

Offenporige Scaffolds der Magnesiumlegierung LAE442: Einflussnahme der
Porengröße auf Degradations- und Osseintegrationsverhalten

von Julia Maria Bettina Augustin

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

Offenporige Scaffolds der Magnesiumlegierung LAE442: Einflussnahme
der Porengröße auf Degradations- und Osseointegrationsverhalten

von Julia Maria Bettina Augustin
aus Kronach

München 2022

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/en: Priv.-Doz. Dr. Rebecca A.-M. Kenngott

Univ.-Prof. Dr. Cornelia A. Deeg

Univ.-Prof. Dr. Antonia R. Troillet

Univ.-Prof. Dr. Hartmut Gerhards

Tag der Promotion: 12. Februar 2022

Für meine Eltern

Dieter und Sabine Augustin

*„Tu erst das Notwendige, dann das Mögliche und plötzlich schaffst du das
Unmögliche“*

Franz von Assisi

Teilergebnisse dieser Dissertation wurden als Vortrag oder Posterbeitrag auf Fachkongressen präsentiert:

- **OSTEOLOGIE 2019 “Healthy Aging - Bone and Joint”**

28.03 - 29.03.2019 Frankfurt am Main, Deutschland

Vortrag und Posterbeitrag:

„In vivo Vergleich der Degradation und Osseointegration von LAE442-Magnesiumschwämmen mit zwei verschiedenen Porengrößen“

JMB Augustin, S Julmi, L Buchegger, C Klose, AC Waselau, A Meyer-Lindenberg

DOI: 10.1055/s-0039-1680000

- **ESB2019 - 30th Annual Conference of the European Society for Biomaterials together with the 26th Annual Conference of the German Society for Biomaterials (DGBM)**

09.09. - 13.09. 2019 Dresden, Deutschland

Vortrag:

“Histological comparison of degradation and biocompatibility of two different pore sizes within LAE442 scaffolds in a long-term rabbit model”

Julia Augustin, Stefan Julmi, Lisa Wurm, Christian Klose, Anja-Christina Waselau, Andrea Meyer-Lindenberg

INHALTSVERZEICHNIS

| | | |
|-------------|---|-----------|
| I. | EINLEITUNG | 1 |
| II. | LITERATURÜBERSICHT | 3 |
| 1. | Knochenaufbau und physiologische Prozesse | 3 |
| 1.1. | Makroskopische Bauweise..... | 3 |
| 1.2. | Mikroskopische Bauweise..... | 3 |
| 2. | Knöcherne Umbau- und Heilungsvorgänge | 4 |
| 2.1. | Umbauprozesse | 4 |
| 2.2. | Heilung von knöchernen Defekten..... | 6 |
| 3. | Angewandte Biomaterialien in der Knochenchirurgie..... | 7 |
| 3.1. | Eigenschaften und Anwendungsgebiete nicht resorbierbarer Implantate und Knochenersatzstoffe..... | 7 |
| 3.1.1. | Metalle..... | 7 |
| 3.1.2. | Aluminiumdioxid und Zirkoniumoxid..... | 9 |
| 3.2. | Eigenschaften und Anwendungsgebiete resorbierbarer Implantate und Knochenersatzstoffe..... | 10 |
| 3.2.1. | Keramiken und Komposite..... | 10 |
| 3.2.2. | Bioresorbierbare Polymere..... | 12 |
| 3.2.3. | Magnesium als bioresorbierbares Metall | 13 |
| 3.2.3.1. | Erste Untersuchungen | 13 |
| 3.2.3.2. | Eigenschaften | 14 |
| 3.2.3.3. | Mg-Legierungen als Implantat- und Knochenersatzmaterial..... | 14 |
| 3.2.3.3.1. | Mg-basierte Implantate | 15 |
| 3.2.3.3.2. | Mg-basierter Knochenersatz | 17 |
| 3.2.3.4. | Mg-Legierungen mit Seltenen Erden | 19 |
| 3.2.3.5. | LAE442 als potenzielles Knochenersatzmaterial..... | 21 |
| 4. | Untersuchungsmethoden von Implantaten und Knochenersatzmaterialien | 23 |
| 4.1. | μ -Computertomographie | 23 |
| 4.2. | Histologische Untersuchung | 25 |
| 4.3. | Analysen durch Rasterelektronenmikroskopie und energiedispersiver Röntgenspektroskopie | 27 |
| III. | PUBLIKATIONEN..... | 29 |

| | |
|--|------------|
| 1. Publikation Nr. 1 | 29 |
| 2. Publikation Nr. 2 | 43 |
| IV. DISKUSSION | 63 |
| V. ZUSAMMENFASSUNG | 79 |
| VI. SUMMARY | 81 |
| VII. LITERATURVERZEICHNIS | 83 |
| VIII. DANKSAGUNG | 109 |

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

| | |
|------------------------|--|
| 2D | zweidimensional |
| 3D | dreidimensional |
| μCT | μ-Computertomograph(ie) |
| CaP | Calciumphosphat |
| EDX | Energiedispersive Röntgenspektroskopie |
| E-Modul | Elastizitätsmodul |
| GPa | Gigapascal |
| HA | Hydroxylapatit |
| mas% | Massenprozent |
| MgF₂ | Magnesiumfluorid |
| OLT | Osteoid-like tissue |
| p400 | Porengrößenmodell 400 μm |
| p500 | Porengrößenmodell 500 μm |
| PGA | Poly glycolic acid (= Polyglycolsäure) |
| PTH | Parathormon |
| REM | Rasterelektronenmikroskopie |
| ROI | Region of interest (= Interessensbereich) |
| SBF | Simulated body fluid (= simulierte Körperflüssigkeit) |
| TCP | Tricalciumphosphat |
| Ti-6Al-4V | Titanlegierung aus 6 mas% Aluminium und 4 mas% Vanadium |
| TRAP | Tartrate resistant acid phosphatase (= Tartrat-resistente saure Phosphatase) |

I. EINLEITUNG

Das Skelett gewährleistet durch das Zusammenspiel von Knochen und Muskeln die körpereigene Mobilität und fungiert als Schutz für innere Strukturen und Organe gegenüber äußeren Einwirkungen. Ein sich laufend anpassender Mineralienhaushalt sowie die Bereitstellung von Wachstumsfaktoren und die im Knochenmark stattfindende Hämatopoese lassen den Knochen dynamisch auf Umbauprozesse reagieren (Sommerfeldt und Rubin 2001, Taichman 2005). Traumata, Infektionsgeschehen, angeborene oder erworbene neoplastische Veränderungen können skelettale Defekte auslösen und stellen erhöhte Anforderungen an deren chirurgische Versorgung dar (Yazdimamaghani et al. 2017). Ist die entstandene Defektstelle des Knochens zu groß für natürliche Reparaturmechanismen, fungiert das zumeist aus dem Beckenkamm stammende, autologe Knochengewebe als sogenannte Matrize (Nuss und von Rechenberg 2008). Dessen Anwendung wird limitiert durch begrenzte Verfügbarkeit, erhöhte Morbidität an der Entnahmestelle sowie damit verbundene zusätzliche Schmerzen für den Patienten (Damien und Parsons 1991).

In der Osteosynthese könnten resorbierbare Knochenersatzmaterialien daher zukunftsweisend sein, da diese neben der Fähigkeit sich *in vivo* nach einiger Zeit abzubauen, auch biokompatible sowie osteokonduktive Eigenschaften vorweisen (Yazdimamaghani et al. 2017). Darüber hinaus muss das Material eine gewisse Stabilität aufweisen, um den von außen einwirkenden Kräften, besonders in den ersten Wochen nach dessen Einsatz, standhalten zu können (Yusop et al. 2012). Zusammen mit interkonnektierenden Poren kann so ein geeignetes Umfeld für Zellmigration, Revaskularisation und Nährstoffversorgung geschaffen werden, um die Osteogenese an der Defektstelle zu forcieren (Karageorgiou und Kaplan 2005, Ryan et al. 2006, Yazdimamaghani et al. 2017). Die Eigenschaften und deren resultierende Begleiteffekte gilt es in der Auswahl der biomedizinischen Werkstoffe, der Konstruktion und Herstellung sowie in der späteren *in-vivo*-Anwendung geschickt auf die benötigten Anforderungen abzustimmen (Perez und Mestres 2016, Yazdimamaghani et al. 2017). Dies stellt in der Chirurgie immer noch eine Herausforderung dar, zumal durch die Porosität gleichzeitig die mechanischen Eigenschaften des Biomaterials in zunehmender Weise abgeschwächt werden (Hollister 2005, Macchetta et al. 2009).

In den letzten Jahren zeigte Magnesium (Mg) als Basiselement der Legierung LAE442 (Legierung aus 90 mas% Mg, 4 mas% Lithium (Li), 4 mas% Aluminium (Al) und 2

mas% Seltene Erden (SE)) eine angemessene Biokompatibilität zusammen mit an den Knochen angepassten mechanischen Eigenschaften und lieferte damit erfolgsversprechende Resultate in präklinischen *in vivo* Studien (Witte et al. 2005, Thomann et al. 2009, Meyer-Lindenberg et al. 2010, Witte et al. 2010, Rössig et al. 2015, Angrisani et al. 2016). Diese Erkenntnisse machen die Mg-Legierung LAE442 zu einer Option für ein zukunftssträchtiges und bioresorbierbares Knochenersatzmaterial. Besonders besticht es durch eine höhere Druckfestigkeit, Bruchzähigkeit und Ermüdungsbeständigkeit gegenüber alternativen biomedizinischen Werkstoffen, die momentan für die Herstellung von Knochenersatzmaterialien verwendet werden, wie etwa Keramiken oder Polymere (Gerlach 2000, Ryan et al. 2006, Nuss und von Rechenberg 2008, Alvarez und Nakajima 2009).

LAE442 wurde in der zugänglichen Literatur noch nicht als resorbierbares Knochenersatzmaterial in knöchernen Defektstellen untersucht. Bisweilen wurde es als aussichtsvoller solider Festkörper mittels intramedullärem Pin (Witte et al. 2005, Thomann et al. 2009, Witte et al. 2010, Hampp et al. 2013) und Verriegelungsnagel-System (Rössig et al. 2015) *in vivo* untersucht. Diverse Porengrößenspektren wurden, zum Teil in vergleichender Weise, innerhalb anderer Mg-Legierungen untersucht. Dies resultierte in einer meist gesteigerten Osseointegration, dennoch waren die Poren in den meisten Fällen inhomogen innerhalb der Legierung vorliegend (Lalk et al. 2013, Cheng et al. 2016).

Ziel dieser Arbeit war die *in-vivo*-Untersuchung des Degradations- und Osseointegrationsverhaltens bei einer erstmalig verwendeten porösen LAE442 Mg-Legierung. Anhand zweier verschiedener und stets mit homogen produzierten, offenporigen LAE442-Scaffolds sollte im Kaninchenmodell untersucht werden, inwiefern sich eines der beiden LAE442-Porengrößenmodelle als offenporiges Scaffold geeigneter erweist, eine möglichst homogene Degradation sowie gleichzeitig einen Einwuchs von Knochen und Gewebe zu ermöglichen und dabei die Biokompatibilität zu gewährleisten.

II. LITERATURÜBERSICHT

1. Knochenaufbau und physiologische Prozesse

1.1. Makroskopische Bauweise

Knochen lässt sich makroskopisch in vier Formen unterteilen. Kurze Knochen (*Ossa brevia*), platte und breite Knochen (*Ossa plana*), Sesambeine (*Ossa sesamoidea*) und Röhrenknochen (*Ossa longa*). Letztere haben ein mittig gelegenes Schaftstück (*Diaphyse*). Die *Diaphyse* besteht aus einem knöchernen Mantel (*Substantia compacta*), welcher das im Inneren liegende Knochenmark (*Cavum medullare*) umhüllt. An den unteren und oberen Enden des Schaftkörpers (*Epiphysis distalis/Epiphysis proximalis*) verjüngt sich der knöcherne Mantel und liegt als schmale Knochenrinde (*Substantia corticalis*) vor. Ein feinporiges Netzwerk aus feinen Knochentrabekeln (*Substantia spongiosa*) kleidet das Epiphyseninnere aus. So ermöglichen Röhrenknochen, wie Oberarm- (*Humerus*) oder Oberschenkelknochen (*Femur*), im Zusammenspiel mit Muskeln und Sehnen, einen kraftvollen Bewegungsablauf (Nickel et al. 2004).

Substanziell besteht Knochen zu etwa 30% aus organischer Substanz mit darin enthaltenen Kollagenfasern und einem größeren anorganischen Anteil (70%). Dieser enthält kristallines Hydroxylapatit (HA) welches aus Calciumphosphat, Calciumcarbonat, kleineren Anteilen von Magnesiumphosphat und Calciumfluorid sowie weiteren Spurenelementen besteht (Nickel et al. 2004, Sinowatz und Hees 2006). Durch die anorganischen Substanzen erhält der Knochen seine Festigkeit und mechanische Belastbarkeit, wohingegen der organische Anteil den Knochen mit elastischen Eigenschaften ausstattet (Landis 1995).

1.2. Mikroskopische Bauweise

Knochen unterscheidet man zudem in zwei strukturelle Einheiten: Geflechtknochen und Lamellenknochen. Geflechtknochen ist ein Gefüge aus vernetzten, geflechtartig angeordneten Kollagenfibrillen mit dazwischenliegenden und in Lakunen eingebetteten Osteozyten. Dieser entsteht aus während des Embryonalstadiums knorpelig angelegtem Gewebe und bleibt an Stellen wie den Nahträndern der Schädelknochen, dem äußeren Gehörgang oder dem *Processus coronoideus* der *Mandibula* bestehen (Sinowatz und Hees 2006).

Der im adulten Skelett stark überwiegende Anteil an Lamellenknochen zeichnet sich durch konzentrisch oder parallel verlaufende Kollagenfibrillen aus, welche in der Kortikalis angeordnet sind. Diese verlaufen lageabhängig entweder als äußere Grundlamellen unter der Knochenhaut (*Periost*) oder schichten sich nach innen konzentrisch um das Osteon, welches die strukturelle Grundeinheit des Lamellenknochens darstellt. Bis zu 20 dieser konzentrischen Spezial- oder Havers-Lamellen ordnen sich um den mittig im Osteon liegenden Havers-Kanal. Jede Lamellenschicht ist etwa 3 - 7 μm dick und ist in ausmineralisierte Knochengrundsubstanz eingebettet. Die spiralförmig und stets gegenläufig angeordneten Lamellenschichten sind durch Querbrücken untereinander verbunden und verschaffen durch dieses Bauprinzip eine mechanische Festigkeit und Stabilität gegenüber dem Knochen einwirkende Druck- und Zugkräfte (Nickel et al. 2004, Sinowatz und Hees 2006). Der Havers-Kanal verläuft in der Kortikalis parallel in Längsrichtung zum Knochen und ist mit Blutgefäßen und vegetativen Nervenfasern ausgestattet. Über abzweigende Volkmann-Kanäle sind die Havers-Kanäle wiederum ab dem Periost bis hinein zu den innenliegenden, parallelen Grundlamellen, welche den Markraum begrenzen, verbunden und versorgen so die ganze Kortikalis. In meta- und epiphysären Bereichen der Röhrenknochen liegt das knöcherne Bälkchenwerk, auch *Spongiosa* des Knochens genannt. Dort sind die Lamellen plattenartig aufeinander gebaut und formen knöcherne Trabekel von 200 bis 300 μm Dicke (Salomon et al. 2015), welche sich nach den statischen und dynamischen Gegebenheiten (Belastung, Zug- und Druckkräfte) in einer trajektoriellen Bauweise nach den einwirkenden Kraftlinienverläufen ausrichten und somit einer funktionellen Anpassung unterliegen (Nickel et al. 2004, Sinowatz und Hees 2006).

2. Knöcherne Umbau- und Heilungsvorgänge

2.1. Umbauprozesse

Knochengewebe ist sowohl während als auch nach Abschluss seines Wachstums strukturell flexibel und passt sich an neue mechanische Ansprüche im Laufe des Lebens an (Nickel et al. 2004). Die Umbauprozesse sind durch Knochenmodellierung und Knochenremodelling gesteuert, wodurch sich der Knochen auf ihn einwirkende Faktoren anpassen kann, oder er dadurch die Möglichkeit zur Regeneration erhält (Hillam und Skerry 1995, Robling et al. 2006). Knochenmodellierung findet in der Wachstumsphase des Knochens statt und verändert durch Modifizierung der Form- und

Größeneigenschaften die bestehende Knochenstruktur. Situationsabhängig wird dabei entweder neuer Knochen durch Osteoblasten gebildet oder es erfolgt an der betroffenen Stelle ein Abbau durch Osteoklasten. Die beiden Vorgänge stehen während der Wachstumsphase nicht miteinander in Verbindung (Parfitt 1984).

Dagegen läuft der Prozess des Knochenremodellings stetig bis ins hohe Alter ab. Dessen Abläufe konzentrieren sich auf den Erhalt der Knochenstärke (Clarke 2008) sowie den Aufrechterhalt der Mineralienhomöostase (Clarke 2008, Lüllmann-Rauch 2015). Die Prozesse sind von deren Aktivierung bis über den Abbau von altem Knochengewebe und der Knochenneubildung örtlich sowie zeitlich gekoppelt (Clarke 2008, Lüllmann-Rauch 2015). Das Knochenremodelling wird von mechanischen Kräften, Mikroschäden sowie systemischen Hormonen stimuliert (Dempster 2006). Innerhalb eines Jahres werden so durchschnittlich 10% des reifen Knochengewebes durch Knochenremodelling ausgetauscht (Lüllmann-Rauch 2015). Genauer bilden hierbei Osteoklasten und Osteoblasten aufeinander abgestimmte Baueinheiten (*basic multicellular units* = BMUs), um alten Knochen zu entfernen und im Anschluss neuen Knochen zu bilden. Die Abläufe lassen sich nach ihrem zeitlichen Auftreten in die Aktivierungs-, Resorptions-, Umkehrungs- und Bildungsphase aufgliedern (Burr 2002, Parfitt 2002). Bei der Aktivierungsphase werden mononukleäre Vorläuferzellen aus dem Blutkreislauf rekrutiert (Roodman 1999) und über den Zusammenschluss von sich daraus entwickelten Präosteoklasten zu mehrkernigen Osteoklasten ausdifferenziert (Clarke 2008). Die durch Osteoklasten initiierte Knochenresorption geschieht mittels Abtragung der alten Knochenmatrix und Mobilisierung von Knochenmineralien (Silver et al. 1988) und führt ortsabhängig in der Kompakta zu Resorptionskanälen und in den Trabekeln zu Resorptionslakunen, den sogenannten Howship-Lakunen (Lüllmann-Rauch 2015). Nach Apoptose der Osteoklasten, was zugleich das Ende der Resorptionsphase markiert (Eriksen 1986, Reddy 2004), beginnt die Umkehrphase zugunsten der Osteoneogenese. Osteoprogenitorzellen sowie aus ihnen differenzierte Osteoblasten siedeln sich auf den Resorptionsstellen an. Die Osteoblasten beginnen mit der Produktion von noch unmineralisierter Knochenmatrix (Osteoid), welche die chemisch-organische Basis für die weitere Knochenbildung darstellt. Mit der Verkalkung dieser Grundsubstanz erfolgt die Einbettung der Osteoblasten in das mineralisierende Gewebe (Sinowatz und Hees 2006, Clarke 2008, Lüllmann-Rauch 2015). In der so neu entstehenden Knochenlamelle differenzieren sich ehemalige Osteoblasten weiter zu Osteozyten aus. Während Osteozyten den überwiegenden

Zelltyp im reifen Knochen vertreten, treten nach Beendigung dieser gekoppelten Abläufe über die Hälfte der zuvor vorhandenen Osteoblasten in die Apoptose ein. Danach noch persistierende Osteoblasten differenzieren oder verbleiben in Form von ruhenden Oberflächenzellen („*bone lining cells*“) auf der endostalen oder periostalen Knochenoberfläche (Sinowatz und Hees 2006, Lüllmann-Rauch 2015). Letztere können über mechanosensorische Reize (Rubin und Lanyon 1987) und hormonelle Stimulation durch das Parathormon (PTH) reaktiviert werden (Dobnig und Turner 1995).

2.2. Heilung von knöchernen Defekten

Da bei einer Fraktur zumeist keine optimalen Voraussetzungen für die einsetzende Heilung vorliegen, stellt die sekundäre oder indirekte Knochenheilung den üblichen Ablauf dar (Isaksson et al. 2006). Während der sekundären oder auch indirekten Knochenheilung erfolgt mittels der Bildung von Kallusgewebe eine Stabilisation der dislozierten Knochenfragmente. Dabei korreliert die Instabilität und Beweglichkeit der Frakturrenden mit dem Ausmaß der Entzündungsreaktion und dem gebildeten Kallus (Yamagishi und Yoshimura 1955, Hulth 1989). Von wesentlicher Bedeutung sind bei diesem Prozess die mechanische Stabilität und der Grad der lokalen Durchblutung des umliegenden Weichteilgewebes sowie ein intakter Mineral- und Hormonhaushalt (Reddi 1981). Über einen zeitlich abgestimmten Heilungsverlauf, der gemäß Literatur in bis zu sechs Phasen unterteilt wird (Trauma, Induktion, Entzündung, weicher Kallus, harter Kallus und Remodelling (McKibbin 1978) bzw. Hämatombildung samt Entzündung, Angiogenese, Knorpelbildung, -verkalkung, -entfernung und Knochenbildung (Einhorn 1995)), erfolgt die Überbrückung des Frakturspaltes über enchondrale Ossifikation (McKibbin 1978). Im Zuge der Gewebedifferenzierung (Reddi 1994), wird das vorliegende Knorpelgewebe ausmineralisiert und der sich ausbildende, noch wenig stabile Geflechtknochen durch nachfolgende Anpassung an die vorherrschende Belastungsrichtung (Wolff 1892) zu tragfähigem, reifem Lamellenkochen umgebaut (Schebitz et al. 1993, Hing 2004).

Im Rahmen der Defektheilung wird eine „*Union*“ angestrebt. Die *Union* ist als eine Wiederherstellung der Knochenkontinuität definiert, welche bedingt ist durch physiologisch verlaufende Heilungsabläufe (Einhorn 1998). Klinisch bedeutet dies das Fehlen von gezielt ausgeführten Bewegungen der Fragmente sowie keine Anzeichen von Schmerz. Ebenso sollte wieder eine übliche Belastungseinwirkung auf der betreffenden Stelle möglich sein (Sharrard 1990, Kenwright et al. 1991).

Von einer verzögerten Heilung („*Delayed Union*“) spricht man hingegen, wenn diese den zeitlichen Rahmen von etwa vier Monaten überschreitet. Tritt nach über sechs Monaten keine vollständige Defektheilung ein, spricht man von einer „*Non-Union*“ (Rüter und Mayr 1999), bei welcher die knöcherne Einheit und Kontinuität nicht mehr hergestellt werden kann (Einhorn 1998). Mögliche Ursachen sind eine fehlende Blutversorgung, Zerstörung des Periosts (Augat et al. 2005), unzureichende Immobilisation und eine nicht ausreichende Stabilität (Claes et al. 2002). Pseudoarthrosen können als Folge resultieren (Claes et al. 2000). Auch Defekte kritischer Größe sind jene, die nichtüberbrückbare Abschnitte für die körpereigene Heilung darstellen und werden daher als „*critical size defects*“ bezeichnet (Schmitz und Hollinger 1986). Ein chirurgischer Eingriff ist bei diesen nicht spontan heilenden, segmentalen Defekten geboten, welcher über das Auffüllen des Defekts mit geeignetem Material erfolgt (Dumic-Cule et al. 2015).

3. Angewandte Biomaterialien in der Knochenchirurgie

3.1. Eigenschaften und Anwendungsgebiete nicht resorbierbarer Implantate und Knochenersatzstoffe

3.1.1. Metalle

Eine wesentliche Rolle bei der Frakturversorgung nehmen Metalle ein. Diese sind von besonderer Bedeutung bei Knochendefekten, welche unter hoher Belastungseinwirkung stehen (Agrawal 1998), wie etwa Korrektur- oder Verlängerungsosteotomien oder Resektion von Knochentumoren/ -sequestern. Zudem finden sie ihre Anwendung als Hüft- und Knieprothesen (Staiger et al. 2006, Lewis 2013). Verbreitet sind dabei metallische Biomaterialien mit einer hohen mechanischen Festigkeit und Bruchzähigkeit wie rostfreier Stahl, reines Titan und Titanlegierungen sowie Legierungen auf Kobalt-Chrom-Basis (Agrawal 1998, Staiger et al. 2006). Auch wenn deren Festigkeit und Bruchzähigkeit im belasteten Knochen anderen biomedizinischen Werkstoffen wie Keramiken, Polymeren und diversen Kompositen überlegen ist, zeigen sich deutliche Diskrepanzen bei den mechanischen Eigenschaften dieser Metalle im direkten Vergleich zu den Kennwerten von physiologischem Knochen. Besonders deren E-Modul ist um ein Vielfaches höher und macht Metalle deshalb wesentlich steifer im Vergleich zu Knochengewebe (Agrawal 1998). Dieser Unterschied führt zum sogenannten „*stress shielding*“ (Staiger et al. 2006, Noyama et al. 2012). Dabei

übernimmt das Metallimplantat einen überwiegenden Anteil der äußeren Krafteinwirkungen, was gleichzeitig zu einer Abschirmung des heilenden Knochens vor diesen Kräften führt. Des Weiteren kann aus dieser reduzierten und externen Stimulierung der knöchernen Umbauprozesse eine mangelhafte Fixierung des Implantates im Knochenverbund resultieren (Lewis 2013). Eine weitere Limitation stellt die Freisetzung von toxischen Ionen oder reizenden Partikeln dar, die durch Korrosions- oder Abnutzungsprozesse entstehen und zu Metallosen führen können (Jacobs et al. 1998, Voggenreiter et al. 2003). Werden Metalle in der Human- und Veterinärmedizin verwendet, erfordern diese meist einen zweiten chirurgischen Eingriff zur späteren Entfernung. Dies birgt gesundheitliche Risiken und Komplikationen mit steigenden Kosten für das Gesundheitssystem (Claes 1992, Witte et al. 2005).

