconstruction.

Exp Ther Med. 2018; 15(1): 93-102

Yamane K, Leung KP

Rabbit M1 and M2 macrophages can be induced by human recombinant GM-CSF and M-CSF.

FEBS Open Bio. 2016; 6(9): 945-953

Yazdimaghani M, Razavi M, Vashae D, Moharamzadeh K, Boccaccini AR, Tayebi L

Porous magnesium-based scaffolds for tissue engineering.

Mater Sci Eng C. 2017; 71: 1253-1266

Yu W, Zhao H, Ding Z, Zhang Z, Sun B, Shen J, Chen S, Zhang B, Yang K, Liu M, Chen D, He Y

In vitro and *in vivo* evaluation of MgF₂ coated AZ31 magnesium alloy porous scaffolds for bone regeneration.

Colloids Surf B Biointerfaces. 2017; 149: 330-340

Zhang E, Xu L, Yang K

Formation by ion plating of Ti-coating on pure Mg for biomedical applications.

Scripta Materialia. 2005; 53(5): 523-527

Zhang E, Xu L, Yu G, Pan F, Yang K

In vivo evaluation of biodegradable magnesium alloy bone implant in the first 6 months implantation.

J Biomed Mater Res A. 2008; 90(3): 882-893

Zhang S, Zhang X, Zhao C, Li J, Song Y, Xie C, Tao H, Zhang Y, He Y, Jiang Y, Bian Y

Research on an Mg-Zn alloy as a degradable biomaterial.

Acta Biomater. 2010; 6(2): 626-640

Zijderveld SA, Zerbo IR, van den Bergh JP, Schulten EA, ten Bruggenkate CM

Maxillary sinus floor augmentation using a beta-tricalcium phosphate (Cerasorb) alone compared to autogenous bone grafts.

Int J Oral Maxillofac Implants. 2005; 20(3): 432-440

VIII. DANKSAGUNG

Ich möchte mich herzlich bei meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. Andrea Meyer-Lindenberg für die Überlassung des interessanten Dissertationsthemas und die persönliche und konstruktive Unterstützung bei der Bearbeitung dieser Arbeit bedanken.

Ein weiteres riesiges Dankeschön geht an Dr. Anja-Christina Waselau und Franziska Feichtner PhD für ihre unzähligen Korrekturen und aufbauenden Worte. Ein herzlicher Dank geht natürlich auch an meine Mitdoktorandin Julia Augustin für die vielen, lustigen Stunden am μ CT und Mikroskop. Ebenso herzlich danke ich Lisa Wurm und Beatrix Limmer für ihre hervorragende Unterstützung im Labor und am μ CT und für den vielen Spaß bei der Arbeit. Für die schöne gemeinsame Zeit möchte ich mich auch bei Laura Witting, Marlene Schmidt und Cristiane Meneghelli Rudolph für die schöne gemeinsame Zeit bedanken. Bei Tim Kilchling bedanke ich mich für die tolle Ausbildung im Bereich der Anästhesie. Ihr seid wie eine zweite Familie für mich geworden. Ohne euch Laborhäschen wäre es nicht möglich gewesen!

Bei unseren Pflegern Marion, Angi, Jan und Fatma möchte ich mich für die gute und liebevolle Betreuung unserer Kaninchen bedanken.

Ebenso danke ich allen beteiligten Mitarbeitern des Institutes für Werkstoffkunde und unseren Projektpartnern Prof. Dr.-Ing. Hans Jürgen Maier und Dr.-Ing. Christian Klose. Mein besondere Dank gilt insbesondere Stefan Julmi, für die Herstellung der Magnesiumscaffolds sowie die Erstellung der μ CT80-Scans und der REM-/EDX-Analysen. Auch möchte ich mich bei unseren Projektpartner vom Institut für Kontinuumsmechanik Prof. Dr.-Ing. habil. Peter Wriggers und Ann-Kathrin Gartzke bedanken.

Frau Prof. Brigitte von Rechenberg möchte ich besonders für ihre kompetente und liebe Unterstützung bei der histologischen Auswertung danken.

Für die Hilfe bei den statistischen Auswertungen danke ich Yury Zablotski PhD.

Mein größter Dank gilt jedoch meiner Familie, insbesondere meinen Eltern Elke und Michael danke ich für ihre finanzielle und emotionale Unterstützung. Außerdem möchte ich meiner Schwester für ihre tollen Korrekturen und

aufbauenden Worte zu jeder Uhrzeit danken. Meinem Mann Alexander danke ich aus tiefstem Herzen für seine moralische und seelische Unterstützung während der gesamten Zeit. Ich danke euch von ganzem Herzen, dass ihr immer für mich da wart und an mich geglaubt habt.