Nicht resorbierbare Metalle liegen nicht nur als Festkörper für die Osteosynthese vor. In poröser Form ist die Auswahl von geeigneten Porengrößen und die Porosität von großem Interesse (Karageorgiou und Kaplan 2005). *In vitro* stellten Frosch et al. (2002) mittels Einbringung poröser Titanimplantate in eine aus humanen Osteoblasten generierte Zellkultur fest, dass das Migrations- und Mineralisationsverhalten der Zellen maßgeblich durch den verwendeten Porenkanaldurchmesser im Implantat beeinflusst wird. Die deutlichste Migration und Osseointegration zeigte sich bei einem Durchmesser von 600 μm im Vergleich zu Varianten unter 500 μm oder einer Variante mit 1000 μm (Frosch et al. 2002). Das Einwachsen von Knochen in metallische Knochenersatzmaterialien unter nicht-lasttragenden Bedingungen wurde *in vivo* von Itälä et al. (2001) untersucht. Dreieckige Titanimplantate mit Reihen unterschiedlichster Porengrößen (50 - 125 μm) wurden in Epikondylen von Kaninchenfemura implantiert. Knochen wurde nach zwölf Wochen auch in Poren unterhalb von 100 μm nachgewiesen. Da osteokonduktive Knochenersatzmaterialien zur Auffüllung von Knochendefekten verwendet werden, die oft mechanische Unterstützung benötigen (Keating und McQueen 2001), wurde in der Arbeit von Kujala et al. (2003) Knochenersatzmaterial aus porösem Nitinol (Legierung aus Titan und Nickel) 30 Wochen lang in die distal gelegene Metaphyse von Rattenfemura implantiert. Der Knochen-Implantat-Kontakt war in der Gruppe mit einer Porosität von 66,1% (mittlere Porengröße: 259 μm) mit 51% am ausgeprägtesten, dennoch war kein signifikanter Unterschied zur Gruppe mit einer Porosität von 46,6% (mittlere Porengröße: 505 μm) erkennbar. Knochen wuchs in beide Ausführungen des Nitinol-Ersatzmaterials ein. Letztere Gruppe zeigte histologisch weniger fibröses Gewebe in den Poren. Da keine Frakturen in der

beschriebenen Studie auftraten und der Knochenersatz einen gewichtstragenden Knochenanteil einnahm, gingen Kujala et al. (2003) davon aus, dass die mechanische Unterstützung ausreichend war.

In einer weiteren Studie wurde ein lasergesintertes Implantat aus einer Titanlegierung (Ti-6Al-4V) mit einer Oberflächenrauigkeit im Mikro- bis Nanometerbereich und von trabekulärem Knochen inspirierter Porosität (68,8%) auf das Knochenwachstum im Vergleich zu seiner Festkörpervariante innerhalb eines transaxial gesetzten Defekts im Kaninchenmodell untersucht (Cohen et al. 2017). Keine Unterschiede wurden nach zehn Wochen bei der Auszugsfestigkeit oder dem Knochen-Implantat-Kontakt vorgefunden. Jedoch wurde ein signifikant höheres Knochenvolumen für die porösen Implantatmodelle im μ CT und in der Histomorphometrie ermittelt (Cohen et al. 2017). Einen positiven Effekt hinsichtlich einer verbesserten Grenzflächenbindung und Osseointegration erreichte man, indem man zusätzlich eine keramische Beschichtung (z.B. Hydroxylapatit) auf die porösen Oberflächen von Metallimplantaten aufbrachte (Ducheyne et al. 1980, Pilliar 1998, Nishiguchi et al. 2001).

3.1.2. Aluminiumdioxid und Zirkoniumdioxid

Aluminiumdioxid (Al_2O_3) und Zirkoniumdioxid (ZrO_2) stellen bioinerte keramische Werkstoffe dar (Hench und Polak 2002, Wintermantel und Ha 2008), welche bereits in den 1960er Jahren zur Anwendung kamen. Einsatzgebiete sind die Hüftprothetik in Form von Hüftkugeln und Hüftgelenkspfannen, zahnmedizinische Implantate sowie Knieprothesen oder Mittelohrimplantate (Navarro et al. 2008, Wintermantel und Ha 2008, Vallet-Regí und Salinas 2019). Dabei wird weitestgehend keine Reaktion im biologischen Gewebe durch die Keramikwerkstoffe hervorgerufen (Wintermantel und Ha 2008). ZrO_2 besitzt eine größere Festigkeit und Bruchzähigkeit als Al_2O_3 und den ästhetischen Vorteil der weißen, zahnähnlichen Optik gegenüber Titan (Vallet-Regí und Salinas 2019). In der Praxis erweist sich ZrO_2 insofern als überlegen, da es zusätzlich weniger Reibung und Abnutzungserscheinungen aufweist und in der Herstellung kostengünstiger ist (Vallet-Regí und Salinas 2019). Mögliche Verunreinigungen durch Uran, Thorium und ihrer Zerfallsprodukte werden hinsichtlich der Radioaktivität kritisch angemerkt, jedoch ermöglichen die heutigen Herstellungstechniken durch die Erzielung eines hohen Reinigungsgrades der Ausgangsrohstoffe eine Abtrennung der genannten Elemente (Piconi und Maccauro 1999), sodass die effektive Dosis von ZrO_2 -Keramiken aus hochgereinigten Pulvern unterhalb der üblichen Strahlendosis liegt,

welcher man durch die natürliche Umwelt ausgesetzt ist (Fujisawa et al. 1996, Piconi und Maccauro 1999).

3.2. Eigenschaften und Anwendungsgebiete resorbierbarer Implantate und Knochenersatzstoffe

3.2.1. Keramiken und Komposite

Mit bioaktiven Keramiken lag ab 1980 der Fokus verstärkt auf einer aktiven Interaktion des Materials mit seiner knöchernen Umgebung sowie auf dem Ziel, sich nach seiner Funktionserfüllung im Körper abzubauen (Vallet-Regí und Salinas 2019). Von wesentlicher Bedeutung sind Hydroxylapatite (HA) und Tricalciumphosphate (TCP) (Draenert et al. 2001). HA ist der Knochengrundsubstanz strukturell und chemisch ähnlich (Wintermantel und Ha 2008) und kann aus biologischem Ausgangsmaterial oder vollsynthetisch hergestellt werden (Holmes und Beebe 1971). Im Knochen wird HA erheblich langsamer resorbiert als β -TCP (Bohner 2000, Lu et al. 2002), weist aber eine sehr gute Biokompatibilität und osteokonduktive Wirkung auf (Hing et al. 1999). HA wird in den Knochen durch chemische Oberflächenbindungen sowie der Anlagerung kollagener Fasern direkt integriert, gleichzeitig erfolgt der Aufbau von knöcherner Grundsubstanz innerhalb des HA-Kristallitgefüges (Ducheyne et al. 1990, de Bruijn et al. 1995). Keramiken aus TCP resorbieren im Körper bedeutend schneller als HA. Aufgrund unterschiedlicher kristalliner Strukturen unterscheidet man α - und β -TCP (LeGeros 2001). Wegen thermodynamischer Instabilitäten und sehr unkalkulierbaren Resorptionsgeschwindigkeiten wird α -TCP deutlich seltener verwendet (Horch et al. 2004, Braatz 2006). Obwohl diese bioaktiven, unterschiedlich schnell resorbierbaren Keramiken als Knochenersatzstoff breite Anwendung in der Orthopädie, Zahnmedizin und der Mund-Kiefer-Chirurgie finden, ist deren Verwendung wegen begrenzter biomechanischer Eigenschaften auf nicht lasttragende Bereiche beschränkt (Braatz 2006, Rezwan et al. 2006, Wintermantel und Ha 2008), denn aufgrund ihres spröden Charakters und geringer Zugfestigkeit ist deren Bruchanfälligkeit deutlich erhöht (Bohner 2000, Nuss und von Rechenberg 2008).

Bioaktive Gläser gehören ebenfalls zu der Gruppe der Keramiken und enthalten Anteile an Siliciumoxid, Calciumoxid, Natriumdioxid, und Phosphortrioxid (Wintermantel und Ha 2008). Sie bestechen durch die Fähigkeit, eine rasche und feste chemische Verbindung zum Knochen aufzubauen (Hench und Andersson 1993). Die Verbindung

wird durch eine Hydroxylcarbonatapatit-Schicht geschaffen, auf dieser knöcherne Vorläuferzellen zu Osteoblasten heranreifen und eine ausmineralisierende Matrix bilden, welche zur Fixation führt (Hench und Andersson 1993). Wie auch bei den bereits erwähnten Keramiken sind auch bioaktive Gläser mehrheitlich nur mit geringer Bruchzähigkeit und reduzierten mechanischen Eigenschaften ausgestattet (Wintermantel und Ha 2008), welche sich erheblich in porösen Strukturen verschlechtern (Rezwan et al. 2006, Pawelec et al. 2019). Dies limitiert den Gebrauch der bioaktiven Ersatzmaterialien auf Körperregionen, welche keiner großen Belastung unterliegen (Wintermantel und Ha 2008). Einsatzmöglichkeiten bestehen als Knochenfüllmaterial für kleinere Defekte, Dental- und Gesichtschirurgie, Beschichtungen für Metalle oder Polymere zur Steigerung der Bindung zwischen Implantat und Knochen oder als Ersatz knöcherner Mittelohranteile (Hench 1991, Wilson et al. 1993, Wilson et al. 1995, Vallet-Regí et al. 2003, Rezwan et al. 2006).

Komposite sind dagegen Verbundwerkstoffe und bestehen aus mindestens zwei Komponenten, welche sich in ihren mechanischen, physikalischen und biologischen Merkmalen ergänzen (Raiha 1992). Beispielsweise wird die Kombination aus HA und Polyethylen bei Mittelohrimplantaten als permanentes Kompositmaterial genutzt (Guild und Bonfield 1998). Biodegradierbare Komposite werden aus HA- oder TCP-Partikeln zusammen mit Polymeren kombiniert, um die Defektanpassung durch eine erhöhte Formbarkeit zu verbessern, die Degradation kontrollierter ablaufen zu lassen und letztlich die Keramiken mit höheren biomechanischen Eigenschaften durch den Polymerzusatz ausstatten zu können (Peroglio et al. 2007, Cao und Kuboyama 2010, Bennett et al. 2016, Pawelec et al. 2019).

Seitens idealer Porengrößenbereiche in keramischen Knochenersatzstoffen legten Hulbert et al. (1970) eine Mindestgrößen-Anforderung von 100 μm fest. Unterhalb dieser Grenze wurde lediglich nicht ausmineralisiertes Knochen- oder Fasergewebe nachgewiesen. Nach diesen Erkenntnissen orientierten sich Folgestudien und verwendeten Knochenersatzmaterialien mit Poren ab einer Größe von etwa 100 - 1000 μm , um den optimalen Größenbereich durch die neu eingewachsene Knochenmenge zu evaluieren. Galois und Mainard (2004) untersuchten über zwölf Monate die Osteoneogenese anhand poröser HA- und β -TCP-Zylinder im Kaninchenmodell. Das kleinste Porengrößenspektrum (45 - 80 μm) beinhaltete signifikant weniger neuen Knochen als die drei größeren Modelle (80 - 140, 140 - 200 und 200 - 250 μm). In einer weiteren Studie an Schädeldefekten von Mäusen konnte sowohl eine bessere

Osseointegration durch einen erhöhten Grenzflächenkontakt zwischen den CaP-Partikeln mit dem Knochen als auch eine höhere Osteoneogenese ab Porengrößen von 140 - 210 μm und 210 - 280 μm verzeichnet werden. Darüber hinaus wurde eine erhöhte Angiogenese in Poren über 140 μm beobachtet. Die Autoren schlussfolgerten, dass eine erfolgreiche Knochenregeneration in den größeren Poren zielführender verläuft, da in diesen auch eine bessere Gefäßversorgung vorgefunden wurde (Klenke et al. 2008). Durch die Verwendung von Größenbereichen von 300 - 700 μm innerhalb von β -TCP kamen Feng et al. (2011) zu der Ansicht, dass eine Größe ab 400 μm aufgrund der beobachteten höheren Vaskularisation als auch wegen deutlich geringerer fibröser Gewebbildung innerhalb der Poren zu bevorzugen ist. Die Tendenz zur größeren Porengröße ergab eine weitere Studie insofern, dass etwa 600 μm große Poren eine deutlichere Osteoneogenese zeigten als jene von 300 μm Größe (Gauthier et al. 1998). Demgegenüber zeigten von Doernberg et al. (2006) keine Unterschiede in der *in-vivo*-Osteoneogenese für β -TCP-Scaffolds mit vier verschiedenen Porengrößen (150, 260, 510 und 1220 μm) auf. Allerdings wurde eine schnellere Resorption bei Scaffolds mit den größeren Porengrößen beobachtet (von Doernberg et al. 2006).

3.2.2. Bioresorbierbare Polymere

Bioresorbierbare synthetische Polymere sind weit verbreitet und gängige Vertreter dieser Gruppe sind Polyglykolsäure (PGA), Poly-L-Lactidsäure (PLA) und deren Kopolymere (Van der Elst et al. 2000). Bei den genannten Varianten handelt es sich um Esterverbindungen die durch hydrolytische Spaltung im Körper zu einfachen Metaboliten umgewandelt werden (Poinern et al. 2012, Kundu et al. 2013) und so vielseitig verwendbare resorbierbare Biomaterialien darstellen (Van der Elst et al. 2000). Aus PLA und PGA werden seit mehreren Jahrzehnten abbaubare Nahtmaterialien für die Human- und Veterinärmedizin hergestellt (Herrmann et al. 1970, Matsusue et al. 1991). Sie bieten eine breite Form- und Strukturvariabilität (Stäbe, Platten, Schrauben, Schwämme, Fasern etc.) und können anwendungsspezifisch synthetisiert werden (Gogolewski 1992, Gogolewski 2000, Van der Elst et al. 2000, Poinern et al. 2012). Jedoch ist deren Anwendung wegen ihrer vielfach geringeren Festigkeit und niedrigerem E-Modul im Vergleich zu Metallen auf nur gering belastete Anwendungsgebiete begrenzt (Hofmann 1995, Rehm et al. 1997, Agrawal 1998). Von der Verwendung bei Refrakturen, Wundheilungsstörungen oder metabolischen Erkrankungen wird außerdem abgeraten (Hofmann 1995). Des Weiteren werden mit bioresorbierbaren Polymeren Gewebeunverträglichkeiten aufgrund saurer

Degradationsprodukte (Bergsma et al. 1993, Bergsma et al. 1995, Sun et al. 2014, Grün et al. 2018) sowie Implantatversagen (Rezwan et al. 2006, Grün et al. 2018) in Zusammenhang gebracht. Verminderte Zelladhäsion und ein gering ausgeprägtes Integrationsverhalten (Rana et al. 2017) sowie osteolytische Reaktionen (Böstman und Pihlajamäki 2000) mindern deren Biokompatibilität zum Teil erheblich.

Porenvergleiche sind innerhalb synthetischer oder auch natürlicher Polymere vorzufinden und diese bioresorbierbaren Knochenersatzmaterialien wurden auf neuen Knochen während ihres Abbaus *in vivo* untersucht (Oh et al. 2007, Roosa et al. 2010, Hofmann et al. 2013, Penk et al. 2013, Uebersax et al. 2013). PLGA-Scaffolds mit einem Porenspektrum von 300 - 500 μm erwiesen sich etwa in der Tibia von Ratten nach wenigen Wochen als erfolgreich bezüglich der darin neu gebildeten Knochenmasse (Penk et al. 2013). Oh et al. (2007) definierten wiederum für biodegradierbare Polycaprolakton-Scaffolds einen optimalen Porengrößenbereich über der Marke von 200 μm . Widersprechend hierzu berichten Roosa et al. (2010) von Untersuchungen, die, trotz weit gewählter Porengrößenspektren, keinen signifikanten Unterschied bezüglich neu vorhandener Knochenmasse innerhalb der Porengrößenmodelle feststellten.

3.2.3. Magnesium als bioresorbierbares Metall

3.2.3.1. Erste Untersuchungen

Das Element Mg fand in der Medizin 1878 zum ersten Mal Verwendung in Form von Drähten zur Unterbindung von Gefäßblutungen (Huse 1878). Um die Jahrhundertwende weitete der Arzt Erwin Payr die medizinischen Applikationen maßgeblich aus und verwendete Mg in Form von Platten, Drähten und Nägeln sowie als Nahtmaterial für Gefäßligaturen (Payr 1900, Payr 1901, Payr und Martina 1905). Davon inspiriert setzten Albin Lambotte und sein Assistent Jean Verbrugge das bioresorbierbare Metall bei orthopädischen Eingriffen an Kindern und Tieren ein (Lambotte 1909, Lambotte 1932, Verbrugge 1933, Verbrugge 1934, Verbrugge 1937). Durch den schnellen Abbau hatte Payr (1900) die Vermutung, dass der Wassergehalt des Gewebes und gelöste Salze im Blut durch chemische Prozesse und zelluläre Reaktionen für den schnellen Mg-Abbau *in vivo* verantwortlich sein könnten. McBride (1938) nahm an, dass die Korrosionsgeschwindigkeit in Abhängigkeit vom Implantationsort unterschiedlich schnell verläuft. Er beobachtete, dass Mg-Platten auf Knochenoberflächen mit Kontakt zum Weichgewebe deutlich schneller degradierten als der Bereich transkortikaler

Schrauben, welcher nur von Kortikalis umgeben war. Klinisch wurde des Öfteren eine parallel zur Korrosion ablaufende Gasentwicklung und damit temporäre Emphyseme um die Implantationsregion beobachtet. Diese Nebeneffekte wurden als kein langfristiges Problem angesehen (Lambotte 1932). Dennoch hielt die grundsätzliche Skepsis an der *in-vivo*-Verträglichkeit von Mg an (Groves 1913, Zierold 1924). Bedingt durch das Aufkommen von rostfreiem Stahl und begleitet von der Tatsache, dass das Problem der Korrosion bis zum damaligen Zeitpunkt nicht zufriedenstellend gelöst werden konnte (Rostock 1937), verschwand Mg als biodegradierbares Metall zunächst zu Gunsten nicht resorbierbarer Metallalternativen aus dem Fokus der damaligen Forschungsvorhaben (Witte 2015).

3.2.3.2. Eigenschaften

Mg wird als Kation (Mg^{2+}) vorwiegend im Knochengewebe gespeichert. Es wird leicht absorbiert und mit Hilfe der Nieren über den Urin aus dem Körper ausgeschieden. Als ein essenzieller Co-Faktor in vielen Enzymen stellt es eine wesentliche Komponente dar, die bei der Umsetzung von genetischer Information in Polypeptidstrukturen beteiligt ist (Staiger et al. 2006).

Im direkten Vergleich zu anderen biomedizinischen Materialien, weist Mg die ähnlichsten Werte hinsichtlich des E-Moduls (ca. 45 GPa) im Vergleich zu Knochengewebe (ca. 5 - 23 GPa) auf. Titanlegierungen (ca. 110 GPa), rostfreie Stähle (ca. 200 GPa) und Legierungen auf Kobaltbasis (ca. 230 GPa) liegen vergleichsweise weit darüber. Auch die Dichte von Mg und Mg-Legierungen ($1,7 - 2,0 \text{ g/cm}^3$) weist sehr ähnliche Werte zu jenes des Knochens ($1,8 - 2,1 \text{ g/cm}^3$) auf. Die Ähnlichkeiten der jeweiligen Kennwerte sind ein maßgeblicher Grund, weshalb der Fokus in den letzten beiden Jahrzehnten wieder intensiver auf Mg-Legierungen gerichtet wurde (Staiger et al. 2006, Witte et al. 2008, Yang und Tan 2013). Dabei könnten diese nicht nur ein stabilen Knochenersatz darstellen, sondern finden zum Beispiel auch in der Gefäßchirurgie ihren Einsatz als biologisch abbaubare Stents (Heublein et al. 2003).

3.2.3.3. Mg-Legierungen als Implantat- und Knochenersatzmaterial

Durch das Legieren von Mg mit anderen Elementen können korrosive Defizite, biomechanische Eigenschaften, aber auch die Herstellung der Implantate verbessert werden (Staiger et al. 2006). Abhängig von den jeweiligen Elementkomponenten und angewandten Oberflächenmodifikationen wurden in der Vergangenheit auch

Rückschläge wie unzureichende Biokompatibilität oder eine zu schnelle Degradation verzeichnet (Reifenrath et al. 2010, Huehnerschulte et al. 2012).

Mg wurde bislang mehrheitlich anhand unterschiedlicher Ausführungen von soliden Implantatmaterialien (Pins, Zylinder, Platten und Schrauben) untersucht, wohingegen es weitaus weniger Beispiele gibt, in welchen Mg die Basis von Knochenersatzmaterialien bildet. Insgesamt zeichnete sich ab, dass zunächst aussichtsvolle *in-vitro*-Ergebnisse nicht unbedingt auch auf nachfolgende *in-vivo*-Resultate zutreffen müssen und umgekehrt (Witte et al. 2006 a).

3.2.3.3.1. Mg-basierte Implantate

Mg-Legierungen mit dem Zusatz an Calcium (Ca) wurden als Festkörper *in vitro* (Li et al. 2008, Li et al. 2011, Waizy et al. 2012) und *in vivo* getestet (Li et al. 2008, Krause et al. 2009, Thomann et al. 2009, Von der Höh et al. 2009, Erdmann et al. 2011). Ca-Zusätze < 1 mas% erzielten dabei die niedrigsten Korrosionsraten und angemessenere mechanische Kennwerte (Li et al. 2008, Wan et al. 2008, Waizy et al. 2012) und eine gute Biokompatibilität (Li et al. 2008, Krause et al. 2009, Thomann et al. 2009, Erdmann et al. 2011). *In vitro* wurden keine negativen Effekte auf die Zellviabilität bei Zytotoxizitätstests verzeichnet (Li et al. 2008). *In vivo* ließen sich gesteigerte knöcherne Umbauvorgänge in direkter Umgebung des Implantats und keine klinisch relevanten Gasansammlungen beobachten (Li et al. 2008, Krause et al. 2009, Thomann et al. 2009). Allerdings wurde bei MgCa_{0,8} Schrauben (Legierung mit 99,2 mas% Mg und 0,8 mas% Ca) bereits nach sechs Wochen eine fortgeschrittene Degradation *in vivo* beschrieben. Dies stellt eine zu kurze Dauer für eine Frakturfixation dar (Erdmann et al. 2011). Ähnliches fanden auch Von der Höh et al. (2006) heraus und beschrieben das Abbauverhalten von MgCa_{0,8} Implantaten als sehr unvorhersehbar. Zudem konnte in einer darauffolgenden Arbeit gezeigt werden, dass rauere Oberflächen von MgCa_{0,8} Implantaten wesentlich zu einer schnelleren Korrosion im Körper beitragen und dagegen glatter gestaltete Oberflächenausführungen langsamer korrodieren (Von der Höh et al. 2009). Krause et al. (2009) und Thomann et al. (2009) untersuchten in Kaninchentibiae implantierte MgCa_{0,8} Pins und ermittelten deren verbleibendes Volumen, mechanische Kennwerte sowie die Biokompatibilität nach drei, sechs und zwölf Monaten. Die Pins zeigten einen initial langsamen Degradationsverlauf. Jedoch wurden nach sechs Monaten deutliche Volumeneinbußen (~ 40%) ermittelt, welche aus einer bereits im dritten Monat stattfindenden Lochfraßkorrosion an der Pin-Oberfläche resultierte. Diese hatte eine uneben abgetragene Oberflächenmorphologie,

Materialverlust und Stabilitätseinbußen zur Folge (Krause et al. 2009). Zudem zeigte sich, dass die Festigkeit der MgCa_{0,8} Pins im Vergleich zu den zusätzlich analysierten Mg-Legierungen LAE442 und WE43 (Legierung mit 93 mas% Mg, 4 mas% Yttrium (W) und 3 mas% (E)) stets am geringsten ausfiel. Im Falle eines unter Belastung stehenden Knochens wurde dies als erheblicher Nachteil angesehen (Krause et al. 2009, Thomann et al. 2009). Eine ausreichende Festigkeit wird zusätzlich zu möglichst langanhaltenden duktilen Eigenschaften benötigt (Krause 2008). Bei Implantaten aus MgCa_{1,0} (Legierung mit 99 mas% Mg und 1 mas% Ca) wurden Verluste von etwa einem Drittel des ursprünglichen Gewichts nach drei Monaten verzeichnet (Li et al. 2008). Die Vermutung, dass der eingesetzte prozentuale Massenanteil an Ca maßgeblich das Abbauverhalten beeinflusst, wurde aufgrund dieser Ergebnisse bestätigt (Li et al. 2011, Waizy et al. 2012). Trotz der vorhandenen Verträglichkeit (Erdmann et al. 2011, Li et al. 2011) wurde von weiterführenden Untersuchungen am gewichtstragenden Knochen mit reinen Mg-Ca-Legierungen abgesehen.

Des Weiteren wurden Mg-Legierungen mit Zusätzen von Aluminium (Al), Zink (Z) sowie weiteren kleineren Massenanteilen $\leq 1\%$ aus Ca und Mangan (Mn) auf deren Abbauverhalten und die umliegende Osteoneogenese untersucht. Pins aus AZ31 (Legierung mit 96 mas% Mg, 3 mas% Al und 1 mas% Z) und AZ91 (Legierung mit 90 mas% Mg, 9 mas% Al und 1 mas% Z) wurden neben LAE442 intramedullär in Meerschweinchen von Witte et al. (2005) untersucht. AZ31 und AZ91 zeigten eine sehr schnelle und inhomogene Degradation innerhalb von sechs und 18 Wochen. Der eher unkontrolliert verlaufende Abbau lies AZ31 und AZ91 wesentlich schlechter abschneiden als die Vergleichsimplantate aus LAE442 der gleichen Studie. Neuer Knochen entwickelte sich jedoch ebenso um AZ31 und AZ91 wie auch um LAE442. Die Bedeutsamkeit einer homogenen und langsamen *in-vivo*-Korrosion wurde auch von Kraus et al. (2012) am Rattenmodell über 24 Wochen deutlich. Dabei wurden zwei Mg-Legierungen ZX50 (5 mas% Z und < 1 mas% Ca/Mn) sowie WZ21 (2 mas% Yttrium (W), 1 mas% Z, < 1 mas% Ca/Mn) transkortikal zur Längsachse der Femurdiaphyse als Pins implantiert. Die ermittelten Unterschiede im Degradationsablauf und der Gasfreisetzung waren markant. ZX50 verzeichnete bereits nach einer Woche einen rasanten Anstieg der Korrosion mit Volumenverlusten von über 50% nach sieben Wochen als Folge. Lochfraß auf der Pin-Oberfläche führte über den daraus resultierenden weiteren Anstieg der Gesamtoberfläche zu einer Beschleunigung der Degradation und zu einer erheblichen Wasserstoffgasfreisetzung. WZ21 hingegen

bestach durch eine konstantere und in moderaten Mengen ablaufende Gasbildung samt reduzierterer Korrosion. Etwa die Hälfte des initialen WZ21 Volumens war nach 22 Wochen degradiert. Auch wurde eine bessere Konnektivität zum Knochen auf Seiten der WZ21-Implantate erreicht.

3.2.3.3.2. Mg-basierter Knochenersatz

AZ91 wurde auch als subchondraler Knochenersatz in offenporiger, zylindrischer Form mit interkonnektierenden und zufällig verteilten Poren (10 - 1000 μm) am Kaninchenmodell für drei Monate untersucht (Witte et al. 2006 b). Hierfür wurden die Scaffolds vom Gelenk ausgehend und unterhalb der Knorpeloberfläche des rechten Femurkondylus implantiert. Auch hier degradierten die AZ91-Scaffolds an der gesetzten Defektstelle nach zwölf Wochen mehrheitlich zu schnell, um eine ausreichende Heilung innerhalb der Zeit zu gewährleisten. Zwar wurden die Randbereiche der AZ91-Scaffolds durch kalzifiziertes Gewebe ersetzt, aber ein ausreichender Ersatz der subchondralen Knochenplatte blieb aus (Witte et al. 2006 b). Die Autoren empfahlen auf Basis ihrer Beobachtungen die Korrosionsrate mit Hilfe von Oberflächenbeschichtungen zu senken (Witte et al. 2006 b). Durch die offenporige Struktur bewirkt die größere Oberfläche auch eine vermehrte Aussetzung des Biomaterials gegenüber korrosiv wirkenden Medien wie SBF („*Simulated Body Fluid*“) oder natürlichen Körperflüssigkeiten (Karageorgiou und Kaplan 2005, Wang et al. 2005, Zeng et al. 2008, Gu et al. 2012). Zusätzliche Beschichtungen (z.B. CaP oder MgF_2) oder elektrochemische Behandlungsverfahren zur Erzeugung von Oxidschichten können effektive Mittel sein, um Knochenersatzmaterialien aus Mg-Legierungen besonders in den ersten Wochen vor Korrosion zu schützen (Witte et al. 2006 b, Witte et al. 2010, Gu et al. 2012, Lalk et al. 2013, Yu et al. 2017).

Yu et al. (2017) beobachteten deutlich schnellere Degradationsverläufe von AZ31-Scaffolds ohne MgF_2 *in vitro* als auch *in vivo* im Gegensatz zu den zusätzlich mit einer MgF_2 -Schicht versehenen Scaffolds (FAZ31). Bereits bei Zytokompatibilitätstests besiedelten mehr mesenchymale Stammzellen die beschichteten Mg-Scaffolds (FAZ31). Diese Tendenz konnte nachfolgend im Kaninchenmodell mittels μCT und histologischer Präparate durch den Nachweis von neuem Knochen in direkter Umgebung als auch direkt in den 300 μm großen Poren bestätigt werden. In einer Studie mit reinen Mg-Scaffolds und unterschiedlichen Porengrößen (250 und 400 μm) wurde ein korrosionsverzögernder und osteogenetischer Effekt der MgF_2 -Beschichtung beobachtet (Cheng et al. 2016). Zusätzlich konnten die Autoren via μCT trabekuläre

Kennwerte (Trabekeldicke, -anzahl und -separation) nachweisen, welche *in vivo* um die Mg-Scaffolds mit 400 µm Poren eine höhere Knochenmasse aufzeigten.

Lalk et al. (2013) setzten mit MgF₂ beschichtete sowie zweifach beschichtete (MgF₂ und CaP) zylindrische Schwämme der Mg-Legierung AX30 (Legierung mit circa 96 mas% Mg, 3 mas% Al, und ≤ 1 mas% Ca) in den *Trochanter major* von Kaninchen ein. Durch die MgF₂-Einfachbeschichtung wiesen die ersten Schwammzylinder Porengrößen von etwa 400 µm auf, wohingegen die doppelt beschichteten Schwammzylinder Größen von circa 100 µm hatten. Abbauverhalten und knöcherner Umbau im Knochen-Schwamm-Verbund wurden mittels regelmäßiger Röntgenbilder, µCT-Messungen und histologischen Analysen über einen Zeitraum von 24 Wochen ermittelt. Die Autoren stellten neues Knochengewebe im zeitlichen Verlauf zunehmend und tiefer innerhalb der 400 µm großen Poren fest. Außerdem war deren Integration wesentlich ausgeprägter. Liu et al. (2014) untersuchten Mg-Hohlzylinder mit Poren von 1000 µm in Femurkondylen von Kaninchen und stellten nach drei Monaten ein signifikant höheres Knochenvolumen in den Mg-Scaffolds im direkten Vergleich zu HA-Keramiken fest, welche zwar die gleichen äußeren Dimensionen aufwiesen, aber keine makroporöse Porenstruktur besaßen.

Die aufgeführten Studien verdeutlichen, dass definierte poröse Gerüststrukturen oder Schwämme mit zufälliger Porenverteilung durch ihre Bauweise die Möglichkeit bieten, als Leitschiene für Zellinfiltration und Material-Zell-Interaktion zu fungieren (Groeneveld et al. 1999). Poren innerhalb von Biomaterialien können dazu beitragen die Permeabilität, Zellpenetration und -migration zu steigern sowie den Nähr- und Sauerstoffzufluss und den Abtransport von Abbauprodukten zu lenken (Hutmacher 2000, Kuboki et al. 2002, Hollister 2005, Karageorgiou und Kaplan 2005). Gleichzeitig beeinflussen oder reduzieren sie die mechanischen Eigenschaften des Materials (Hollister 2005, Pérez et al. 2013). Bei sorgsamer Auswahl kann die verwendete Porengröße maßgeblich dazu beitragen, eine abgestimmte Degradation erfolgen zu lassen, während sich zugleich neues Knochengewebe am Defektort bildet (Hollister 2005, Bonfield 2006). Idealerweise sollte der Knochenersatz kontrolliert abgebaut werden und zeitgleich zum Aufbauprozess von neuem Knochengewebe erfolgen, sodass dessen Festigkeit und Stabilität den Belastungsanforderungen vor Ort so lange wie benötigt standhalten können (Hollister 2005, Bonfield 2006). Zusätzlich ermöglicht die offenporige Gestaltung eine mechanische Verzahnung zwischen Biomaterial und dem umgebenden Knochen und schafft dadurch eine Integration an den beiden Grenzflächen

(Story et al. 1998, Karageorgiou und Kaplan 2005). Studienergebnisse von Lalk et al. (2013) zeigen, dass die Degradation von Knochenersatzstoffen aus beschichteten Mg-Legierungen noch zu schnell abläuft und verdeutlichen die Problematik, die geforderten Parameter *in vivo* ausreichend auszubalancieren (Hollister 2005, Bonfield 2006, Perez et al. 2015).

3.2.3.4. Mg-Legierungen mit Seltenen Erden

Die gegenwärtige Literatur legt dar, dass Mg und Mg-Legierungen vermehrt in Form solider Implantate untersucht wurden, wohingegen die Effekte unterschiedlicher Porengrößen auf Degradation und Osteoneogenese bisher von weitaus weniger Autoren näher untersucht wurden.

Ein Zusatz von Seltenen Erden (SE) eignet sich insbesondere, um die Materialfestigkeit und den Herstellungsprozess zu optimieren (Polmear 1999, Witte et al. 2008) sowie die Korrosionsbeständigkeit von Biomaterialien zu erhöhen (Switzer 2005, Wu et al. 2005, Krause et al. 2009). Die zugängliche Literatur zeigt, dass bei der Verwendung von SE insbesondere darauf geachtet werden muss, inwiefern ein Einzelelement der SE-Gruppe in einer Mg-Legierung verwendet wird oder deren Zusatz als Mischmetall erfolgt (Reifenrath et al. 2010, Angrisani et al. 2012). Der Gedanke die SE-Mischung durch ein einziges SE-Element in einer Mg-Legierung ersetzen zu wollen, folgt aus dem Bestreben, ein möglichst präzises und reproduzierbares Implantat zu erhalten, um den Anforderungen eines Medizinproduktes zu genügen (Reifenrath et al. 2010, Willbold et al. 2017).

Willbold et al. (2015) verglichen *in vitro* drei verschiedene Mg-Legierungen mit jeweils nur einem enthaltenen SE-Element: Lanthan (La), Neodymium (Nd) und Cerium (Ce). Die Zytotoxizitätstests mit je einhundertprozentigen Extraktionen der drei Mg-Legierungen wirkten sich zytotoxisch auf präosteoblastische, murine Zelllinien aus. Da solch hohe Ionenkonzentration *in vivo* durch den Abtransport des Blutflusses als unwahrscheinlich angesehen wurden (Willbold et al. 2015), wurden nachfolgend verdünnte Mg-SE-Extrakte hergestellt. Diese zeigten eine verbesserte Zytokompatibilität. Auffallend blieb jedoch, dass der Mg-Ce-Extrakt den stets negativsten Einfluss auf die Lebensfähigkeit der Zellen hatte. Auch Feyerabend et al. (2010) stellten bei der *in-vitro*-Untersuchung von möglichen Kurzzeiteinwirkungen der einzelner SE auf unterschiedliche Ziellinien eine zytotoxische Wirkung von Ce fest. Diese Annahme wurde durch eine Studie von Reifenrath et al. (2010) insofern bestätigt,

als in dieser Arbeit während des *in-vivo*-Vergleichs von implantierten LACer442- und LAE442-Implantaten die Kaninchen der LACer442-Gruppe deutliche Anzeichen einer Implantatunverträglichkeit aufwiesen. Reifenrath et al. (2010) mussten den geplanten Untersuchungszeitraum von drei Monaten auf einen Monat bei der LACer442-Gruppe verkürzen, da die Tiere Emphyse im Bereich der proximalen Tibia und Lahmheiten unterschiedlicher Schweregrade aufzeigten. Im μ CT beobachteten die Autoren eine sehr schnelle, inhomogene Degradation mit massivem Formverlust. Die Korrosionsprodukte waren bei der Explantation der LACer442-Implantate samt periostaler Blutungen in der Markhöhle zu erkennen. Histologisch dominierten ebenfalls die Korrosionsprodukte und die Implantatoberfläche blieb meist azellulär (Reifenrath et al. 2010). Nachfolgende Untersuchungen, in welchen LANd442 (Legierung mit 90 mas% Mg, 2 mas% Li, 2 mas% Al und 2 mas% Nd) mit Nd als alleiniges SE-Element eingesetzt wurde, zeigten eine bessere Biokompatibilität als LACer442, jedoch waren keine wesentlichen Verbesserungen gegenüber LAE442 eingetreten. Nach dem Studienabschluss von 26 Wochen kamen Ullmann et al. (2011) zum Schluss, dass LANd442 eine deutlich unregelmäßige Abbaumorphologie und geringere Festigkeit als LAE442 besitzt.

Verwendete man hingegen ein Gemisch aus SE-Elementen in einer Mg-Legierung, zeigte dies mehrfach erfolgsversprechende Aussichten seitens der biomechanischen Eigenschaften, der Degradation und der Biokompatibilität (Witte et al. 2006 a, Thomann et al. 2009, Meyer-Lindenberg et al. 2010, Witte et al. 2010, Ullmann et al. 2011, Hampp et al. 2013, Ullmann et al. 2013, Rössig et al. 2015, Angrisani et al. 2016). Die SE-Massenverhältnisse variieren innerhalb der LAE442 Mg-Legierung zueinander, von diesen repräsentieren hauptsächlich Cer, Nd und La die maßgeblichen Anteile (Polmear 1999, Angrisani et al. 2012). Die Verwendung dieser Elemente wurde mit Hinblick auf eine Reduktion der Materialdichte, verbesserter Duktilität und dem Ziel des gesteigerten Korrosionswiderstandes entwickelt (Kaesel et al. 2003, Witte et al. 2008), um die Korrosionsbeständigkeit sowie mechanische Eigenschaften des Mg weiter zu optimieren (Staiger et al. 2006, Witte et al. 2008).

Beim Meerschweinchen (Witte et al. 2006 a), Kaninchen (Krause et al. 2009, Thomann et al. 2009, Witte et al. 2010, Hampp et al. 2013, Ullmann et al. 2013, Angrisani et al. 2016) und im Großtiermodell (Rössig et al. 2015) wurde LAE442 als resorbierbares Implantat eingesetzt. Witte et al. (2006 a) verglichen LAE442 mit AZ31, AZ91 und WE43 und beobachteten bei LAE442 eine deutlich langsamer ablaufende Degradation innerhalb von 18 Wochen in Meerschweifemura (LAE442: 30%; AZ31/ AZ91/ WE43:

$\geq 70\%$). Weitere Vergleiche von Implantaten mit MgCa_{0,8} (Krause et al. 2009, Thomann et al. 2009) und LANd442 (Ullmann et al. 2011, Hampp et al. 2013) zeigten erneut die Überlegenheit der verlangsamten Abbaugeschwindigkeit zusammen mit einer ausgelobten *in-vivo*-Verträglichkeit von LAE442. Krause et al. (2009) wiesen durch mechanische Tests an explantierten LAE442-Pins eine über die Zeit höhere Festigkeit nach als bei jenen, welche aus MgCa_{0,8} und WE43 gefertigt wurden.

Eine Behandlung mittels zusätzlicher Magnesiumfluorid-Beschichtung (MgF₂) wirkte sich in den ersten vier Wochen nach Implantation von LAE442-Zylindern verzögernd und damit positiv auf die Korrosionsgeschwindigkeit aus. Auch im späteren Verlauf degradierten beschichtete LAE442-Zylinder weiterhin langsamer als deren unbeschichteten Varianten (Thomann et al. 2010, Witte et al. 2010). Zeiträume von 1 - 3,5 Jahren bestätigten, unabhängig vom verwendeten Tiermodell, dass sich LAE442 weiterhin homogen abzubauen scheint (Meyer-Lindenberg et al. 2010, Rössig et al. 2015, Angrisani et al. 2016). Dies ist vorteilhaft, da ein abbaubedingt zu rapider Anstieg von SE im Gewebe im Verdacht steht, toxisch auf Zellen wirken zu können (Feyerabend et al. 2010, Willbold et al. 2015). Ferner können größere Degradationsprodukte des Biomaterials umliegendes Gewebe reizen und zu einer Abstoßungsreaktion, Knochenresorption und Gewebsnekrosen führen (Hallab und Jacobs 2009, Reifenrath et al. 2010, Dziuba et al. 2013). SE-Gehalte in Blutseren und Organuntersuchungen zeigten bis dato bei der Implantation von LAE442 keine toxischen Tendenzen (Witte et al. 2010, Bondarenko et al. 2011, Rössig et al. 2015, Angrisani et al. 2016). Auch ist ein homogen ablaufender Abbau in chloridhaltigen Medien von wesentlichem Vorteil, da mit einem rapide fortschreitenden Abbau die Freisetzung von Wasserstoffgas als Nebenprodukt der Degradation von Mg ($\text{Mg} + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{Mg}(\text{OH})_2 + \text{H}_2$) erfolgt (Song und Atrens 1999, Staiger et al. 2006, Zeng et al. 2008). Betreffend der diskutierten Gasbildung verweist die zugängliche Literatur über LAE442 als Festkörpermodell auf gute Verträglichkeiten, trotz des anfänglichen Vorhandenseins von Gas im Implantatbereich in klinischen und röntgenologischen Untersuchungen (Witte et al. 2005, Krause et al. 2009, Thomann et al. 2009, Meyer-Lindenberg et al. 2010, Hampp et al. 2013, Rössig et al. 2015, Angrisani et al. 2016).

3.2.3.5. LAE442 als potenzielles Knochenersatzmaterial

Diverse Autoren vertreten die Auffassung, dass bei LAE442 die Voraussetzung gegeben ist, abbaubedingt entstandenes Gas kontinuierlich über Blut und Weichgewebe

abtransportieren zu können, um so die Gewebe- und Zellinfiltration während der Degradation des Materials und damit die Biokompatibilität zu gewährleisten (Witte et al. 2006, Thomann et al. 2009, Meyer-Lindenberg et al. 2010, Witte et al. 2010, Hampf et al. 2013, Rössig et al. 2015, Angrisani et al. 2016). In der Vergangenheit wurde mehrfach die Bildung von diffusen, zellleeren Gaskavitäten um den Implantationsort beschrieben (Verbrugge 1934, McBride 1938, McCord et al. 1942, Witte et al. 2005, Kuhlmann et al. 2013, Lalk et al. 2013), allerdings stehen diese konträr gegenüber anderen klinischen Berichten, welche weder bei solidem LAE442 noch anderen Mg-Legierungen Gas während der gesamten Studiendauer verzeichneten (Krause et al. 2009, Thomann et al. 2009, Meyer-Lindenberg et al. 2010, Witte et al. 2010).

Für offenporige LAE442-Scaffolds als potenziell neuer Knochenersatz-Alternative wurden mittels mechanischer Kompressionsversuche hohe Belastbarkeiten und reproduzierbare Herstellungsbedingungen ausgesprochen (Julmi et al. 2017, Julmi et al. 2019). In mechanischen Vorversuchen konnten die erstmalig aus LAE442 konstruierten und reproduzierbaren Scaffolds der auf Kaninchentibiae einwirkenden Kraft, die von Reifenrath et al. (2012) mit circa 60 N beschrieben wurde, um ein Vielfaches standhalten (Julmi et al. 2019). Bisher liegen lediglich einzelne *in-vivo*-Resultate seitens der Biokompatibilität und der Degradation vor, welche auf den Vergleich mit der ebenfalls offenporigen Legierung La2 (Kleer et al. 2019, Kleer-Reiter et al. 2021) oder den Vergleich unterschiedlicher Beschichtungen *in vitro* (Julmi et al. 2019, Maier et al. 2020) und *in vivo* (Witting et al. 2020) abzielen. Demnach gibt es keine konkreten Porengrößenempfehlungen oder Tendenzen zu Größenspektren, die auf Basis von präklinischen Studien ausgesprochen wurden, wie dies bei keramischen Biomaterialien der Fall ist (Karageorgiou und Kaplan 2005). Bezogen auf die ausgelobten mechanischen Eigenschaften (Krause et al. 2009, Julmi et al. 2019) und der mehrfach bestätigten Biokompatibilität bei soliden Implantatmaterialien (Witte et al. 2005, Thomann et al. 2009, Meyer-Lindenberg et al. 2010, Witte et al. 2010, Rössig et al. 2015, Angrisani et al. 2016) deuten bisherige Ergebnisse darauf, dass LAE442 als poröser Knochenersatz eine geeignete Materialkomposition darstellt und, weiterführend gedacht, auch für gewichtstragende Indikationen zukunftsweisend sein könnte (Maier et al. 2020, Kleer-Reiter et al. 2021).

4. Untersuchungsmethoden von Implantaten und Knochenersatzmaterialien

4.1. μ -Computertomographie

Die μ CT wird etwa seit 1980 in der präklinischen Forschung eingesetzt (Kujoory et al. 1980). Eine wesentliche Verbesserung der Datendarstellung und Genauigkeit leisteten Feldkamp et al. (1989) durch den Kegelstrahl-Algorithmus, welcher künftig 3D-Bildrekonstruktionen ermöglichte. Daraufhin wurde der, zuerst für industrielle Zwecke (Feldkamp et al. 1989, Ritman 2004) gefertigte, μ CT-Scanner für Untersuchungen *in vitro* benutzt, indem man gezielt Knochen- oder Gewebeproben analysierte (Paulus et al. 2000, Holdsworth und Thornton 2002). Hierbei erlaubt der *in-vitro*-Zustand eine hohe lokale Strahlendosis und lange Scandauer, welche sich auf einen kleinen Bereich fokussiert (Röher 2011). Dabei konnten Fragestellungen durch die Ermittlung knöcherner Parameter über Verläufe bei Osteoporose und Osteoarthritis bei Mensch (Kuhn et al. 1990, Müller und Rügsegger 1997, Ding et al. 2003) und Tier (Layton et al. 1988, Balto et al. 2000, Laib et al. 2000, Wang et al. 2007) ebenso detailliert erfasst werden, wie die Untersuchung von vaskulär-anatomischen Gegebenheiten, die zum Beispiel auf das Koronarsystem (Jorgensen et al. 1998) oder jenes der Niere abzielen (Garcia-Sanz et al. 1998, Jorgensen et al. 1998). Eine breite Varianz an Anwendungen eröffneten der Einsatz des *in-vitro*- μ CTs auch durch dessen Nutzung in der Zahnmedizin (Lee et al. 2008, Keleş et al. 2014) und in der präklinischen Phase der Prüfung von Medikamenten auf deren Wirksamkeit (Hu et al. 2002, Day et al. 2004).

Es folgten breiter angelegte Analysen im Zusammenhang mit knöchernen Veränderungen (Hankenson et al. 2005) und Krankheiten wie postmenopausaler Osteoporose (Barbier et al. 1999, Alexander et al. 2001, Bouxsein et al. 2005). Die Nachverfolgung pharmakologischer Behandlungen (Alexander et al. 2001, von Stechow et al. 2004) sowie die detaillierte Verlaufsanalyse von Heilungsgeschehen bei Knochenbrüchen (Duvall et al. 2007, Gardner et al. 2008, Morgan et al. 2009) waren ebenfalls möglich. Die Prüfung von biomedizinischen Werkstoffen in der Implantat- und Knochenersatzforschung stellt eine Schnittstelle zwischen Materialwissenschaft und medizinischer Forschung dar. Das Degradationsverhalten von Werkstoffen wird zunächst *in vitro* mittels deren Inkubation in SBF geprüft (Oyane et al. 2003, Julmi et al. 2019), um diese bei vielversprechenden Resultaten weiteren *in-vivo*-Untersuchungen zu unterziehen (Witte et al. 2006 a, Krause et al. 2009, Thomann et al. 2009, Meyer-

Lindenberg et al. 2010, Hampp et al. 2013). All diese Möglichkeiten trugen entscheidend dazu bei, die μ CT als Goldstandard in der Osteologie zu etablieren (Engelke et al. 1999, Bouxsein et al. 2010).

Die *in-vivo*- μ CT-Untersuchung besticht vor allem dadurch, dass sie Veränderungen der Knochenmorphologie dreidimensional wiedergibt und quantitative Werte innerhalb eines Individuums über mehrere Wochen verfolgbare und vergleichbar macht (Waarsing et al. 2004, Boyd et al. 2006, Krause et al. 2009, Thomann et al. 2010). Ein Individuum liefert dadurch mehr Informationen als nur zu einem Scanzeitpunkt und benötigte Tierzahlen können somit verringert werden (Paulus et al. 2001, Holdsworth und Thornton 2002, Bouxsein et al. 2010). Dank der zerstörungsfreien Untersuchungsmethode können Folgeuntersuchungen (z.B. Histologie, mechanische Tests) im Anschluss durchgeführt werden (Rüegsegger et al. 1996, Van Oosterwyck et al. 2000). Die Analysen können nach deren vorheriger Festlegung automatisiert werden und präzise ablaufen (Rüegsegger et al. 1996, Wachter et al. 2001). Die mehrfache Strahlenbelastung, welche auf die Individuen einwirkt, gilt als wesentlicher Nachteil des Verfahrens (Klinck et al. 2008). Aufarbeitungsartefakte, wie sie in histologischen Proben möglich sind, können nicht entstehen (Bernhardt et al. 2004).

Die Auswertung erfolgt meist mit deskriptiven (Kiba et al. 2003, Stoppie et al. 2007) und semiquantitativen Analysen bezüglich der Implantatdegradation, knöchernem Einwuchs und der Häufigkeit von Knochen-Implantat-Kontakten sowie einer Gasbildung im Implantationsgebiet in Anlehnung an diverse Scoring-Schemata (Krause et al. 2009, Thomann et al. 2009, Meyer-Lindenberg et al. 2010, Huehnerschulte et al. 2012, Lalk et al. 2013). Gekoppelt wird dies durch quantitative Analysen über die Knochen- und Implantatdichte (mgHA/cm^3), Knochen- und Implantatvolumen im Verhältnis zum Gesamtvolumen ($\text{BV}/\text{TV} (\%)$), sowie trabekulären Parametern wie der Trabecular-Thickness (Tb. Th (mm)), Trabecular-Separation (Tb. Sp (mm)) und der Trabecular-Number (Tn. N (1/mm)) (Singh 1978, Malluche et al. 1982, Parfitt et al. 1983, Parfitt et al. 1987, Müller und Rüegsegger 1997). Mit diesen Daten kann die Auswertung der μ CT-Daten einen präzisen und schnellen Aufschluss über strukturelle Verhältnisse gegenüber der vorher standardmäßig verwendeten 2D-Histomorphometrie geben (Parfitt et al. 1987, Müller et al. 1998, Thomsen et al. 2005). Für eine Bewertung der Biokompatibilität stehen zelluläre Wechselwirkungen an der Grenzfläche zwischen Knochen und dem Biomaterial im Fokus (Nuss und von Rechenberg 2008). Die Lichtmikroskopie von histologischen Präparaten muss trotzdem ergänzend erfolgen, da

die zellulären Gegebenheiten nicht hinreichend mit dem μ CT detektiert werden können (Engelke et al. 1999, Wachter et al. 2001, Thomsen et al. 2005).

4.2. Histologische Untersuchung

Um Knochenersatzstoffe als biokompatibel einstufen zu können, muss die Wechselwirkung zwischen Knochen und dem körperfremden Material auf zellulärer Ebene evaluiert werden (Osborn 1985, An und Martin 2003). Hierfür werden unentkalkte Knochenproben in einer Formaldehydlösung fixiert und anschließend durch eine aufsteigende Alkoholreihe entwässert (Romeis 1989, Lang 2006), um sie durch ein Intermedium (Xylol) in das hydrophobe Einbettmedium verbringen zu können (Junqueira und Carneiro 2004). Die Methode der Probeneinbettung in Kunststoff wird vorwiegend angewendet, wenn mineralisiertes Gewebe in Verbindung mit Implantaten untersucht werden soll (Lang 2006). Die ausgehärteten Kunstharzblöcke können mittels Hartschliff-Mikrotom oder dem Trenn-Dünnschliffverfahren auf etwa 10 μ m heruntergeschliffen und poliert werden (Donath und Breuner 1982, Donath 1988). Beim Schneiden mit dem Mikrotom besteht die Gefahr des Herauslösen des Implantats aus dem Knochenverbund (Willbold et al. 2015), wohingegen das Trenn-Dünnschliffverfahren bis zum Erreichen der nötigen Präparat-Dicke zeitaufwendig ist (An und Martin 2003) und ein hoher Materialverlust entsteht (Hammer 1997). Der Vorteil der Kunstharz-Einbettung bei unentkalkten Proben ist der Erhalt des Mineralgehaltes (Romeis 1989). Demgegenüber steht die vorherige Entkalkung der Proben, welche das Schneiden erleichtert und sich damit zeitlich und technisch weniger aufwendig gestaltet. Der Mineralgehalt von Knochenproben wird durch Zugabe von Säuren (z.B. Ameisensäure, Trichloressigsäure oder Ethylendiamintetraessigsäure) verringert, sodass sich der Schneideprozess einfacher und schneller durchführen lässt (Lang 2006). Entkalkte Proben werden schrittweise dehydriert, mit Paraffin infiltriert und durch Gefriermikrotome, Schlitten- oder Rotationsmikrotome zugeschnitten. Nach deren Färbung sollten diese zur Konservierung und Untersuchung in ein Einschlussmedium gebracht werden (Romeis 1989).

Die Hämatoxylin-Eosin Färbung eignet sich auch in der Knochenhistologie, um eine Übersicht der im Präparat vorhandenen Zell- und Gewebearten sowie über die Zellmorphologie zu erhalten. Zellkerne, basophile Substanzen und grampositive Bakterien stellen sich blau dar, der Rest färbt sich in unterschiedlich intensiven Rotabstufungen an (Lang 2006). Eine Abgrenzung verschiedener Gewebearten erhält man mittels der Masson-Goldner Trichromfärbung. Insbesondere der Unterschied

zwischen mineralisierter und nicht-mineralisierter Knochensubstanz wird klar angezeigt, indem sich das Hartgewebe grünlich und leuchtend darstellt. Das Osteoid erscheint rot, Zellkerne schwarz-bläulich und das Zytoplasma braun-rötlich (Lang 2006). Die von Kossa-Färbung zielt durch das indirekte Färbeprinzip, welches auf dem Austausch von Calcium- gegen Silberionen beruht, auf die deutliche Markierung von mineralisiertem Knochengewebe ab, welches sich dunkelbraun bis schwarz darstellt (Romeis 1989, Kerr 1999, Lang 2006). Die TRAP-Färbung ist entgegen den bereits erwähnten Färbungen eine enzymhistochemische Färbung und lässt Rückschlüsse auf die Aktivität der knochenresorptiven Vorgänge zu. TRAP bezeichnet das Enzym Tartrat-resistente saure Phosphatase („*tartrate resistant acid phosphatase*“). Das Enzym kommt vornehmlich in Osteoklasten vor und gilt als zuverlässiger Nachweis dieses Zelltyps und seiner Vorläuferzellen (Ballanti et al. 1997). Um Informationen über knöcherne Umbauprozesse als auch über verschiedene Gewebearten zu erhalten, ist die Toluidinblau-Färbung geeignet (Donath 1988, Kerr 1999). Diese Färbung besticht durch ihre einfache Anwendbarkeit und gute Standardisierung (Lang 2006). Diese metachromatische Oberflächenfärbung (Romeis 1989) ist sowohl sehr gut als Übersichtsfärbung zu verwenden (Lang 2006, Klein 2008), differenziert Knochenzellen und macht Unterschiede in der Mineralisierung des Knochengewebes in abgestuften Blautönen deutlich (Romeis 1989, Kerr 1999, Klein 2008). Dagegen sind Knorpelmatrix und Wundheilungsareale metachromatisch rotviolett gefärbt (Lang 2006).

Im Wesentlichen unterscheidet man bei der histologischen Auswertung zwischen deskriptiven Methoden und der quantitativen Histomorphometrie (An und Martin 2003). Die erste Analyse konzentriert sich auf verschiedene Interessensbereiche, wie das Implantat selbst, dessen Umgebung, die Knochen-Implantat-Übergangzone („*Interface*“) sowie das in das Scaffold einwachsende Gewebe. In diesen Bereichen werden Entzündungszellen, Knochenzellen, deren Vorstufen sowie der Grad der Vaskularisation und Entstehung von fibrösem Gewebe, endostales und periostales Knochenremodelling, Knochen-Implantat-Kontakte und Fremdkörperreaktionen sowie Resorptionsgeschehen untersucht (Thomann et al. 2009, Meyer-Lindenberg et al. 2010, Dziuba et al. 2013, Hofmann et al. 2013, Lalk et al. 2013, Uebersax et al. 2013). Weiterhin werden bezüglich des eingesetzten Biomaterials die Degradation (Meyer-Lindenberg et al. 2010, Lalk et al. 2013) sowie bei Mg-basierten Materialien eine eventuell auftretende Gasbildung beschrieben (Witte et al. 2005, Reifenrath et al. 2010, Hampp et al. 2013, Lalk et al. 2013, Rössig et al. 2015). Zu diesem Zweck haben sich semiquantitative Scoring-Schemata in vielen Studien zu Implantat- oder

Knochenersatzmaterialien etabliert, um eine generelle Bewertung des Gewebes zu erhalten (Jansen et al. 1994, An und Martin 2003, Krause 2008, Hofmann et al. 2013, Uebersax et al. 2013). Die quantitative Histomorphometrie ist ein Verfahren, welches auf einer quantitativen Datenerfassung der nach Parfitt et al. (1987) festgesetzten Parametern basiert. Hierfür können digitalisierte Bilder histologischer Präparate, abhängig von deren Eignung, manuell bis vollautomatisch nach Längen, Distanzen, Flächen und der Anzahl von Komponenten untersucht werden (Recker 1983). Um unterschiedliche Gewebe und Materialien zuverlässig voneinander differenzieren zu können, müssen diese sich unterschiedlich anfärben lassen und wenig Artefakte aufweisen (Bockholdt 2005). Bereiche von Granulationsgewebe, Osteoid oder mineralisiertem Knochen lassen sich markieren und in ein Flächenverhältnis zueinander setzen (Janning et al. 2010, Lalk et al. 2013). Eine korrekte Histomorphometrie setzt eine einheitliche Implantatschnittebene voraus, um vergleichbare Daten zu erhalten. Kann letzteres nicht gewährleistet werden, ist die Grundlage für valide, quantitative Daten nicht ausreichend vorhanden (Rüegsegger et al. 1996). In solchen Fällen werden daher semiquantitative Analysen bevorzugt, um generelle Trends verfolgen zu können (An und Martin 2003, Krause 2008, Hofmann et al. 2013, Uebersax et al. 2013) und einer breiten Daten-Streuung entgegenzuwirken (Maglio et al. 2020).

4.3. Analysen durch Rasterelektronenmikroskopie und energiedispersiver Röntgenspektroskopie

Zur Erweiterung der Untersuchungen stellen das Rasterelektronenmikroskop (REM) und die energiedispersive Röntgenanalyse (EDX) geeignete Methoden dar, um Informationen über die vorherrschenden, ultrastrukturellen Gegebenheiten im Bereich des Implantat-Knochenverbundes zu erhalten (Schmidt 2000). Mittels REM können Oberflächen, wie etwa medizinische Werkstoffe, präzise topographisch dargestellt werden (An und Martin 2003). Bei der EDX-Untersuchung erfolgt ebenfalls eine Oberflächenanalyse, welche punktuell auf die chemische Elementzusammensetzung abzielt. Des Öfteren erfolgen die beiden Untersuchungen in Kombination als eine REM/EDX-Analyse (Witte et al. 2005, Krause et al. 2009, Thomann et al. 2009, Zhang et al. 2009, Zhang et al. 2010, Ullmann et al. 2011, Lee et al. 2016).

Die Oberfläche wird hierbei mit einem präzisen Primärelektronen-Strahl abgetastet. In Abhängigkeit von der Materialzusammensetzung entstehen Wechselwirkungen mit dem zu untersuchenden Objekt in Form von Sekundärelektronen, die Rückschlüsse auf die

qualitative Oberflächentopografie geben, und Rückstreuielektronen, welche ein chemisches Bild der Oberfläche hinsichtlich der Elementverteilung erzeugen. Des Weiteren entsteht Röntgenstrahlung, welche für die EDX-Analyse genutzt wird. Diese wird mittels eines Röntgendetektors erfasst und kann anhand der elementspezifischen Ordnungszahl quantifiziert und den enthaltenen Elementen an den gemessenen Lokalisationen zugeordnet werden (Schmidt 2000). Die REM/EDX Analyse gilt als eine Standardmethode zur Untersuchung von Implantaten und Knochenersatzstoffen hinsichtlich ihrer Materialzusammensetzung und der Materialveränderung. Die oft an Querschliffen durchgeführten Untersuchungen liefern allerdings nur lokale Informationen für die untersuchten Interessensbereiche und sollten mit 3D-Analysen ergänzt werden (Witte et al. 2006 a).

III. PUBLIKATIONEN

Ergebnisse dieser Dissertation wurden in international anerkannten Fachzeitschriften (Peer-Review-Prozess) zur Veröffentlichung angenommen:

1. **Publikation Nr. 1**

Angenommen: 02.03.2020

Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials

Augustin J, Feichtner F, Waselau A-C, et al.: Comparison of two pore sizes of LAE442 scaffolds and their effect on degradation and osseointegration behavior in the rabbit model. *J Biomed Mater Res.* 2020;1-13

DOI: 10.1002/jbm.b.34607

ORIGINAL RESEARCH REPORT



Comparison of two pore sizes of LAE442 scaffolds and their effect on degradation and osseointegration behavior in the rabbit model

Julia Augustin¹ | Franziska Feichtner¹ | Anja-Christina Waselau¹ | Stefan Julmi² | Christian Klose² | Peter Wriggers³ | Hans Jürgen Maier² | Andrea Meyer-Lindenberg¹

¹Clinic for Small Animal Surgery and Reproduction, Ludwig-Maximilians-Universität, Munich, Germany

²Institut für Werkstoffkunde, Leibniz Universität Hannover, An der Universität 2, Garbsen, Germany

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

Correspondence

Andrea Meyer-Lindenberg, Clinic for Small Animal Surgery and Reproduction, Ludwig-Maximilians-Universität, Munich, Germany. Email: ameylin@lmu.de

Funding information

Deutsche Forschungsgemeinschaft, Grant/Award Number: 271761343

Abstract

The magnesium alloy LAE442 emerged as a possible bioresorbable bone substitute over a decade ago. In the present study, using the investment casting process, scaffolds of the Magnesium (Mg) alloy LAE442 with two different and defined pore sizes, which had on average a diameter of 400 μm (p400) and 500 μm (p500), were investigated to evaluate degradation and osseointegration in comparison to a β -TCP control group. Open-pored scaffolds were implanted in both greater trochanter of rabbits. Ten scaffolds per time group (6, 12, 24, and 36 weeks) and type were analyzed by clinical, radiographic and μ -CT examinations (2D and 3D). None of the scaffolds caused adverse reactions. LAE442 p400 and p500 developed moderate gas accumulation due to the Mg associated in vivo corrosion, which decreased from week 20 for both pore sizes. After 36 weeks, p400 and p500 showed volume decreases of 15.9 and 11.1%, respectively, with homogeneous degradation, whereas β -TCP lost 74.6% of its initial volume. Compared to p400, osseointegration for p500 was significantly better at week 2 postsurgery due to more frequent bone-scaffold contacts, higher number of trabeculae and higher bone volume in the surrounding area. No further significant differences between the two pore sizes became apparent. However, p500 was close to the values of β -TCP in terms of bone volume and trabecular number in the scaffold environment, suggesting better osseointegration for the larger pore size.

KEYWORDS

biodegradation, magnesium, osseointegration, porous, scaffolds

1 | INTRODUCTION

The gold standard for larger bone defects is the use of autologous bone grafts with the advantage of osteoinductive, osteoconductive, and adapted mechanical properties (Yoshikawa & Myoui, 2005). However, the associated risk factors are numerous (Prolo & Rodrigo, 1985).

Creating a second surgical site, limited availability and donor-site morbidity represent an additional burden for the patient and limit the applicability of bone grafts (Arrington, Smith, Chambers, Bucknell, & Davino, 1996; Banwart, Asher, & Hassanein, 1995; Younger & Chapman, 1989).

Commonly used alternatives are bone substitutes made of biocompatible, biodegradable ceramics (Nuss & von Rechenberg, 2008)

or polymers (Agarwal, Curtin, Duffy, & Jaiswal, 2016). However, ceramics such as β -tricalcium phosphate (β -TCP) are brittle and are susceptible to fatigue fractures, which limits their use under load (Ignatius et al., 2001). Studies have shown that the use of polymers such as polyglycolides (PGA) and polylactides (PLA) can trigger foreign body reactions while degrading (Bergsma, Rozema, Bos, & Bruijn, 1993; Böstman et al., 1989; Sukanuma & Alexander, 1993). Due to a lack of long-term stability, their use is also restricted to areas of the bone that are not exposed to great stress (Agarwal et al., 2016).

In order to avoid or significantly reduce limited mechanical stability and biocompatibility, more attention is being paid to bioresorbable bone substitutes consisting of magnesium alloys (Agarwal et al., 2016). The mechanical properties such as the Young's modulus ($E = 41\text{--}45\text{ GPa}$) and the density ($1.74\text{--}1.84\text{ g/cm}^3$) of magnesium (Mg) are similar to bone ($E = 15\text{--}25\text{ GPa}$ /density = $1.8\text{--}2.1\text{ g/cm}^3$) (Staiger, Pietak, Huadmai, & Dias, 2006), so the use of Mg as a bioresorbable metal can ensure long-term stability during the healing phase (Angrisani, Seitz, Meyer-Lindenberg, & Reifenrath, 2012). At the beginning of the last century, investigations with Mg implants were already being carried out on humans and animals to analyse the degradation of pure Mg in the form of plates, screws, and pins (Lambotte, 1932; Mcbride, 1938; Verbrugge, 1933; Verbrugge, 1934). Due to too rapid degradation of implants made of pure Mg and the resulting gas formation ($\text{Mg} + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{Mg}(\text{OH})_2 + \text{H}_2$) these implants have not yet found broad clinical application (Song & Atrens, 1999; Staiger et al., 2006).

Recently, Mg was reintroduced as an implant material. The corrosion behavior of Mg could be slowed down by adding various elements such as aluminum (Al), zinc (Zn), lithium (Li), and rare earth elements (SE). This resulted in better primary stability with good biocompatibility (Angrisani et al., 2012; Angrisani et al., 2016; Hampp et al., 2013; Höh et al., 2009; Lalk et al., 2013; Lalk, Reifenrath, Rittershaus, Bormann, & Meyer-Lindenberg, 2010; Meyer-Lindenberg et al., 2010; Rossig et al., 2015; Thomann et al., 2009; Witte et al., 2005; Witte et al., 2006; Witte et al., 2010). Compared with Al-Zn alloys (AZ91, AZ31) and an alloy with yttrium and rare earths (WE43) (Witte et al., 2005), the Mg alloy LAE442 (90 wt% Mg, 4 wt% Li, 4 wt% Al, 2 wt%) has proven to be a promising implant in various animal studies with regard to its good mechanical stability and biocompatibility (Angrisani et al., 2012; Angrisani et al., 2016; Hampp et al., 2013; Meyer-Lindenberg et al., 2010; Reifenrath et al., 2010; Rossig et al., 2015; Witte et al., 2005; Witte et al., 2006; Witte et al., 2010).

The ideal bone substitute material should not only retain its mechanical stability, but also degrade over time in a controlled manner as new bone grows into the substitute (Phemister, 1935). Pores were incorporated into biodegradable bone substitutes in order to adapt to the structure of bone and promote the ingrowth of blood vessels and migration of bone progenitor cells (Kuboki et al., 1998). The size spectrum of the pores ranged from micropores ($<100\text{ }\mu\text{m}$) to macropores (up to about $1000\text{ }\mu\text{m}$) and different porosities of the material were employed. Pore sizes in a range of $100\text{--}500\text{ }\mu\text{m}$ for ceramics as well as for metals proved to be beneficial for osseointegration (Bobyn, Pilliar, Cameron, & Weatherly, 1980; Bohner et al., 2017; Cheng et al.,

2016; Galois & Mainard, 2004; Hofmann et al., 2013; Hulbert et al., 1970; Itälä, Ylänen, Ekholm, Karlsson, & Aro, 2001; Karageorgiou & Kaplan, 2005; Klenke et al., 2008; von Doernberg et al., 2006).

In a preliminary study, the MgF_2 coated alloy AX30 used as a porous sponge with inhomogeneously distributed pores showed good osseointegration in a rabbit model, but its degradation was still too fast (Lalk et al., 2013). The objective of the present study was to investigate the slow degrading LAE442 alloy for the first time as reproducible, porous scaffolds, instead of solid bodies used as bone substitute material in former investigations (Angrisani et al., 2016; Hampp et al., 2013; Meyer-Lindenberg et al., 2010; Reifenrath et al., 2010; Rossig et al., 2015; Witte et al., 2005; Witte et al., 2006). Since pore sizes of a bone substitute also play an important role in the formation of new bone tissue (Karageorgiou & Kaplan, 2005), the osteoconductive properties of two different pore sizes of LAE442 were also compared in the present study.

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | Magnesium alloy and scaffold structure

The magnesium alloy LAE442 (4 wt% lithium, 4 wt% aluminum, 2 wt% rare earths) was produced using the manufacturing process suggested by Seitz et al. (2011).

To produce the porous scaffolds, exact models of the scaffolds were created using the fused deposition modeling process with individual successive layers of wax on a 3D printer (SolidScape, Inc., Merrimack) (Julmi, Klose, Krüger, Wriggers, & Maier, 2017). For the following investment casting process, the resulting single wax cylinders were attached together to a model wax tree. A subsequent dipping process of this wax tree in gypsum (Gilcast AM, BK Giulini GmbH, Ludwigshafen, Germany) produced the final casting mold for the scaffolds. The subsequent firing process hardened the casting mold and melted out the pattern material. Two versions of the cylindrical LAE442 scaffolds ($\varnothing 4\text{ mm}$, height 5 mm , $n = 40$ per version) were manufactured. Both scaffold models had homogeneously arranged interconnecting pores. The first model featured an average pore size of $400\text{ }\mu\text{m}$ (p400) with intermediate strut elements of 0.4 and 0.3 mm , a porosity of 43% and a volume of 37 mm^3 . The second model had an average pore size of $500\text{ }\mu\text{m}$ (p500), strut elements of 0.4 and 0.5 mm , a porosity of 41% and a volume of 38 mm^3 (Figure 1). The cast scaffolds were coated with a MgF_2 layer using the "conversion coating method" (Julmi et al., 2019).

The control group consisted of commercially available resorbable β -TCP (Cerasorb M, Curasan AG, Kleinostheim, Germany), which was produced in corresponding dimensions ($\varnothing 4\text{ mm}$, height 5 mm) for this study with a porosity of 65% (micro-, meso- and macropores $\leq 500\text{ }\mu\text{m}$). Prior to implantation, the scaffolds were sterilized by gamma rays of $>29\text{ Gy}$ (BBF-Sterilisations service GmbH, Kernen, Germany).

2.2 | Animal model

The animal experiments were approved with the reference number ROB 55.2-1-54-2532-181-2015 by the regional government of Upper Bavaria, under paragraph 8 of the Animal Welfare Act. Sixty adult female ZIKA rabbits (Assamhof, Kissing, Germany) with an average weight of 3.93 kg (\pm 0.27 kg) were used for this study. The animals were randomly divided into scaffold and time groups. According to the study by Lalk et al. (2010), two scaffolds (one per hind limb) were implanted per rabbit in the cancellous part of the greater trochanter of the femur (Figure 2a). In all three groups (p400, p500, and β -TCP) a total of 40 scaffolds were used. These remained for investigation periods of 6, 12, 24, and 36 weeks respectively, so that a total of 10 scaffolds per time group were examined. The animals were kept in

accordance with the European Convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes (Appendix A, ETS 123). In addition to rationed commercial pellet feed (Kanin Kombi, Rieder Asamhof GmbH & Co KG, Kissing, Germany), hay and water were provided ad libitum.

2.3 | Operation

Anaesthesia was induced intramuscularly with 0.15 mg/kg ketamine (Anesketin[®] 100 mg/ml, Albrecht GmbH, Aulendorf, Germany) and 0.25 mg/kg medetomidine (Dorbene vet[®] 1 mg/ml, Zoetis Deutschland GmbH, Berlin, Germany). A venous catheter was placed in the auricular vein of the animals. The animals were intubated and the

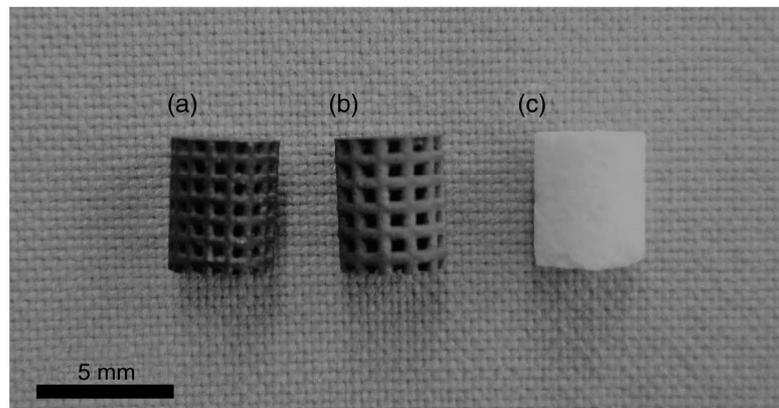


FIGURE 1 Scaffold types used (a) LAE442 p400, (b) LAE442 p500, (c) β -TCP

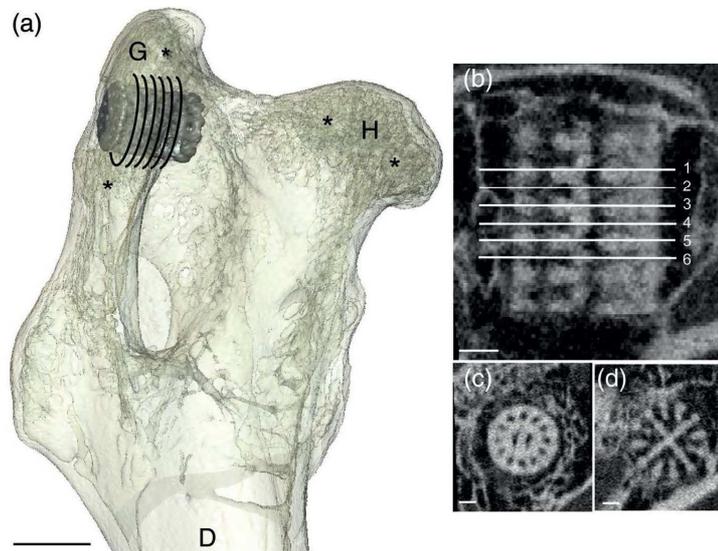


FIGURE 2 (a) Scaffold position after implantation in a rabbit femur; D, medullary canal; G, greater trochanter; H, femur head; asterisks, cancellous bone; scale bar: 5 mm; (b) μ -CT longitudinal section of a LAE442 p500 scaffold: starting from the drill hole side, six consecutive strut and pore cross sections were examined for bone-scaffold contacts in each scaffold sample, scale bar: 1 mm; (c) strut cross section, (d) pore cross section shown within a LAE442 p500 scaffold, scale bar: 1 mm

surgical field was aseptically prepared. Anaesthesia was maintained with isoflurane (1.5–2 vol% with simultaneous oxygen supply of 1 L/min) and analgesia was ensured with a fentanyl infusion of 10 µg/ml (Fentadon®, 50 µg/ml, CP-Pharma Handelsgesellschaft mbH, Burgdorf, Germany). The greater trochanter was accessed through ~2 cm long skin incision. Subcutaneous fat tissue and underlying musculature were prepared in order to expose the bone using a periosteal elevator. A 6 mm deep hole was drilled into the greater trochanter using a surgical power tool (Colibri II, Synthes GmbH, Oberdorf, Switzerland) with a Ø 4 mm drill bit. The resulting drilling residues were eliminated by suction. The scaffold was placed approximately 1 mm below the outer contour of the bone (Figure 2a). The wound was then sutured in layers with absorbable sutures (Monosyn® 4/0, B. Braun Surgical S.A., Rubi, Spain) and the overlying skin was closed with non-absorbable sutures (Optilene® 4/0, B. Braun Surgical S.A.). Postoperatively, each animal received a single intravenous dose of 20 µg/kg buprenorphine (Bupresol®, 0.3 mg/ml, CP-Pharma Handelsgesellschaft mbH, Burgdorf, Germany). From the time of surgery up to the fifth day postoperative, 10 mg/kg/day enrofloxacin (Enrobactin®, 25 mg/ml, CP-Pharma Handelsgesellschaft mbH, Burgdorf, Germany) and 0.3 mg/kg/day meloxicam (Rheumocam®, 1.5 mg/ml, Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co. KG, Ingelheim am Rhein, Germany) were given orally. A general examination of the animals as well as wound and lameness examinations were carried out daily.

2.4 | X-ray investigations

The pelvis and the femora were X-rayed in ventrodorsal position directly after surgery, in the further course every 2 weeks until week 12, then every 4 weeks until week 36 (Multix Secret DR, Siemens, Erlangen, Germany, 4.5 mA s, 55 kV). The evaluation was carried out with the software dicomPACS® vet (version 8.3.20; Oehm und Rehbein GmbH, Rostock, Germany). Based on a study by Lalk et al. (2010), a semiquantitative scoring system was used to determine the

TABLE 1 Scoring system used for evaluation of bone and scaffold related changes at the implantation site as observed on radiographs in ventrodorsal position

| Parameter | Score 0 | Score 1 | Score 2 |
|---|---------|--------------------------------|---------------------------------------|
| Gas | None | Few or diffuse | Clear and measurable bubbles |
| Bone-like structures in surrounding muscles | None | 1–3 structures of ≤2 mm | 1–3 structures >2 mm or >3 structures |
| Periosteal bone formation | None | ≤7 mm in length and ≤2 mm wide | >7 mm in length and >2 mm wide |
| Visibility of the scaffold | Yes | No | – |

following parameters: gas outside the bone (descriptive), periosteal bone formation in the region of the implant site (mm), bone-like structures in the surrounding muscle tissue (number and size in mm). The scores ranged from 0 (unchanged state) to 2 (clearly altered). In addition, the visibility of the scaffolds was evaluated with the score values 0 (visible) and 1 (not visible) (Table 1).

2.5 | In vivo µ-CT investigation

The µ-computer tomography examinations (XtremeCT II, Scanco Medical, Zurich, Switzerland) were also performed directly after surgery and subsequently at the same times as the X-ray examinations. The following settings were used: isotropic voxel size: 30.3 µm, tube voltage: 68 kV, current: 1470 µA, projections: 1000/180°, integration time: 200 ms. For the µ-CT scans the animals were given an intramuscular anaesthesia (0.15 mg/kg ketamine, Anesketin® 100 mg/ml, Albrecht GmbH, Aulendorf, Germany; 0.25 mg/kg medetomidine, Dorbene vet® 1 mg/ml, Zoetis Deutschland GmbH, Berlin, Germany). The scanning area was defined from just below the lesser trochanter to about 5 mm above the greater trochanter. The µ-CT analyses were performed in two and three dimensions.

2.5.1 | Semiquantitative in vivo 2D evaluation in scaffold longitudinal and cross section

Evaluation of gas formation and bony reactions in the scaffold longitudinal section

The evaluation of the 2D cross-sectional images was based on the established semiquantitative scoring system by Lalk et al. (2010) (Table 2). In the longitudinal sections of the scaffolds, the following parameters were evaluated: location of the scaffolds, gas formation in the bone in three different locations (within the scaffold/around the scaffold/in the medullary canal), periosteal bone formation (length in mm), bone-like structures in the surrounding musculature (number and size in mm) and drill hole closure. Scores for the scaffold location ranged from score 0 (completely embedded in cancellous bone) to 2 (mainly in medullary canal or penetrating through corticalis) and were evaluated in the first scan. The other score parameters ranged from 0 (unchanged state/not existing) to 2 (clearly altered). The scores of gas accumulation in the different bone locations were added up to give a total score.

Evaluation of the bone-scaffold contacts in the scaffold cross section

To obtain uniform cross-sectional views for the evaluation of the scaffolds, the scaffold longitudinal sections were manually contoured and reoriented using the µ-CT evaluation program V 6.4-2 (Scanco Medical, Zurich, Switzerland). Bone-scaffold contact was determined according to the protocols used by Lalk et al. (Lalk et al., 2010; Lalk et al., 2013) (Table 2). Six central cross sections per scaffold were evaluated, which were located in the cancellous area of the greater trochanter (Figure 2).

TABLE 2 Scoring system employed for in vivo μ -computer tomography (XtremeCT II)

| Parameter | Score 0 | Score 1 | Score 2 |
|--|--|--|---|
| Location of the scaffolds (at first scan directly postsurgery) | Completely embedded in cancellous bone | Mainly in cancellous bone | Mainly in medullary canal or penetrating through corticalis |
| Gas* | | | |
| -Within scaffold | None | Few or diffuse | Clear and measurable bubbles |
| -Around scaffold | | | |
| -In medullary canal | | | |
| Bone-like structures in surrounding muscles | None | 1–3 structures of ≤ 2 mm | 1–3 structures > 2 mm or > 3 structures |
| Periosteal bone formation | None | ≤ 7 mm in length and ≤ 2 mm wide | > 7 mm in length and > 2 mm wide |
| Drill hole closure | Closed | Partially closed | Open |
| Bone-scaffold contact | Many direct contact points to trabecular bone, only isolated gaps in between | Trabecular bone in surrounding but only few contacts points, clear gaps in between | No contact to trabecular bone, complete gap around the scaffold |

Note: Parameters were evaluated over the entire scan area, while the bone-scaffold contact was evaluated in six cross sections through the scaffolds (starting from the drill hole direction: 3x pore-section, 3x strut-section alternately), cross sections shown in Figure 2(c) and (d). The individual gas values (*) were summed up to a total score.

2.5.2 | Quantitative in vivo 3D evaluation

For the quantitative 3D evaluation, it was necessary to determine the respective threshold for LAE442 (146), β -TCP (148), and for cancellous bone (120). Five femora of healthy rabbits of the same breed and age were scanned without scaffolds to determine the threshold of cancellous bone in the greater trochanter. Two "regions of interest" (ROI) were defined for the evaluation of scaffold degradation and osseointegration in vivo.

Evaluation of scaffold degradation

The first ROI was determined by placing a standardized cylinder in the middle part of the scaffold with a diameter of 132 voxels (equivalent to 3.99 mm). The height of the cylinder was 50 slices (equivalent to 1.52 mm) for p400 and 60 slices for p500 and β -TCP (equivalent to 1.82 mm) (Xu et al., 2018). The different heights resulted from the two different pore sizes of the LAE442 scaffolds and were chosen for both types of the scaffolds so that the same two pore and strut sections were always included in the calculations (Figure 3a,b). The scaffold density (mg HA/cm³) and the scaffold volume (mm³) were determined each time. To compare the scaffold volumes despite the differing pore sizes, the percentage scaffold volume share (%) was additionally calculated. To calculate the in vivo corrosion rate, the scaffold volume (mm³) and the scaffold surface (mm²) were determined.

Evaluation of osseointegration in the scaffold surroundings

The second ROI, a double ring around the first ROI, was set to analyse bone growth behavior (Bissinger et al., 2017). For all scaffold groups, the inner circle of the double ring had a diameter of 134 voxels (corresponding to 4.06 mm) and a distance of 400 μ m to the outer circle with 159 voxels (corresponding to 4.82 mm) (Figure 3c). Within the second ROI, bone density (mg HA/cm³), bone volume fraction (%), trabecular number (1/mm), trabecular thickness (mm), and trabecular separation (mm) were determined.

2.5.3 | In vivo corrosion rate of the scaffolds

The determined μ -CT data sets were used to calculate the in vivo corrosion rates of the scaffolds as a function of volume loss and implant duration using $CR = \Delta V / (A \times t)$ (Witte et al., 2006). CR represents the in vivo corrosion rate (mm/year), ΔV is the difference between the initial volume and the residual volume, A is the scaffold surface (mm²) of the implant and t is the exposure time in days.

2.6 | Statistics

The mean values and their standard deviations were calculated from the data. The statistical evaluation was carried out with Microsoft Office Excel[®] Version 2016 (Microsoft Office XP, Microsoft Corporation, Redmond) and SPSS[®] Version 25.0 (SPSS, IBM Company, Chicago). Distribution characteristics were determined by using the Shapiro–Wilk test and histograms. Since the data did not show normal distribution, the groups were tested for significance by using the non-parametric Kruskal–Wallis test with a one-way analysis of variance (ANOVA) and subsequent Bonferroni post hoc comparison. Statistically significant differences were defined as $p < .05$.

3 | RESULTS

3.1 | Clinical examinations

Overall, none of the animals exhibited clinical adverse reactions. According to a physiological healing process, mild swelling and slight redness occurred around the surgical site. These disappeared in all cases within the first days after surgery and did not lead to any impairment of the animals. There was no evidence of infection of the bone or soft tissue. Lameness and signs of pain could not be detected

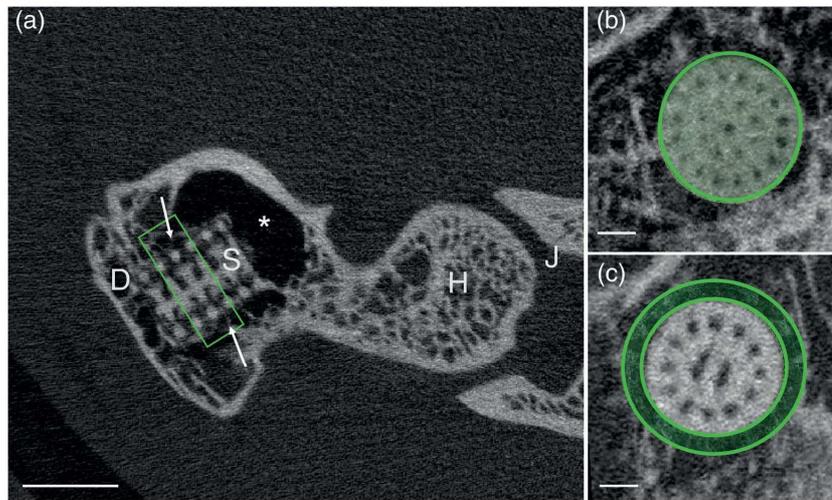


FIGURE 3 (a) Longitudinal section of scaffold, green box, area of quantitative 3D measurements; D, periosteal bone formation; H, femur head; J, hip joint and acetabulum; S, scaffold; arrows, trabecular meshwork with scaffold contacts; asterisk, medullary cavity; (b) first ROI for scaffold degradation; (c) second ROI within a 400 µm wide double ring around the scaffold where bone values were measured

in any animal. Emphysematous swellings were not present over the whole investigation period.

3.2 | Radiological evaluation

There was no gas accumulation in the surrounding soft tissue for p400 and β -TCP at any time except immediately after surgery. In the p500 scaffold group, two animals showed a mild gas accumulation in the soft tissue close to the implant site up to week 4 and week 6, respectively. All scaffolds of p400 and p500 were clearly visible over the entire 36-week period. Single β -TCPs were no longer recognizable from week 10 and were no longer visible at all from week 24 onwards.

Postoperatively, periosteal bone formation was found in the area of the implant site, which steadily increased in size over time and reached an average length of >7 mm in all scaffold groups up to week 36. In addition, smaller bone-dense structures were found in the muscle tissue near the implant site, which increased in size over time.

3.3 | Semiquantitative in vivo μ -CT evaluations

3.3.1 | Results of gas formation and bone reactions in the 2D scaffold longitudinal section

All scaffolds were precisely inserted into the intended cancellous part of the greater trochanter (Figure 4a). Gas formation was observed for p400 and p500 over the entire duration of the study. The highest increase in gas was noted directly postoperative up to week 2. At that

time, p400 showed significantly more gas than p500 ($p = .047$). In comparison, the presence of gas was only noted directly postoperative in the β -TCP group. Overall, p500 showed less gas accumulation than p400. The two LAE442 scaffolds increased their gas formation until week 20 and subsequently decreased to a moderate amount in week 36 (Figure 4b).

Small periosteal bone formations around the implant site were already detected in week 2 in all scaffolds. These increased in size and reached maximum values of 19.1 mm \times 3.3 mm in the p400 group (week 28), 19.4 mm \times 2.7 mm in the p500 group (week 24) and 23.6 mm \times 5.9 mm in the β -TCP group (week 16). Small, bone-like structures were also found in the surrounding muscle tissue, which became larger over time (Figure 4c,d).

The fastest drill hole closure was detected with the β -TCP scaffolds (Figure 4e). In week 6 85% of the 40 β -TCPs showed a compact, bony layer above the drill site. In p400 63.3% of the scaffolds showed a drill hole closure at week 12, and in p500 76.6% of the drill holes were closed at week 12. One drill hole in both p400 and p500 scaffold groups stayed incompletely covered with bone until the end of the 36-week investigation period.

3.3.2 | Bone-scaffold contact in 2D scaffold cross sections

In the initial stage, the two pore sizes of the LAE442 scaffolds showed only isolated bone-scaffold contacts. After week 12 (p400) and 16 (p500) the number of detected contacts increased until week 36. Although p500 always showed more bone-scaffold contacts than

p400 based on the scores, differences between both pore sizes were significant only in week 2 ($p = .007$). In comparison, β -TCP already showed numerous bone-scaffold contacts in week 2, which

increased in number by week 36. β -TCP showed therefore significant differences to p400 and p500 at any time ($p < .05$) (Figures 4f and 5).

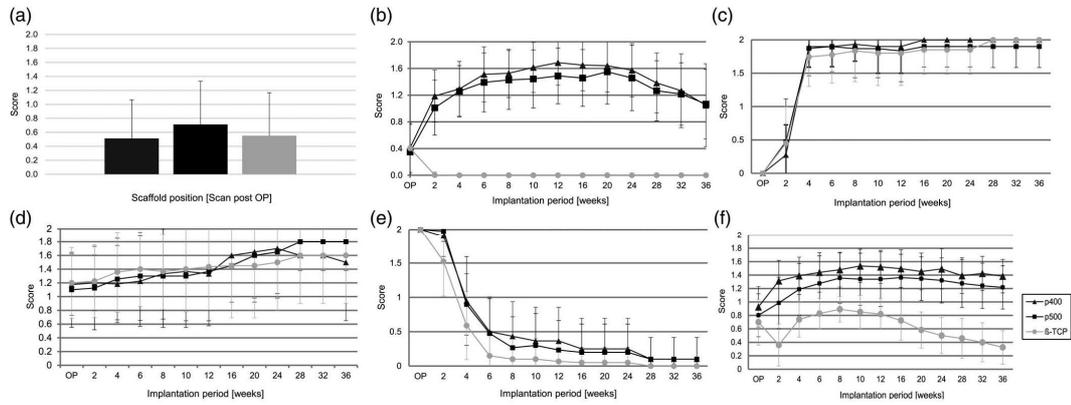


FIGURE 4 2D semiquantitative evaluation of the in vivo μ -CT parameters (a) location of the scaffolds; (b) gas accumulation; (c) periosteal bone formation; (d) bone-like structures in the surrounding musculature; (e) drill hole closure; (f) bone-scaffold contact. (a)–(e) were evaluated using the longitudinal view of scaffolds, (f) was evaluated using the cross-sectional view of scaffolds

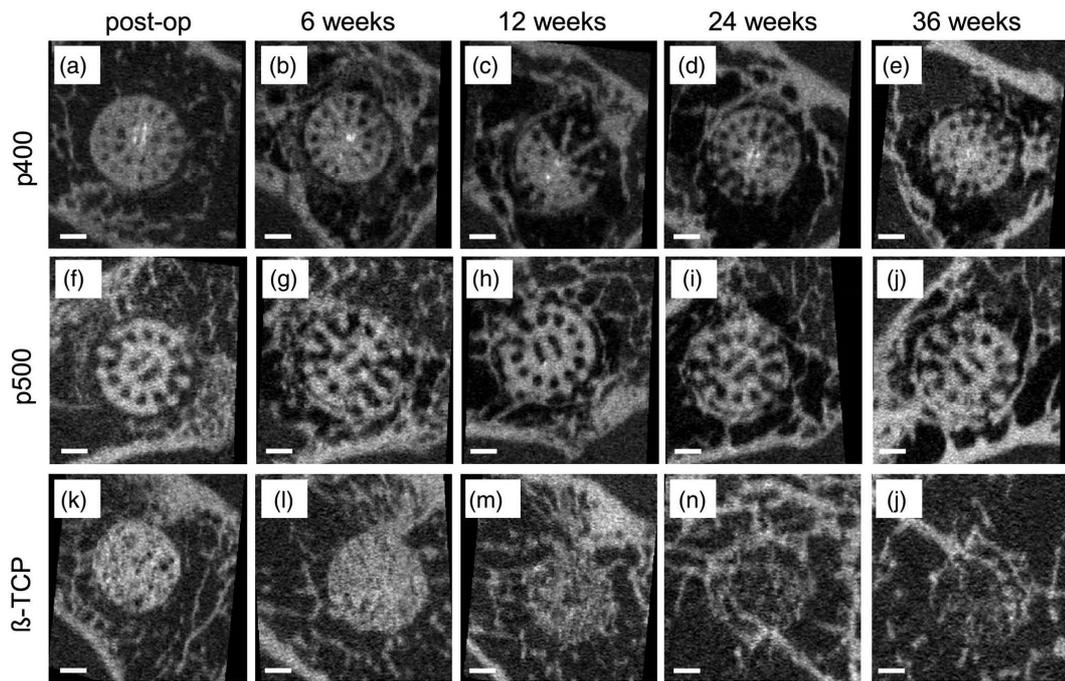


FIGURE 5 Osseointegration behavior based on reoriented scaffold cross sections: one sample per scaffold group over the study period post op, 6, 12, 24, and 36 weeks with increasing number of bone-scaffold contacts. (b)–(e) and (g)–(j): gas accumulation (black areas around both types of the LAE442 scaffolds)

3.4 | Quantitative in vivo 3D evaluation

3.4.1 | Results of scaffold degradation

The density of LAE442 scaffolds decreased only slightly with 2% for p400 and 1.8% for p500 after week 36, respectively, regardless of pore size, whereas β -TCP showed a density loss of 6.4% after week 36 (Figure 6a). The calculated scaffold volume decreased by a total of 15.9% for p400 and 11.1% for p500 by week 36. The largest volume loss occurred between the time directly postoperative and week 2 for p400 with 7.5% and p500 with 6%. In contrast, the volume of β -TCP was reduced by more than half after week 12 and dropped to 25.4% of the original volume by week 36 (Figure 6b).

Both LAE442 scaffolds showed the fastest in vivo corrosion rate between directly postoperative and week 2, with 3.76×10^{-1} mm/year for p400 and 2.86×10^{-1} mm/year for p500. Subsequently both slowed down to an average rate of 4.55×10^{-2} mm/year for p400 and 3.71×10^{-2} mm/year for p500 after 36 weeks. β -TCP degraded fastest from week 4 to week 6 with 2.09 mm/year and had significantly higher in vivo corrosion rates than the LAE442 scaffolds at any time.

3.4.2 | Results of bone remodeling in the scaffold surroundings

Bone density increased in both pore sizes after surgery and exceeded the comparison values of cancellous rabbit bones (733.3 mg HA/cm^3)

at weeks 16 (p400) and 24 (p500). β -TCP also showed an overall increase in bone density in the immediate vicinity of the scaffolds, which exceeded the comparison values of cancellous bone in the greater trochanter at week 6 and remained highest of all material groups (Figure 7a). The bone volume fraction in the scaffold environment was similar for all three scaffold groups. After an initial increase, the volumes leveled to values in the cancellous bone area from week 8. In week 2, a significantly higher bone volume was determined for p500 compared to p400 ($p = .026$). Later, p400 also showed the lowest bone volume fraction compared to p500 and β -TCP (Figure 7b).

In accordance with the bone volume, the number of trabeculae for p500 and β -TCP also increased at the beginning. From week 8 onwards, the number of trabeculae corresponded to the comparison values of cancellous bone. From week 16, p500 had a slightly higher number of trabeculae than β -TCP. The smaller pore size p400, on the other hand, had a significantly lower trabecular number in week 2 than p500 and β -TCP ($p \leq .007$) and was also behind in later measurements (Figure 8a).

The trabecular thickness of the LAE442 scaffolds was slightly less pronounced than that with β -TCP. However, from week 28 onwards, p500 again reached values corresponding to the cancellous bone of nonoperated, healthy rabbits, whereas p400 showed no improvement in trabecular thickness at later points in time. The measured distances between individual trabeculae increased over time for all scaffold groups. The largest trabecular separation was always determined for p400, followed by p500 and finally β -TCP (Figure 8a,b).

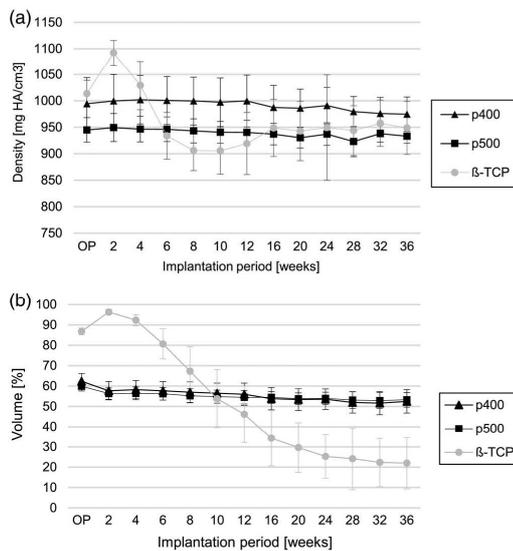


FIGURE 6 3D quantitative evaluation of the in vivo μ -CT: (a) scaffold density (mg HA/cm^3) and (b) percentage scaffold volume share (%) were calculated over a study duration up to 36 weeks (ROI for measuring the scaffold degradation)

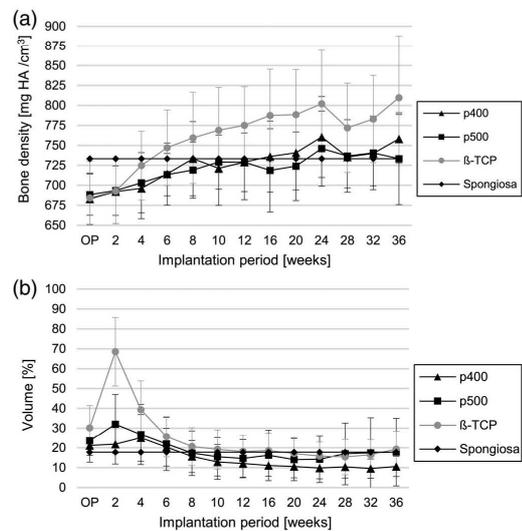
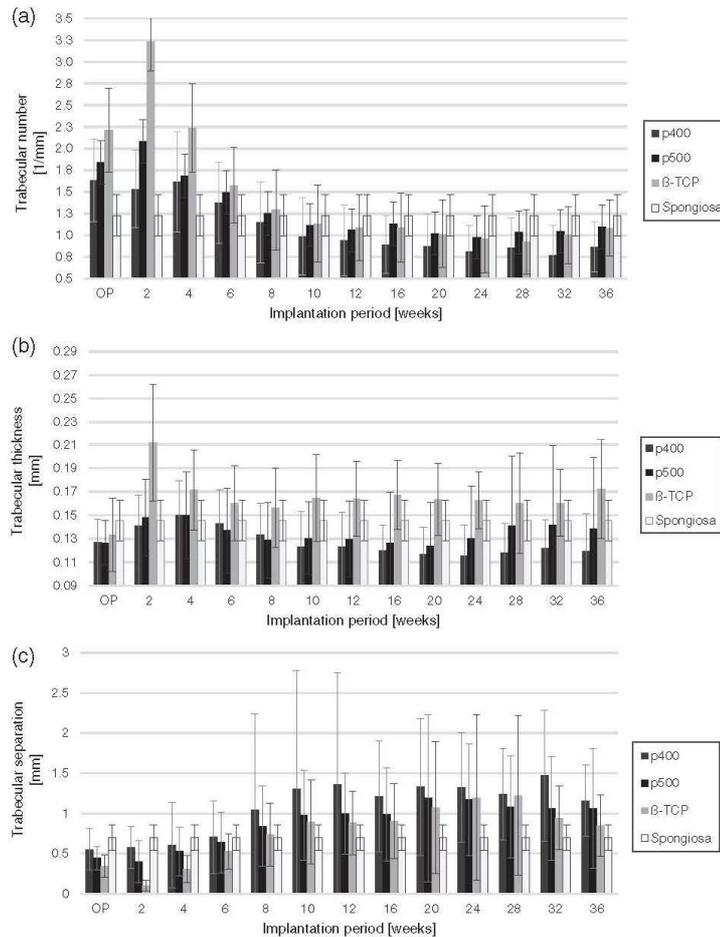


FIGURE 7 3D quantitative evaluation of the in vivo μ -CT: (a) bone density (mg HA/cm^3) and (b) bone volume (%) were measured during the implantation period up to 36 weeks in the ROI within a 400 μm wide double ring around the scaffolds

FIGURE 8 3D quantitative evaluation of trabecular values from in vivo μ -CT during the implantation period: (a) trabecular number (1/mm), (b) trabecular thickness (mm), and (c) trabecular separation (mm) for an ROI within a 400 μ m wide double ring around the scaffolds



4 | DISCUSSION

The LAE442 alloy has already been classified by in vivo studies as a biocompatible and slowly degrading bone substitute (Angrisani et al., 2012; Angrisani et al., 2016; Hampp et al., 2013; Meyer-Lindenberg et al., 2010; Reifenrath et al., 2010; Rossig et al., 2015; Thomann et al., 2009; Witte et al., 2005; Witte et al., 2006). So far, however, only solid implants from LAE442 have been investigated (Angrisani et al., 2016; Hampp et al., 2013; Krause et al., 2009; Meyer-Lindenberg et al., 2010; Reifenrath et al., 2010; Rossig et al., 2015; Thomann et al., 2009; Witte et al., 2005; Witte et al., 2006; Witte et al., 2010; Wolters et al., 2013). LAE442 was investigated in this study for the first time as an open-pored scaffold with a reproducible arrangement of defined pores in rabbit femur. It is known that bone substitute materials with pores as a structural factor favor the ingrowth of blood vessels and cell migration and thus promote

osteogenesis (Karageorgiou & Kaplan, 2005; Klenke et al., 2008). Lalk et al. (2013) already investigated the Mg alloy AX30 with inhomogeneous pore distribution and size in preliminary studies in rabbits. Despite good osseointegration, the cylindrical Mg sponge structures degraded too quickly. For the current study, scaffolds of the Mg alloy LAE442 with uniform defined pore sizes and the ceramic β -TCP as control group were investigated in the cancellous part of the greater trochanter of rabbits. The animals were examined clinically and with imaging techniques (RX, μ -CT) over a period up to 36 weeks and the implanted scaffolds were analyzed for their degradation and osseointegration behavior.

The implantation-related surgical wounds healed without any clinical complications. Subcutaneous emphysema, which occurred in previous studies in LAE442 near the implant site (Hampp et al., 2013; Witte et al., 2005; Wolters et al., 2013), was not observed in the present study. Accordingly, LAE442 scaffolds p400 and p500 were

tolerated clinically as well as β -TCP. No animal showed lameness or signs of pain. These results are consistent with previous *in vivo* studies, which also investigated the degradation behavior of LAE442 over longer time periods (Angrisani et al., 2016; Meyer-Lindenberg et al., 2010; Rossig et al., 2015).

Periosteal bone formation and smaller bone-like structures in the surrounding soft tissue close to the implant site were visible in x-ray and *in vivo* μ -CT of all three scaffold groups. These observations were also described by Lalk et al. (2013) who examined AX30 sponge structures at the same implant site in rabbits. Other authors also reported bone formation at the site of insertion of LAE442 implants placed in the tibia (Hampp et al., 2013; Rossig et al., 2015; Thomann et al., 2009). The stimulating effect of magnesium on bone growth (Revell, Damien, Zhang, Evans, & Howlett, 2004; Zreiqat et al., 2002) is discussed here, but the surgical procedure, especially the drilling process, may also have an influence on the development of periosteal growth (Danckwardt-Lillieström, 1969; Höh et al., 2009).

The implanted LAE442 scaffolds p400 and p500 were clearly visible on X-rays throughout the study. This observation matches the μ -CT results with only minimal decrease in density and small volume losses. The small standard deviations of the volume losses that occurred at the individual points in time could indicate a homogeneous degradation of the LAE442 scaffolds (Huehnerschulte et al., 2012). Angrisani et al. (Angrisani et al., 2016) recorded a volume loss of 2% of intramedullary LAE442 pins after 36 weeks for cylindrical implants without pores, whereas the LAE442 scaffolds used in this study degraded faster. Reasons for this deviation could be the varying implantation site (Wolters et al., 2013) with associated different blood perfusion (Kraus et al., 2018) and the porosity of the LAE442 scaffolds enlarging the contact surface (Karageorgiou & Kaplan, 2005). Compared to the aforementioned porous Mg sponges of the alloy AX30, which showed a volume loss of about 76% after 24 weeks (Lalk et al., 2013), LAE442 with homogeneous pore structure degraded to a lesser extent (μ -CT: 15.9% for p400 and 11.1% after 36 weeks). In the present study, p400 showed a somewhat stronger percentage of volume loss compared to p500. This difference may be due to deviating scaffold geometries (Wolters et al., 2013). P400 includes thinner strut elements with a rougher surface and a slightly higher porosity (Julmi et al., 2019), this may lead to a higher contact surface with the host tissue, being more susceptible to degradation (Karageorgiou & Kaplan, 2005).

In comparison with the LAE442 scaffolds, the tendency of an irregular degradation of β -TCP over time could be observed in the X-ray evaluations as well as in the μ -CT scans. A decrease in volume of 74.6% (μ -CT) by the end of the observation period, together with larger standard deviations, indicate a more irregular degradation of β -TCP (Huehnerschulte et al., 2012; Nuss & von Rechenberg, 2008). This inhomogeneous degradation behavior paired with the brittle properties of β -TCP limits its use as a bone substitute in weight-bearing bone (Nuss & von Rechenberg, 2008).

The results obtained for the *in vivo* corrosion rate showed that the LAE442 scaffolds degraded significantly slower than β -TCP. In both LAE442 scaffolds, the fastest corrosion rate and the largest

volume loss occurred between direct postoperative and week 2. This matches the tendency of an initially accelerated degradation of LAE442 that was observed in other studies in rabbits (Krause et al., 2009; Ullmann, Reifenrath, Seitz, Bormann, & Meyer-Lindenberg, 2013) and guinea pigs (Witte et al., 2005; Witte et al., 2006). It is assumed that this can be attributed to the drop in pH value after implantation of the Mg implants, which favors Mg degradation. As a possible reason for the subsequent reduction of degradation, it is described that a protective layer of calcium and phosphorus forms around the scaffolds at later experimental points (Witte et al., 2005). This phenomenon could explain the slowdown in the *in vivo* corrosion rates of LAE442 after week 2.

Bone-scaffold contact sites were observed in all three scaffold groups. However, there were differences in the amount of these contacts. Compared to p400, p500 showed a higher number of bone-scaffold contacts with significantly more contacts at week 2. P500 also showed a higher bone volume fraction and a higher number of trabeculae in the scaffold environment than p400 in the quantitative 3D analyses over the entire period. These two parameters differed significantly at week 2 after surgery. Similar results were also observed in the study by Cheng et al. (2016). In that study, pure Mg scaffolds with pore sizes of 250 and 400 μ m were investigated in rabbit femora for their influence on bone formation. After 16 weeks, more bone tissue was present around the Mg scaffolds with the larger pore size. Lalk et al. (2013) also described a better osseointegration of porous, coated AX30 scaffolds with a pore size of about 400 μ m compared to scaffolds with a smaller pore size of about 100 μ m. Controversially, other studies showed no differences between different pore sizes on bone ingrowth behavior (Ayers et al., 1999; Fisher et al., 2002; Kujala, Ryhänen, Danilov, & Tuukkanen, 2003). However, other materials such as nickel, titanium, or polymers were used, so these results may not be necessarily comparable to the ones obtained for the LAE442 alloy.

The bone-scaffold contacts of p400 and p500 were observed to be thin and finely woven. Fine woven bone contacts have also been described in studies on solid intramedullary LAE442 pins in rabbit models (Angrisani et al., 2016; Hampp et al., 2013; Thomann et al., 2009). Compared to LAE442, the bone-scaffold contacts of β -TCP in the present study were already well defined after 2 weeks and there were significant differences compared to p400 and p500 until the end of the study. β -TCP had a higher bone volume, a larger number of trabeculae and greater trabecular thickness than p400. Later, p500 showed similar bone volume and trabecular number in the scaffold environment compared to β -TCP. This indicates that the larger pore size p500 had better osteoconductive properties than p400 in the current study. It should be noted that the comparison between the control group and LAE442 scaffolds might be hampered by the fact of varying pore structure. The biocompatible β -TCP ceramic (Nuss & von Rechenberg, 2008; von Doernberg et al., 2006) was selected as a control, however, it was not possible to manufacture the implants with the same geometry as the porous LAE442.

The LAE442 scaffolds showed gas accumulations in the surroundings of the implant during the weeks after surgery. A slightly more

pronounced gas development was found for p400 than for p500. This observation could be related to the higher degradation of p400, since it has already been described in the literature that a faster degradation of Mg alloys produces more gas (Song & Atrens, 1999; Staiger et al., 2006). However, as in other studies, the gas did not lead to any clinical side effects (Angrisani et al., 2016; Rossig et al., 2015). In the present study, an increase in trabecular thickness and bone volume in the scaffold environment of LAE442 was observed parallel with the decrease in gas volumes from week 20 onwards. In an investigation of ZX50 pins in a rat model, Kraus et al. (Kraus et al., 2012) also observed that bone augmentation could take place after gas reduction. It is therefore important that gas formation and absorption remain in tolerable limits for the body so that the bone formation and remodeling is not impaired.

Basically, the pore size p500 showed slower in vivo degradation than p400. With overall higher bone formation and initially reduced gas production, this leads to a more promising osseointegration of LAE442 p500 at early stages of the bone remodeling process. Later in time there were no further significant differences for the two pore sizes. However, LAE442 p400 remained slightly below the level of p500 overall in the analyses.

5 | CONCLUSION

The pore sizes p400 and p500 of the Mg alloy LAE442 showed the same good clinical tolerability as the control group β -TCP, due to the absence of negative clinical side effects over an investigation period up to 36 weeks. The homogeneous degradation behavior of the open-pored LAE442 scaffolds resulted in an only slight volume reduction at the end of the study. The osseointegration behavior was more pronounced in p500 than in p400. Thus, LAE442 scaffolds appear attractive for use as potential bone substitutes for clinical interventions on weight-bearing bone. The prerequisite for a later clinical application of LAE442 as a bone substitute is a more controlled gas production by accordingly optimizing alloy compositions and surface coatings, and further improvement of bone ingrowth behavior.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank the German Research Foundation for its financial support within the project "Interfacial effects and integration behaviour of magnesium-based sponges as bioresorbable bone substitute material" (Grant No. 271761343). Furthermore, the authors thank Lisa Wurm and Beatrix Limmer for their outstanding technical assistance.

CONFLICT OF INTEREST

The authors hereby declare that none of them has any conflict of interest with the content of the article.

REFERENCES

Agarwal, S., Curtin, J., Duffy, B., & Jaiswal, S. (2016). Biodegradable magnesium alloys for orthopaedic applications: A review on corrosion,

biocompatibility and surface modifications. *Materials Science & Engineering. C, Materials for Biological Applications*, 68, 948–963.

- Angrisani, N., Reifenrath, J., Zimmermann, F., Eifler, R., Meyer-Lindenberg, A., Vano-Herrera, K., & Vogt, C. (2016). Biocompatibility and degradation of LAE442-based magnesium alloys after implantation of up to 3.5 years in a rabbit model. *Acta Biomaterialia*, 44, 355–365.
- Angrisani, N., Seitz, J.-M., Meyer-Lindenberg, A., & Reifenrath, J. (2012). Rare earth metals as alloying components in magnesium implants for orthopaedic applications. In *New Features on Magnesium Alloys*. Rijeka, Croatia: Intech.
- Arrington, E. D., Smith, W. J., Chambers, H. G., Bucknell, A. L., & Davino, N. A. (1996). Complications of iliac crest bone graft harvesting. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 329, 300–309.
- Ayers, R. A., Simske, S. J., Bateman, T. A., Petkus, A., Sachdeva, R. L. C., & Gyunter, V. E. (1999). Effect of nitinol implant porosity on cranial bone ingrowth and apposition after 6 weeks. *Journal of Biomedical Materials Research*, 45(1), 42–47.
- Banwart, J. C., Asher, M. A., & Hassanein, R. S. (1995). Iliac crest bone graft harvest donor site morbidity. *A Statistical Evaluation. Spine (Phila pa 1976)*, 20(9), 1055–1060.
- Bergsma, E. J., Rozema, F. R., Bos, R. R. M., & Bruijn, W. C. D. (1993). Foreign body reactions to resorbable poly(l-lactide) bone plates and screws used for the fixation of unstable zygomatic fractures. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 51(6), 666–670.
- Büssinger, O., Probst, F. A., Wolff, K.-D., Jeschke, A., Weitz, J., Deppe, H., & Kolk, A. (2017). Comparative 3D micro-CT and 2D histomorphometry analysis of dental implant osseointegration in the maxilla of minipigs. *Journal of Clinical Periodontology*, 44(4), 418–427.
- Bobyn, J. D., Pilliar, R. M., Cameron, H. U., & Weatherly, G. C. (1980). The optimum pore size for the fixation of porous-surfaced metal implants by the ingrowth of bone. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 150, 263–270.
- Bohner, M., Baroud, G., Bernstein, A., Döbelin, N., Galea, L., Hesse, B., Heuberger, R., Meille, S., Michel, P., von Rechenberg, B., Sague, J., & Seeherman, H. (2017). Characterization and distribution of mechanically competent mineralized tissue in micropores of β -tricalcium phosphate bone substitutes. *Materials Today*, 20(3), 106–115.
- Böstman, O., Hirvensalo, E., Vainionpää, S., Mäkelä, A., Vihtonen, K., Törmälä, P., & Rokkanen, P. (1989). Ankle fractures treated using biodegradable internal fixation. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 238, 195–203.
- Cheng, M. Q., Wahafu, T., Jiang, G. F., Liu, W., Qiao, Y. Q., Peng, X. C., Cheng, T., Zhang, X. L., He, G., & Liu, X. Y. (2016). A novel open-porous magnesium scaffold with controllable microstructures and properties for bone regeneration. *Scientific Reports*, 6, 24134.
- Danckwardt-Lillieström, G. (1969). Reaming of the medullary cavity and its effect on diaphyseal bone: A fluorochromic, microangiographic and histologic study on the rabbit tibia and dog femur. *Acta Orthopaedica Scandinavica*, 40(sup128), 1–165.
- Fisher, J. P., Vehof, J. W., Dean, D., van der Waerden, J. P. C., Holland, T. A., Mikos, A. G., & Jansen, J. A. (2002). Soft and hard tissue response to photocrosslinked poly(propylene fumarate) scaffolds in a rabbit model. *Journal of Biomedical Materials Research*, 59(3), 547–556.
- Galois, L., & Mainard, D. (2004). Bone ingrowth into two porous ceramics with different pore sizes: An experimental study. *Acta Orthopaedica Belgica*, 70(6), 598–603.
- Hampf, C., Angrisani, N., Reifenrath, J., Bormann, D., Seitz, J. M., & 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. *Materials Science & Engineering. C, Materials for Biological Applications*, 33(1), 317–326.
- Hofmann, S., Hilbe, M., Fajardo, R. J., Hagenmüller, H., Nuss, K., Arras, M., Müller, R., von Rechenberg, B., Kaplan, D. L., Merkle, H. P., & Meinel, L. (2013). Remodeling of tissue-engineered bone structures

- in vivo. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 85(1), 119–129.
- Höh, N. V. D., Bormann, D., Lucas, A., Denkena, B., Hackenbroich, C., & Meyer-Lindenberg, A. (2009). Influence of different surface machining treatments of magnesium-based Resorbable implants on the degradation behavior in rabbits. *Advanced Engineering Materials*, 11(5), B47–B54.
- Huehnerschulte, T. A., Reifenrath, J., von Rechenberg, B., Dziuba, D., Seitz, J. M., Bormann, D., ... 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. *Bio-medical Engineering Online*, 11, 14.
- Hulbert, S. F., Young, F. A., Mathews, R. S., Klawitter, J. J., Talbert, C. D., & Stelling, F. H. (1970). Potential of ceramic materials as permanently implantable skeletal prostheses. *Journal of Biomedical Materials Research*, 4(3), 433–456.
- Ignatius, A. A., Augat, P., Ohnmacht, M., Pokinskyj, P., Kock, H. J., & Claes, L. E. (2001). A new bioresorbable polymer for screw augmentation in the osteosynthesis of osteoporotic cancellous bone: A biomechanical evaluation. *Journal of Biomedical Materials Research*, 58(3), 254–260.
- Itälä, A. I., Ylänen, H. O., Ekholm, C., Karisson, K. H., & Aro, H. T. (2001). Pore diameter of more than 100 µm is not requisite for bone ingrowth in rabbits. *Journal of Biomedical Materials Research*, 58(6), 679–683.
- Julmi, S., Klose, C., Krüger, A.-K., Wriggers, P., Maier, H. J. Development of sponge structure and casting conditions for absorbable magnesium bone implants. TMS 2017 146th Annual Meeting & Exhibition Supplemental Proceedings; 2017. p 307–317.
- Julmi, S., Krüger, A.-K., Waselau, A.-C., Meyer-Lindenberg, A., Wriggers, P., Klose, C., & Maier, H. J. (2019). Processing and coating of open-pored absorbable magnesium-based bone implants. *Materials Science and Engineering: C*, 98, 1073–1086.
- Karageorgiou, V., & Kaplan, D. (2005). Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials*, 26(27), 5474–5491.
- Klenke, F. M., Liu, Y., Yuan, H., Hunziker, E. B., Siebenrock, K. A., & Hofstetter, W. (2008). Impact of pore size on the vascularization and osseointegration of ceramic bone substitutes in vivo. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 85A(3), 777–786.
- Kraus, T., Fischerauer, S., Treichler, S., Martinelli, E., Eichler, J., Myrissa, A., ... Weinberg, A. M. (2018). The influence of biodegradable magnesium implants on the growth plate. *Acta Biomaterialia*, 66, 109–117.
- Kraus, T., Fischerauer, S. F., Hanzl, A. C., Uggowitzer, P. J., Löffler, J. F., & Weinberg, A. M. (2012). Magnesium alloys for temporary implants in osteosynthesis: in vivo studies of their degradation and interaction with bone. *Acta Biomaterialia*, 8(3), 1230–1238.
- Krause, A., von der Höh, N., Bormann, D., Krause, C., Bach, F.-W., Windhagen, H., & Meyer-Lindenberg, A. (2009). Degradation behaviour and mechanical properties of magnesium implants in rabbit tibiae. *Journal of Materials Science*, 45(3), 624–632.
- Kuboki, Y., Takita, H., Kobayashi, D., Tsuruga, E., Inoue, M., Murata, M., Nagai, N., Dohi, Y., & Ohgushi, H. (1998). BMP-induced osteogenesis on the surface of hydroxyapatite with geometrically feasible and nonfeasible structures: Topology of osteogenesis. *Journal of Biomedical Materials Research*, 39(2), 190–199.
- Kujala, S., Ryhänen, J., Danilov, A., & Tuukkanen, J. (2003). Effect of porosity on the osteointegration and bone ingrowth of a weight-bearing nickel-titanium bone graft substitute. *Biomaterials*, 24(25), 4691–4697.
- Lalk, M., Reifenrath, J., Angrisani, N., Bondarenko, A., Seitz, J.-M., Mueller, P. P., & Meyer-Lindenberg, A. (2013). Fluoride and calcium-phosphate coated sponges of the magnesium alloy AX30 as bone grafts: A comparative study in rabbits. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 24(2), 417–436.
- Lalk, M., Reifenrath, J., Rittershaus, D., Bormann, D., & 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(12), 1025–1034.
- Lambotte, A. (1932). L'utilisation du magnésium comme matériel perdu dans l'osteosynthèse. *Bull Mem Soc Nat Chir*, 28, 1325–1334.
- Mcbride, E. D. (1938). Magnesium screw and nail transfixion in fractures. *Southern Medical Journal*, 31(5), 508–514.
- Meyer-Lindenberg, A., Thomann, M., Krause, A., Bormann, D., von Rechenberg, B., & Windhagen, H. (2010). Untersuchungen zum Einsatz einer Magnesiumbasislegierung als neues resorbierbares Implantatmaterial für die Osteosynthese. *Kleintierpraxis*, 55, 349–363.
- Nuss, K. M. R., & von Rechenberg, B. (2008). Biocompatibility issues with modern implants in bone – a review for clinical orthopedics. *The Open Orthopaedics Journal*, 2, 66–78.
- Pemister, D. B. (1935). Bone growth and repair. *Annals of Surgery*, 102(2), 261–285.
- Prolo, D. J., & Rodrigo, J. J. (1985). Contemporary bone graft physiology and surgery. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 200, 322–342.
- Reifenrath, J., Krause, A., Bormann, D., von Rechenberg, B., Windhagen, H., & Meyer-Lindenberg, A. (2010). 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*, 41(12), 1054–1061.
- Revell, P. A., Damien, E., Zhang, X., Evans, P., & Howlett, C. R. (2004). The effect of magnesium ions on bone bonding to hydroxyapatite coating on titanium alloy implants. *Trans Tech Publications*, 254, 447–450.
- Rossig, C., Angrisani, N., Helmecke, P., Besdo, S., Seitz, J. M., Welke, B., Fedchenko, N., Kock, H., Reifenrath, J. (2015). In vivo evaluation of a magnesium-based degradable intramedullary nailing system in a sheep model. *Acta Biomaterialia*, 25, 369–383.
- Seitz, J.-M., Collier, K., Wuif, E., Bormann, D., Angrisani, N., Meyer-Lindenberg, A., & Bach, F.-W. (2011). The effect of different sterilization methods on the mechanical strength of magnesium based implant materials. *Advanced Engineering Materials*, 13(12), 1146–1151.
- Song, G. L., & Atrens, A. (1999). Corrosion mechanisms of magnesium alloys. *Advanced Engineering Materials*, 1(1), 11–33.
- Staiger, M. P., Pietak, A. M., Huadmai, J., & Dias, G. (2006). Magnesium and its alloys as orthopedic biomaterials: A review. *Biomaterials*, 27(9), 1728–1734.
- Suganuma, J., & Alexander, H. (1993). Biological response of intramedullary bone to poly-L-lactic acid. *Journal of Applied Biomaterials*, 4(1), 13–27.
- Thomann, M., Krause, C., Bormann, D., Von der Höh, N., Windhagen, H., & 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(1–2), 82–87.
- Ullmann, B., Reifenrath, J., Seitz, J. M., Bormann, D., & Meyer-Lindenberg, A. (2013). Influence of the grain size on the in vivo degradation behaviour of the magnesium alloy LAE442. *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers. Part H*, 227(3), 317–326.
- Verbrugge, J. (1933). La tolérance du tissu osseux vis-à-vis du magnésium métallique. *Presse méd*, 55, 1112–1114.
- Verbrugge, J. (1934). *Le Matériel métallique résorbable en chirurgie osseuse, par Jean Verbrugge*. Paris: Masson.
- von Doernberg, M.-C., von Rechenberg, B., Bohner, M., Grünenfelder, S., van Lenthe, G. H., Müller, R., Gasser, B., Mathys, B., Baroud, G., & Auer, J. (2006). In vivo behavior of calcium phosphate scaffolds with four different pore sizes. *Biomaterials*, 27(30), 5186–5198.
- Witte, F., Fischer, J., Nellesen, J., Crostack, H. A., Kaese, V., Pisch, A., Beckmann, F., & Windhagen, H. (2006). In vitro and in vivo corrosion measurements of magnesium alloys. *Biomaterials*, 27(7), 1013–1018.

- Witte, F., Fischer, J., Nellesen, J., Vogt, C., Vogt, J., Donath, T., & Beckmann, F. (2010). In vivo corrosion and corrosion protection of magnesium alloy LAE442. *Acta Biomaterialia*, 6(5), 1792–1799.
- Witte, F., Kaese, V., Haferkamp, H., Switzer, E., Meyer-Lindenberg, A., Wirth, C., & Windhagen, H. (2005). In vivo corrosion of four magnesium alloys and the associated bone response. *Biomaterials*, 26(17), 3557–3563.
- Wolters, L., Angrisani, N., Seitz, J., Helmecke, P., Weizbauer, A., & Reifenrath, J. (2013). Applicability of degradable magnesium LAE442 alloy plate-screw-Systems in a Rabbit Model. *Biomedizinische Technik. Biomedical Engineering*, 58(Suppl 1).
- Xu, Y., Meng, H., Yin, H., Sun, Z., Peng, J., Xu, X., Guo, Q., Xu, W., Yu, X., & Yuan, Z. (2018). Quantifying the degradation of degradable implants and bone formation in the femoral condyle using micro-CT 3D reconstruction. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 15(1), 93–102.
- Yoshikawa, H., & Myoui, A. (2005). Bone tissue engineering with porous hydroxyapatite ceramics. *Journal of Artificial Organs*, 8(3), 131–136.
- Younger, E. M., & Chapman, M. W. (1989). Morbidity at bone graft donor sites. *Journal of Orthopaedic Trauma*, 3(3), 192–195.
- Zreiqat, H., Howlett, C., Zannettino, A., Evans, P., Schulze-Tanzil, G., Knabe, C., & Shakibaei, M. (2002). Mechanisms of magnesium-stimulated adhesion of osteoblastic cells to commonly used orthopaedic implants. *Journal of Biomedical Materials Research*, 62(2), 175–184.

How to cite this article: Augustin J, Feichtner F, Waselau A-C, et al. Comparison of two pore sizes of LAE442 scaffolds and their effect on degradation and osseointegration behavior in the rabbit model. *J Biomed Mater Res*. 2020;1–13. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.34607>

2. Publikation Nr. 2

Angenommen: 19.01.2022

Journal of Applied Biomaterials & Functional Materials

Augustin, J., Feichtner, F., Waselau, A.-C., Julmi, S., Klose, C., Wriggers, P., Maier, H. J., & Meyer-Lindenberg, A. (2022). Effect of pore size on tissue ingrowth and osteoconductivity in biodegradable Mg alloy scaffolds. *Journal of Applied Biomaterials & Functional Materials*.

DOI: 10.1177/22808000221078168

Effect of pore size on tissue ingrowth and osteoconductivity in biodegradable Mg alloy scaffolds

Julia Augustin¹ , Franziska Feichtner¹, Anja-Christina Waselau¹, Stefan Julmi², Christian Klose², Peter Wriggers³, Hans Jürgen Maier² and Andrea Meyer-Lindenberg¹

Journal of Applied Biomaterials & Functional Materials
1–18
© The Author(s) 2022
Article reuse guidelines:
sagepub.com/journals-permissions
DOI: 10.1177/2280800221078168
journals.sagepub.com/home/jbf


Abstract

Magnesium has mechanical properties similar to those of bone and is being considered as a potential bone substitute. In the present study, two different pore sized scaffolds of the Mg alloy LAE442, coated with magnesium fluoride, were compared. The scaffolds had interconnecting pores of either 400 (p400) or 500 µm (p500). β-TCP served as control. Ten scaffolds per time group (6, 12, 24, 36 weeks) were implanted in the trochanter major of rabbits. Histological analyses, µCT scans, and SEM/EDX were performed. The scaffolds showed slow volume decreases (week 36 p400: 9.9%; p500: 7.5%), which were accompanied by uncritical gas releases. In contrast, β-TCP showed accelerated resorption (78.5%) and significantly more new bone inside ($18.19 \pm 1.47 \text{ mm}^3$). Bone fragments grew into p400 ($0.17 \pm 0.19 \text{ mm}^3$) and p500 ($0.36 \pm 0.26 \text{ mm}^3$), reaching the centrally located pores within p500 more frequently. In particular, p400 displayed a more uneven and progressively larger surface area (week 36 p400: 253.22 ± 19.44 ; p500: $219.19 \pm 4.76 \text{ mm}^2$). A better osseointegration of p500 was indicated by significantly more trabecular contacts and a 200 µm wide bone matrix being in the process of mineralization and in permanent contact with the scaffold. The number of macrophages and foreign body giant cells were at an acceptable level concerning resorbable biomaterials. In terms of ingrown bone and integrative properties, LAE442 scaffolds could not achieve the results of β-TCP. In this long-term study, p500 appears to be a biocompatible and more osteoconductive pore size for the Mg alloy LAE442.

Keywords

Pore size, osseointegration, bone ingrowth, osteoconductivity, LAE442

Date received: 21 December 2021; revised: 14 January 2022; accepted: 19 January 2022

Introduction

The use of autologous bone in larger bone defects is limited by availability, surgical effort, and additional risks at the donor site.¹ As an alternative, the development of bone substitute materials over the last two decades has been increasingly focused on alloys with a high magnesium (Mg) content.^{2–16} In some cases, however, animal studies showed that the initially promising Mg alloys showed too rapid degradation behavior in vivo,^{8,11,16} or they were classified as insufficiently biocompatible.^{8,10,12} The Mg alloy LAE442 has shown the most promising results after intraosseous implantation in several animal models (guinea pig,^{2,17} rabbit,^{3,4,18,19} and sheep²⁰). Corrosion retardation, stable mechanical properties, and an

acceptable immune response of the host tissue to the foreign material have been observed for this alloy in recent years.^{2–4,18–20}

¹Clinic for Small Animal Surgery and Reproduction, Ludwig-Maximilians-Universität, Munich, Germany

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

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

Corresponding author:

Andrea Meyer-Lindenberg, Clinic for Small Animal Surgery and Reproduction, Ludwig-Maximilians-Universität, Veterinärstraße 13, Munich 80539, Germany.
Email: ameylin@lmu.de



Creative Commons CC BY: This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 License (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>) which permits any use, reproduction and distribution of the work without further permission provided the original work is attributed as specified on the SAGE and Open Access pages (<https://us.sagepub.com/en-us/nam/open-access-at-sage>).

The material structure, surface finish and surface treatments,^{21,22} stability and surgical technique,^{11,23,24} as well as the health status of the patients²⁵⁻²⁷ are considered as multiple factors that can influence bone remodeling and biocompatibility of the implant.²⁴ Functionality also depends on early revascularisation of the defect to provide osteogenic precursor cells, nutrients, and locally acting growth factors for further differentiation of new bone.^{28,29} Slowly biodegradable Mg alloys have the great advantage of providing long-term stability within the defect site, while allowing ingrowth of new bone at the same time as degradation occurs.^{22,29} This desired effect was described by Plemister³⁰ at the beginning of the last century as “creeping substitution.” Porous scaffolds made of ceramics, composites, and titanium encourage the ingrowth of granulation tissue as well as bone tissue,^{28,31-36} and thus promote the osteoconductive properties of the bone substitute material.²⁹ Initial studies on porous implants have shown that pore sizes of 100 µm are the minimum size required for the transport of cells and nutrients into the interior of porous scaffolds.³⁷ Pore sizes above 300 µm are considered to be particularly beneficial for blood vessel supply and osteogenesis.^{28,29,33} Porous Mg implants have also been used in vivo. Osteogenesis is observed in Mg implants with pore sizes between 100 µm and over 400 µm, which are used as pure Mg or as main element of an alloy.^{6,7,14,15} Studies by Lalk et al.⁷ and Cheng et al.¹⁴ showed that Mg scaffolds are well suited as a matrix for bone-scaffold contacts and cell adaptation, and therefore anchoring of the bone substitute material into the adjacent bone. The interaction between scaffold and bone is a requirement for the successful osseointegration of the Mg scaffold during its degradation in the bone tissue.^{24,38} So far only solid LAE442 implants have been investigated^{2-4,11,18-20,39} and have achieved promising results with regard to peri-implant bone formation.^{2,3,5,11,18-20} LAE442 was used the first time in the form of open-pored scaffolds, with two firmly defined and always homogeneously reproducible pore size models in the study by Augustin et al.⁴⁰ Associated investigations on the clinical tolerability as well as µCT measurements of the outer scaffold and bone environment provided promising results. Using high-resolution ex vivo µCT80 scan images, SEM/EDX images, and histological tissue samples, the objective of the present study was to investigate which pore size model is more suitable as an osteoconductive and therefore potentially more suitable bone substitute for osteoneogenesis. Degradation behavior, interaction with surrounding bone structure and cellular tissue reactions over a period of up to 36 weeks were investigated and compared between both LAE442 pore size models.

Materials and methods

Production and characteristics of the scaffolds

The Mg alloy LAE442 (90 wt.% Mg, 4 wt.% Li, 4 wt.% Al, 2 wt.% rare earth) was prepared using the alloy LAE442

according to the method proposed by Seitz et al.⁴¹ In advance of the actual manufacturing process of the investment casting, the casting molds for the scaffolds were made with a 3D printer (SolidScape, Inc., Merrimack, USA) in individual superimposed wax layers.⁴²

Two versions of the LAE442 scaffolds (Ø 4 mm, height 5 mm) were produced ($n=40$ each). These had homogeneously distributed, interconnecting pores, marked out by intermediate struts. The first model (p400) had an average pore size of 400 µm, a strut thickness of 0.3–0.4 mm and a porosity of 43.4%. The second model (p500) had an average pore size of 500 µm a strut thickness of 0.4–0.5 mm and a porosity of 41.4% (Figure 1(a) and (b)). The LAE442 scaffolds were additionally coated with magnesium fluoride (MgF₂).^{39,43} The control group implants were commercially available resorbable beta-tricalcium phosphate (β-TCP) implants (Cerasorb M, Curasan AG, Kleinostheim, Germany), with the same dimensions (Ø 4 mm, height 5 mm) with a porosity of 65% (pore sizes ≤500 µm) (Figure 1(c)). All Mg scaffolds were sterilized by gamma irradiation of >29 Gy (BBF-Sterilisationsservice GmbH, Kernlen, Germany).

Animal model

The animal experiments were approved by the regional government of Upper Bavaria in accordance with § 8 of the Animal Welfare Act (reference number ROB 55.2-1-54-2532-181-2015). Sixty adult, female Zika rabbits (Assamhof, Kissing, Germany) with an average weight of 3.9 kg (± 0.3 kg) were randomly divided into scaffold and time groups (6, 12, 24, or 36 weeks). According to Lalk et al.,⁶ two scaffolds (one per left and right hind limb) were implanted in the cancellous part of the greater trochanter of the femur. For each scaffold group (p400, p500, and β-TCP) a total of 40 scaffolds were used ($n=10$ per time group). The animals were kept according to the European Directive on the housing of experimental animals (Appendix A, ETS 123). In addition to the rationed commercial pellet feed (Kanin Kombi, Rieder Assamhof GmbH & Co. KG, Kissing, Germany), the animals had access to hay and water ad libitum.

Operation

Anesthesia was induced by intramuscular administration of 0.15 mg/kg ketamine (Anesketin® 100 mg/ml, Albrecht GmbH, Aulendorf, Germany) and 0.25 mg/kg medetomidine (Dorbene vet® 1 mg/ml, Zoetis Deutschland GmbH, Berlin, Germany). A venous catheter was placed into the auricular vein and the animals were intubated. After routine preparation of an aseptic surgical field, anesthesia was maintained with an isoflurane/oxygen mixture (1.5–2 vol.-% with simultaneous oxygen supply of 1 l/min). In addition, the animals were given a fentanyl infusion 10 µg/kg/h µg/ml (Fentadon®, 50 µg/ml, CP-Pharma Handlungsgesellschaft mbH, Burgdorf, Germany) during surgery

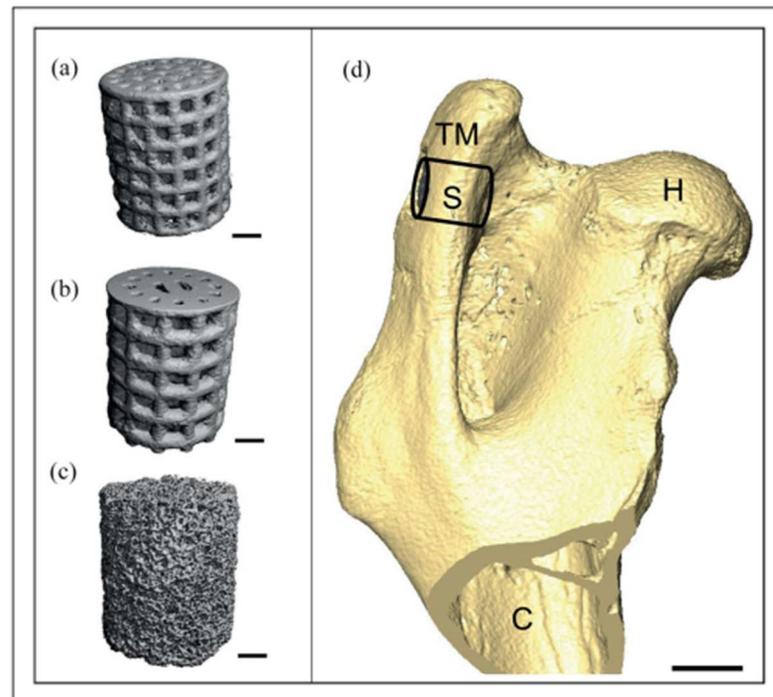


Figure 1. Models of open-pored scaffolds: (a) LAE442 p400, (b) LAE442 p500, (c) β -TCP (control); scale bar: 1 mm, and (d) medial view of the implantation site; S: scaffold; H: femur head; C: medullary cavity; TM: Trochanter major, scale bar: 5 mm.

to ensure analgesia. Surgical access was performed as described by Lalk et al.⁶ through a 2 cm long skin incision, preparation of the underlying fat tissue and the musculature up to the greater trochanter of the femur with a raspator. A 6 mm deep hole was drilled into the greater trochanter (Colibri II, Synthes GmbH, Oberdorf, Switzerland; drill head: \varnothing 4 mm) and the implant was inserted (Figure 1(d)). The wound was sutured in layers with absorbable sutures (Monosyn[®] 4/0, B. Braun Surgical S.A., Rubi, Spain) and the skin was closed by single stitches (Optilene[®] 4/0, B. Braun Surgical S.A., Rubi, Spain). The animals received a single intravenous administration of 20 μ g/kg buprenorphine (Bupresol[®], 0.3 mg/ml, CP-Pharma Handelsgesellschaft mbH, Burgdorf, Germany) for postoperative analgesia. From the time of surgery up to the fifth post-operative day, oral administration of 10 mg/kg/day enrofloxacin (Enrobactin[®], 25 mg/ml, CP-Pharma Handelsgesellschaft mbH, Burgdorf, Germany) and 0.3 mg/kg/day meloxicam (Rheumocam[®], 1.5 mg/ml, Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co. KG, Ingelheim am Rhein, Germany) was given. The general condition of the animals, as well as wounds and lameness, were monitored daily.

Euthanasia

At the end of the respective observation periods, the animals were euthanized with 5 mg/kg propofol (Narcofol[®], 10 mg/ml, CP-Pharma Handelsgesellschaft mbH, Burgdorf, Germany) and 1 ml/kg pentobarbital (Narkodorm[®], 182.3 mg/ml, CP-Pharma Handelsgesellschaft mbH, Burgdorf, Germany). Equally sized blocks (1.5 cm \times 1.5 cm) of the bone containing the scaffold were cut with a diamond band saw (Walter Messner GmbH, Osteinbek, Germany). These were fixed with 4% formalin solution (Carl Roth GmbH u. Co.KG, Karlsruhe, Germany) for further ex vivo examinations.

Ex vivo μ CT80

With the exception of β -TCP, scans of the LAE442 scaffolds were taken prior to implantation and scans of all scaffold groups were taken after the in vivo observation period (6, 12, 24, 36). Each bone-scaffold compound was scanned using μ CT80 tomography (Scanco Medical AG, Brüttisellen, Switzerland), with a resolution of 10 μ m, a tube current of 114 μ A, a tube voltage of 70 kVp and an integration time of 600 ms. The tomograms showed the

Table 1. Scoring system employed for μ CT80. Parameters were evaluated over the entire cross-sectional area of each scaffold per investigation time. Score 0 stands for the desired score, or rather the score where no change has been detected.

| Scoring Parameter | Score 0 | 1 | 2 | 3 | 4 |
|---|--|---|---|--------------------------------|-----------------------------------|
| Scaffold degradation* | None | Small degradation layer | Clearly visible degradation layer | >50% Degradation area scaffold | Completely degraded |
| Scaffold shape* | Original | Mild changes in surface topography | Moderate altered shape | >50% Clearly altered surface | Loss of shape |
| Gas -Within scaffold -Adjacent | None | Sporadically/few | Moderate | Many >50% of the pore voids | Pores are totally filled with gas |
| Drill hole closure | Closed | Small gap | 50% Closed | Large gap | Open |
| Osseointegration (bone-scaffold contacts) | Large amounts of bone-scaffold contacts, no/few gaps | Moderate contacts with several trabeculae | Few trabecular contacts, several gaps between | One direct contact | None |

*Parameters were only evaluated for LAE442 p400 and p500.

scaffolds in longitudinal axis. Using the μ CT evaluation program (V 6.4-2, Scanco Medical AG, Zurich, Switzerland), the scaffolds were reoriented into standardized cross-sectional views and further analyzed.

Evaluation of structural scaffold characteristics and scaffold integration

The structural parameters degradation, shape, and gas formation (in the scaffold/in the immediate vicinity) were investigated with a semi-quantitative 2D analysis of the cross sections. A modified scoring system based on Lalk et al.⁶ was used for each scan. The scores ranged from 0 for “unchanged or physiological” up to 4 for “significantly changed characteristics.” In addition, remaining drill hole diameters were measured (cf. Table 1). For β -TCP, the semi-quantitative parameters degradation and scaffold shape were evaluated descriptively, due to a more irregular pore distribution compared to LAE442 p400 and p500 and different material origin. The parameters drill hole and gas in β -TCP could be evaluated analogous to LAE442.

The osseointegration of LAE442 p400, p500, and β -TCP was evaluated by the existence of bone-scaffold contacts (Figure 2) and new bone in the scaffold (central part – CP/ outer part – OP) (Figure 2(a) and (b)). For the scaffold structure evaluation, six successive cross-sectional layers (Figures 2 and 3(a): LAE442, alternating strut-/pore-layers; β -TCP layers in corresponding distances) were considered and evaluated semi-quantitatively according to Table 1. In addition, the bone structure in the vicinity of all scaffold groups was examined descriptively.

Degradation and bone ingrowth

Quantitative 3D measurements were performed using two cylindrical shapes in combination with the specific thresholds of the scaffolds (β -TCP: 360, LAE442: 160, bone: 186), as described by Lalk et al.⁷ The first shape (“Bone-in”)

corresponded exactly to the outer cross-sectional contour of the scaffolds and included the bone which has grown into the scaffold pores (Figure 2(c) and (d)). Starting from the cylindrical shape “Bone-in,” a second shape (“Bone-ex”) was created, which always excluded the bone and thus only represented the LAE442 scaffold material (Figure 2(e) and (f)). For the quantitative 3D evaluation of the LAE442 scaffolds volume (mm^3) and surface area (mm^2) were determined for the respective time periods based on the “Bone-ex” cylinder. The parameter ingrown bone (mm^3) within the p400 and p500 pores of LAE442 represented the difference between the values determined for both cylindrical shapes (Ingrown bone = “Bone-in” – “Bone-ex”). For β -TCP, the values volume and surface area were determined using the specific threshold. The ingrown bone within β -TCP could be calculated by the bone threshold value, which clearly differed from β -TCP.

Electron microscopy

One histological cross-section per pore size and time group of the LAE442 scaffolds was selected for analysis in the scanning electron microscope (SEM) to determine possible changes in the base material (non-corroded Mg alloy) and the degradation layer on the scaffold struts over time. Energy dispersive X-ray spectroscopy (EDX) was used to investigate elemental distributions of the base material, degradation layer, and precipitates on the degradation layer. The composition of bone and osteoid-like tissue (OLT) was determined inside and outside the porous LAE442 scaffolds for comparison. Since the EDX analyses required unstained samples, it was very difficult to reliably measure OLT that might be present within a sample without first being able to distinguish it by color or by a sufficient degree of mineralization and thus localize it. The measurement was successfully carried out once on a p500 sample, as here the seam of the OLT was thick enough to reliably identify the corresponding area. The analyses

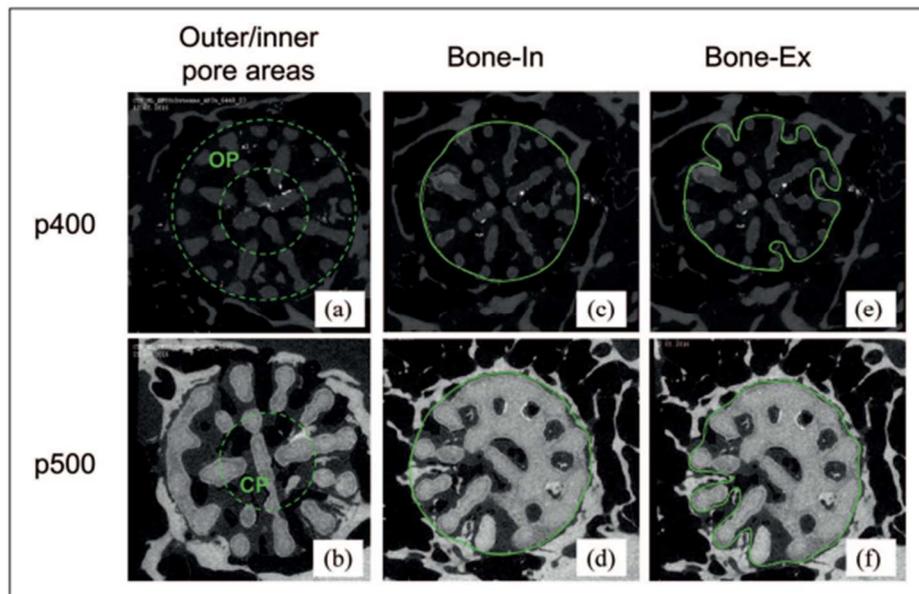


Figure 2. Outer pore area (= OP) and central/inner pore area (= CP) of the scaffolds (a and b); contours (c and d) representing "Bone-in" and (e and f) "Bone-Ex."

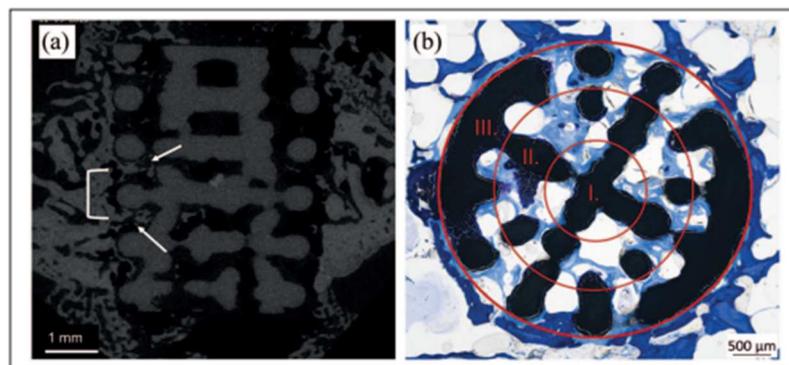


Figure 3. (a) Longitudinal view of a LAE442 scaffold with pores and struts; white arrows: ingrowth of new bone; white bracket: pore-layers with an intermediate strut layer and (b) histological cross-section, regions I.–III. (scaffold center, middle part, and outer part).

were performed with the SUPRA 55 VP (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Germany), a voltage of 15 kV and a working distance of 20–25 mm (overview) respectively 7.8–9.8 mm (close-up).

Histological examinations

The scaffold containing bone samples were fixed in 4% formalin and dehydrated in an ascending alcohol series. After incubation with xylene, the samples were embedded

in Technovit® 9100 (Heraeus Kulzer GmbH, Wehrheim, Germany), according to the manufacturer's instructions. The polymerized blocks were mounted on plastic slides with precision adhesive (Technovit® 7210 VLC, Heraeus Kulzer GmbH, Wehrheim, Germany). Histological thick sections (40 µm) of the scaffold samples were prepared by the cutting and grinding technique according to Donath and Breuner⁴⁴ with a diamond band saw and grinding machine (cut grinder and lap grinder, Walter Messner, Oststeinbek, Germany). The central cross-sections were

Table 2. Scoring system employed for semiquantitative histological evaluation. Parameters were evaluated using one cross-section per scaffold (* was only rated for LAE442 p400 and p500).

| Scoring parameter | Score 0 | 1 | 2 | 3 |
|--|------------|----------------------------|---------------------|----------------|
| Material changes (Granulation/Cracks)* | None 0% | Locally 1%–25% | Many 26%–50% | Severe >50% |
| New Bone (NB) | None 0% | Sporadically/few 1%–10% | Moderate 11%–25% | Many >25% |
| Osteoid-like tissue (OLT)* | None 0% | Sporadically/few 1%–10% | Moderate 11%–25% | Many >25% |
| Fibrous tissue | None 0% | Sporadically/few 1%–10% | Moderate 11%–25% | Many >25% |
| Vascularization | None | Sporadically/few | Moderate | Many |
| Foreign body reaction (Macrophages/Foreign body giant cells) | None | Sporadically/few | Moderate | Many |
| Inflammation (Lymphocytes and Granulocytes) | None | Sporadically/few | Moderate | Many |
| Formation of a fibrous capsule | No | Yes | | |

stained with toluidine blue (0.1% toluidine blue O, Waldeck, Münster, Germany).

The cross sections were used for a standardized, semi-quantitative analysis in three areas (Figure 3(b)): scaffold center (I), middle part (II), and outer part of the scaffold (III). In these areas scaffold material, new bone tissue (NB) as well as osteoid-like tissue (OLT), fibrous tissue, vascularization, and possible capsule formation were examined according to Table 2. Furthermore, cellular reactions due to the occurrence of inflammatory cells were evaluated. Macrophages and foreign body giant cells (FBGC) were evaluated at 200-/100-fold magnification (Axio Imager Z.2, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Germany).

Statistics

The statistical analysis was performed using Microsoft Office Excel® Version 2016 (Microsoft Office Professional Plus 2016, Microsoft Corporation, Redmond, USA) and SPSS® Version 25.0 (SPSS, IBM Company, Chicago, USA). The data were displayed as mean values \pm standard deviations within each scaffold and time group. The independent, non-normally distributed data were tested for statistical significance using the Kruskal-Wallis test followed by Bonferroni post hoc correction. For parameters that could only be compared between the two pore sizes of LAE442, due to the different degradation behavior of Mg compared to the β -TCP ceramic, the Mann-Whitney *U*-test was applied (Table 1: scaffold degradation, shape). Statistically significant differences were defined as $p < 0.05$.

Results

Analyses in the ex vivo μ CT80

Evaluation of structural scaffold characteristics. At week 6, degradation was visible in the cross-sectional views of the LAE442 scaffolds with a darker seam at the outer edge of

the scaffolds compared to the μ CT80 scans taken before implantation. This seam increased over time toward the inside of the scaffold and was partially visible from week 12 onward at the inner strut elements of the scaffolds of both pore sizes (Figure 4(a)).

After assessing the scaffold shape, it was noticeable for p400 that in week 6 isolated pitting corrosion occurred on the struts, which increased in the further time groups week 24 (5/10) and 36 (3/10). In addition, individual pieces of material in the upper and lower scaffold third were detached in week 36 (4/10), which lead to a partial loss in implant shape. In comparison, p500 maintained its overall cylindrical shape up to week 36, despite minor surface irregularities (8/10) and cracks (2/10) (Figure 4(b)). However, the β -TCP scaffolds completely lost their cylindrical shape from week 12 to week 24. At week 24 and 36, only a few β -TCP particles were visible as small bright white spots within bone trabeculae.

For both LAE442 pore sizes, gas could be detected inside and outside the scaffold at all times. The amount of gas inside p500 decreased continuously over the course of the study period until only tiny bubbles were found between the scaffold structure at week 24 and 36. The amount of gas in p400 was significantly increased compared to p500, especially in week 24 ($p = 0.023$) and did not decrease until week 36. In the scaffold surroundings, gas was distributed between the trabecular meshwork of the bone without significant difference between the pore size groups. As expected, gas formation never occurred with β -TCP (Figure 4(c) and (d)).

The drill holes were closed in 8/10 cases in the 6-week group of p500, and in 9/10 cases in β -TCP. In the group with the smaller pore size p400, 6/10 drill holes were completely closed in the 6- and 12-week group and 7/10 after 36 weeks. Apart from individual cases in week 6 (1/10), week 12 (3/10), and week 24 (1/10), the majority of drill holes were completely closed at all times in the β -TCP group (Figure 4(e)).

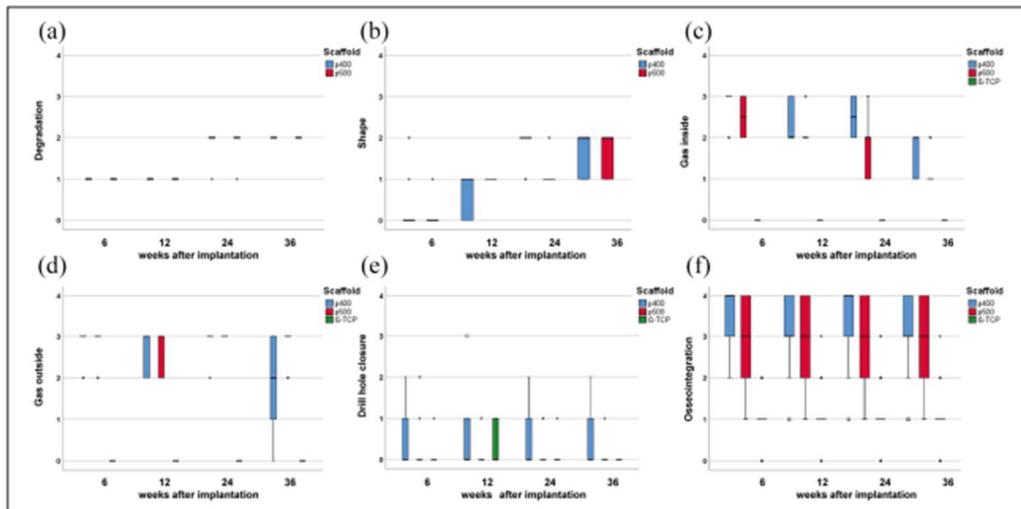


Figure 4. Box plots of: (a) scaffold degradation, (b) scaffold shape, (c) gas inside, (d) gas outside, (e) drill hole closure, and (f) scaffold osseointegration (μ CT80 scans). Score 0: unchanged/good osseointegration behavior, score 4: significant changes/poor osseointegration behavior.

Evaluation of the scaffold integration. Although bone was already present in the adjacent area of LAE442 p400 at week 6, only single, thin trabeculae ($<150\ \mu\text{m}$) approached the scaffolds directly. In comparison, LAE442 p500 always had significantly more bone contact sites from week 6 onward ($p \leq 0.003$). From week 12, both LAE442 pore sizes showed partially ingrown trabeculae, which were often arranged in a semi-circle around the scaffold cross sections at a small distance and sporadically touched the implant surface (Figure 2). However, for β -TCP significantly more trabeculae were in contact with the scaffold surface ($p < 0.001$). The trabeculae grew gradually in β -TCP and became thicker or crosslinked over time (Figure 4(f)).

When evaluating the distribution pattern of new bone within the LAE442 scaffolds, all sectional scan images showed that there was always more bone in the outer pore area than in the inner area, regardless of a denser strut layer or a more open pored layer (Figure 2). Overall, p500 had more bone in both areas than p400 ($p \leq 0.008$). Macroscopically, the surrounding bone structure differed significantly between β -TCP and the two LAE442 scaffolds. Overall, widely meshed cancellous bone was found around β -TCP after 6 weeks. In the vicinity of LAE442 p400 and p500, a dense trabecular meshwork with thicker and thinner trabeculae was found from week 6 onward, which was interspersed with gaps.

Analysis of scaffold degradation and bone ingrowth. The 3D evaluation of the data sets regarding density and volume of p400 and p500 showed uniform degradation behavior of

the porous Mg alloy during their respective observation periods. Compared to the values before implantation, a slowly progressive volume loss continued in both LAE442 pore sizes (residual volume week 36: p400: $90.1 \pm \text{SD } 3.1\%$ and p500: $92.5 \pm \text{SD } 2.0\%$). The residual volume of β -TCP was $21.5 \pm \text{SD } 1.4\%$ in week 36 compared to the chosen reference value in week 6. In both LAE442 pore sizes, degradation was accompanied by a slight increase in surface area until week 36 (p400) and week 24 (p500), respectively. β -TCP decreased its surface area significantly over the determined time period. Higher amounts of newly ingrown bone could be detected for p500 in direct comparison between both LAE442 pore sizes but did not lead to significant differences. The markedly higher bone values of β -TCP, which did not change after week 12, were significantly different from those of p400 and p500 at all times ($p < 0.001$) (Table 3).

SEM/EDX: Surface characteristics and element distribution. The LAE442 cross-sections selected for the SEM images showed a narrow and dark degradation layer on the outer scaffold edges for both pore sizes at week 6. Compared to the non-corroded material in more central areas, the Mg content in the degradation layer was slightly reduced based on EDX examinations (Figure 5). In contrast, the aluminum (Al) content in the degradation layer was always slightly higher than in the centrally located non-corroded material. Rare earths (SE) were always detected in both areas (degradation layer/non-corroded material) of the Mg alloy as bright evenly distributed spots (Figure 5(a), (b), and (d)). Fluorine (F) was detected once

Table 3. μ CT80 measurements of scaffold volume, surface, and bone ingrowth of the different pore sizes and β -TCP over an investigation period up to 36 weeks after implantation.

| Scaffold model | Measured value (μ CT80) | 6 weeks | 12 weeks | 24 weeks | 36 weeks |
|------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| Mean values \pm SD/Max/Min | | | | | |
| LAE442 | Volume (mm ³) | 33.32 \pm 1.32/33.68/31.62 | 34.61 \pm 1.57/37.14/31.68 | 32.19 \pm 2.69/38.86/31.52 | 30.24 \pm 3.09/37.61/30.95 |
| p400 | Surface (mm ²) | 245.5 \pm 11.63/257.9/229.43 | 247.76 \pm 6.52/257.11/239.2 | 250.47 \pm 19.27/277.87/224.98 | 253.22 \pm 19.44/275.84/217.11 |
| | Bone ingrowth (mm ³) | 0.43 \pm 0.22/0.75/0.23 | 0.22 \pm 0.35/1.1/0.02 | 0.13 \pm 0.11/0.31/0.00 | 0.17 \pm 0.19/0.60/0.03 |
| LAE442 | Volume (mm ³) | 35.19 \pm 2.03/38.83/33.32 | 34.71 \pm 2.12/37.81/33.04 | 34.61 \pm 1.26/38.76/34.68 | 33.87 \pm 2.00/40.17/34.76 |
| p500 | Surface (mm ²) | 182.12 \pm 34.62/223.35/135.36 | 217.42 \pm 7.59/229.87/203.58 | 226.22 \pm 11.68/243.63/208.22 | 219.19 \pm 4.76/228.22/211.29 |
| | Bone ingrowth (mm ³) | 0.55 \pm 0.45/1.34/0.02 | 0.18 \pm 0.16/0.48/0.05 | 0.16 \pm 0.07/0.25/0.08 | 0.36 \pm 0.26/0.73/0.13 |
| β -TCP | Volume (mm ³) | 11.81 \pm 1.95/16.29/9.94 | 6.82 \pm 1.69/9.79/4.55 | 3.89 \pm 1.31/6.07/1.72 | 2.54 \pm 1.44/5.84/1.40 |
| | Surface (mm ²) | 666.2 \pm 66.31/810.94/603.61 | 396.38 \pm 96.57/542.77/260.91 | 216.12 \pm 54.63/301.98/174.83 | 140.72 \pm 59.18/280.68/102.62 |
| | Bone ingrowth (mm ³) | 24.29 \pm 2.44/27.46/20.55 | 18.66 \pm 2.44/22.28/14.48 | 19.09 \pm 3.65/24.83/14.84 | 18.19 \pm 1.47/20.17/15.92 |

at p400 in the outer edges of the degradation layer at week 6. Calcium (Ca) and phosphorus (P) were found in the degradation layer as well as in the form of white precipitates, which were directly adjacent to the degradation layer. The precipitates seemed to represent a contact between implant and mature bone at the bone-scaffold interface (Figure 5(c), (e), and (f)). The individual quantity of elements at the tested locations of the sample (according to Figure 5) are shown in Table 4. An element comparison between new bone tissue inside the LAE442 scaffolds and mature bone outside showed similar element contents of Mg, Al, Ca, P, and F. Another individual comparison in one of the p500 samples between OLT inside the scaffold and mature bone outside revealed lower Ca (1/3 of mature bone) and P (1/4 of mature bone) contents in the OLT (Figure 6). From week 12 onward, cracking occurred in the outer areas of the struts. The scaffold surface appeared more irregular in p400 than in p500 in the investigated samples.

Histology. While LAE442 scaffolds of both pore sizes macroscopically completely maintained their shape until week 36, β -TCP showed a significant loss of shape from week 12 onward ($p \leq 0.004$). For p400 and p500, granulation of the scaffold edges occurred already from week 6 onward (Figure 7(a)–(h)). The scaffold granulation was visible by a change in the color of the initially deep black Mg alloy to increasingly gray-blue granulated areas in the degradation layer. Although p400 showed increased cracking on the scaffold struts until week 24 (Figure 8), this difference was only significant in week 12 compared to p500 ($p = 0.035$). New bone (NB) of dark blue color was visible in individual areas in week 6 in both LAE442 pore sizes. However, no significant differences between the pore size groups were observed. β -TCP showed significantly more NB from week 12 onward compared to the two LAE442 pore sizes ($p \leq 0.002$). The trabecular structure of the NB of β -TCP was cross-linked, while NB in p400 and p500 consisted of rather individually distributed regions within the implants (Figure 7(c)–(f)). It was apparent for both LAE442 pore sizes, that NB mostly had no direct contact with the Mg alloy inside the pores and was located in the middle of a light blue osteoid-like tissue (OLT). This tissue appeared to be less mineralized than mature bone due to its light blue coloration (Figures 7(a)–(h) and 8(a), (c), and (d)). The OLT inside the scaffold became increasingly present from week 12 onward and showed rows of overlying osteoblasts (Figure 8(a)) and osteocytes distributed in its matrix (Figure 8(a), (c), and (d)). From week 12 onward, p500 tended to have more OLT within its pores than p400, which was significant at week 24 ($p = 0.019$). OLT increased in both pore sizes over time. In β -TCP, OLT was not observed at any time and only NB and osteoid were detected (Figure 7(a) and (b)).

Granulation tissue containing blood vessels and gas vacuoles were visible in the pores of p400 and p500

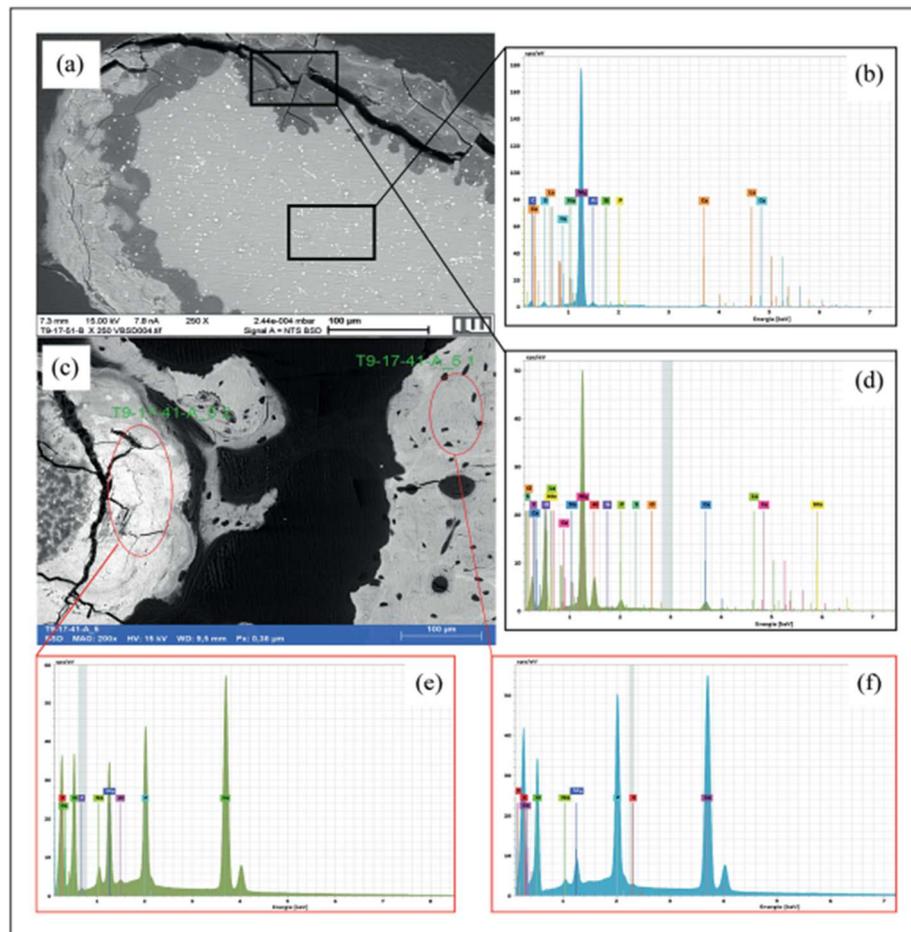


Figure 5. Exemplary SEM images of p500 after 24 weeks (a, b, and d) and SEM image of p400 after 6 weeks (c, e, and f) at the edge of the LAE442 scaffolds with associated EDX measurements. (a): The non-corroded, light gray base alloy differs significantly from the darker degradation layer. The distributed bright spots represent the rare earths as alloying elements. (b and d): EDX mappings in which the Mg content in the degradation layer is reduced and the Ca and P content in the degradation layer is increased. (c): SEM image of p400 with associated EDX measurements of (e) the Ca-P precipitates adjacent to the scaffolds and (f) bone tissue outside the scaffolds.

(Figure 8(a)–(d)). The gas vacuoles were delimited by fine borders of fibrocytes (Figure 8(b) and (c)). Blood vessels were frequently visible in the two outer regions (II and III) of both LAE442 pore sizes (Figure 8(c) and (d)). Blood vessels in the center (I) of p500 were found more frequently compared to p400 at all examination times, even if only small quantities could be detected. P500 showed significantly higher vascular ingrowth across the scaffold cross-section compared to p400 at week 6 ($p=0.005$). Overall, p400 showed a higher amount of fibrocytes inside its scaffold structure than p500 with a significant

difference between both types at week 24 ($p<0.001$). Strands of fibrocytes were distributed between individual struts in p400 in weeks 6 and 12 and were also found in the surrounding area (Figure 8(b)). However, a distinct capsule formation around the LAE442 scaffolds was never observed. In both LAE442 pore sizes, a moderate amount of macrophages and single foreign body giant cells (FBGC) were observed over time. Significantly more macrophages were found in p400 at week 6 compared to p500 ($p=0.005$). At the interface between bone and the Mg alloy, both LAE442 pore sizes showed few FBGC with

incorporated material debris. These cell types were mainly arranged in clusters in the granulation tissue (Figure 8(c) and (d)). Concerning β -TCP, myeloid cells, corresponding to physiological bone marrow, were found within the ceramic from week 6 onward, together with few fibrocytes and small blood vessels. Macrophages were seen sporadically. Figure 9 shows the occurrence of the different tissue and cell types for the individual scaffold groups. In both LAE442 pore sizes, granulation tissue dominated between the gas vacuoles, while bone marrow cells could be found to a much lesser extent than in β -TCP. β -TCP showed significantly fewer fibrocytes compared to p400 ($p < 0.001$, all evaluated times) and p500 ($p = 0.019$, week 6 and 12). Small amounts of granulocytes were visible inside and outside the β -TCP scaffolds. This cell type was hardly present in p400 and p500, with a few exceptions in the peripheral environment.

Table 4. Corresponding EDX data showing elemental distribution (wt.%) at different locations. Locations investigated are shown in Figure 5 by using SEM imaging.

| Element wt.% | | | | |
|--------------|---------------------------------------|-------------------|----------------------|-------|
| | LAE442 p500 (week 24) | | LAE442 p400 (week 6) | |
| | Base material (non-corroded Mg alloy) | Degradation layer | Precipitation | Bone |
| Mg | 91.58 | 72.68 | 13.71 | 3.22 |
| Na | 1.06 | 1.12 | 2.61 | 1.13 |
| Al | 2.89 | 12.91 | 0.34 | – |
| Ca | 1.73 | 6.78 | 60.96 | 67.66 |
| P | 1.04 | 3.80 | 21.93 | 27.68 |
| F | – | – | 0.46 | – |
| S | – | 0.13 | – | 0.32 |
| Cl | – | 0.38 | – | – |
| Si | 0.16 | 0.26 | – | – |
| Mn | – | 0.44 | – | – |
| La | 0.25 | 0.16 | – | – |
| Cer | 1.29 | 1.33 | – | – |

Discussion

In previous *in vivo* studies, the Mg alloy LAE442 in non-porous form has already proven to be a biocompatible, slowly degrading bone graft substitute with the property of maintaining mechanical integrity.^{2,3,5,11,17-20,22} To achieve an ideal balance between degradation and replacement of the implant material with new bone,^{30,38,42} integrated pores in the bone substitute material between 100 and 500 μm are supposed to have a beneficial effect regarding new bone ingrowth.^{29,37} As a structural and osteoconductive component in bone substitutes, pores play an important role for a successful interaction between bone and implant.^{29,31,37,45} The observation of an improved implant integration in bone tissue was confirmed by Lalk et al.,⁷ using MgF_2 coated sponges of the Mg alloy AX30 with an irregular pore distribution *in vivo*. However, the influence of different pores of defined sizes on the degradation behavior and osteogenesis of Mg-based bone substitutes *in vivo* has only been described by Cheng et al.¹⁴ The promising Mg alloy LAE442, which has primarily been investigated as a solid implant without pores,^{2,3,5,11,17-20} has been described as an open-pored structure *in vivo* in studies by Kleer et al.⁴⁶ and Augustin et al.⁴⁰ In the present study, LAE442 was examined and compared for the first time as a scaffold with two different pore size models (p400 and p500) and a uniform geometry using high-resolution *ex vivo* $\mu\text{CT}80$ analysis to draw conclusions on degradation behavior and osseointegration. In addition, biocompatibility and tissue ingrowth into the pores of the Mg alloy were assessed using histological samples and compared with commercially available β -TCP implants with the same outer dimensions. However, it was not possible to manufacture the β -TCP implants with the same geometry as the porous LAE442. β -TCP differs from LAE442 in terms of more diverse and inhomogeneous distributed pores which limits the comparison of both material groups. Despite this fact, the ceramic was chosen as a control because of its well-known good biocompatibility.^{32,35,38,45} Nevertheless, it is important to keep in mind that ceramics do not achieve

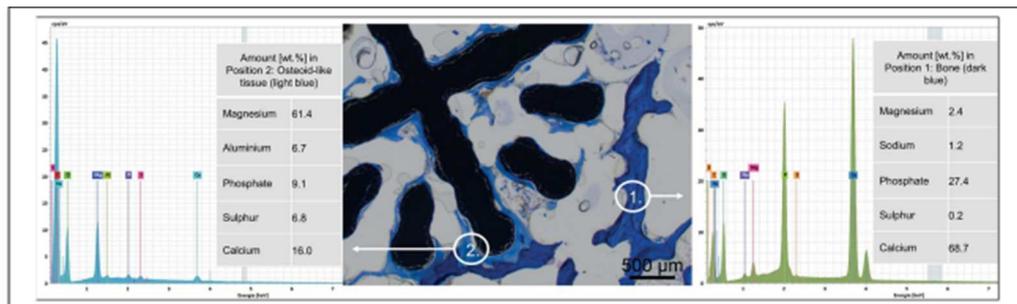


Figure 6. EDX analysis of the composition of bone tissue (circle 1) and osteoid-like tissue (OLT) (circle 2) in proximity to a p500 scaffold after 36 weeks.

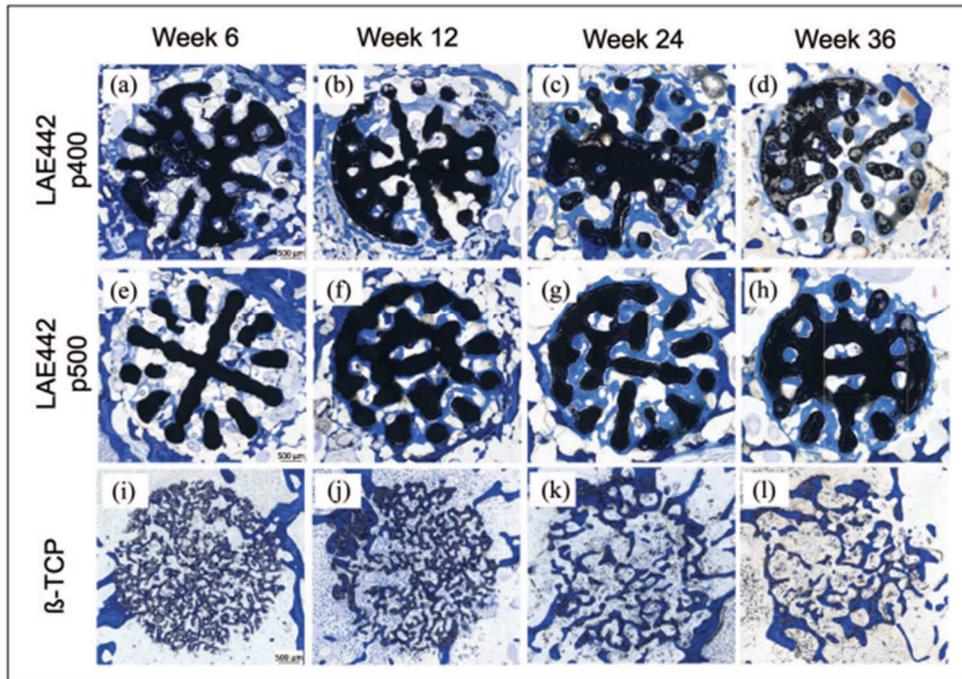


Figure 7. Toluidine blue staining of LAE442 p400, LAE442 p500 and β -TCP cross-sections 6, 12, 24, and 36 weeks: (a–h) LAE442 scaffolds preserved the general shape, an increase in degradation is visible after 24 and 36 weeks; an increase in light blue osteoid-like tissue (OLT) is visible. Bone-scaffold contacts are visible in (a), (c), (e), (f), and (g); (i–l) residues of β -TCP integrated by new bone.

a sufficient mechanical performance in weight-bearing bone defects without supportive fixation devices.³⁸

Using high-resolution μ CT80 after an implantation period of 36 weeks, semi-quantitative observations of a slow and steady degradation were consistent with quantitative volume losses of 7.5% for p500 and almost 10% for p400. Degradation rates concerning LAE442 have been described by others including Angrisani et al.,¹⁹ who determined a slightly lower degradation of 4% in intramedullary LAE442 solid pins in rabbits after 36 weeks. Pitting corrosion, which was mainly visible at the strut edges of p400 over the entire study period, was also described by Witte et al.³⁹ who analyzed MgF_2 coated pins of LAE442 in femoral condyles of rabbits. Pitting corrosion occurs on the implant surface when the corrosion-decelerating MgF_2 layer is selectively degraded and the corrosion of the underlying exposed Mg alloy can progress locally to a greater extent.^{47,48} According to literature,⁴⁹ the interaction of a dissolved coating and an increase in surface area represent local points of attack with chloride-containing body fluid, which can lead to an accelerated corrosion effect.^{50–53} This effect could be transferred to p400, due to more frequently localized occurring pitting corrosion in the surface

topography. Further reasons for the more significant changes in shape and volume losses of p400 compared to p500, could be the rougher and somewhat larger surface area of p400 due to production.⁵⁴ A larger and more uneven surface displays a larger contact area of the implant material to the host tissue, which can result in a more rapid degradation.^{29,55} A similar situation was described by Von der Höh et al.,⁵⁶ who investigated Mg implants with different surface structures in rabbit femora. They concluded that implants with a more uneven surface texture show a faster loss of structure and integrate to a lesser extent into cancellous bone than Mg implants with a smoother surface.

Since the corrosion process of Mg in physiological body fluid produces hydrogen gas,^{50,57} a controllable amount of gas is considered as a key issue to be further improved for the surgical use of Mg as a resorbable bone substitute material.^{22,49,50,58} During the course of the present study, gas in the p400 group diminished later in time compared to p500 and may have led to delayed drill hole closure for p400. This assumption corresponds to the *in vivo* study by Kraus et al.,¹⁶ which investigated implanted Mg pins in the radius of rats for over 24 weeks. The

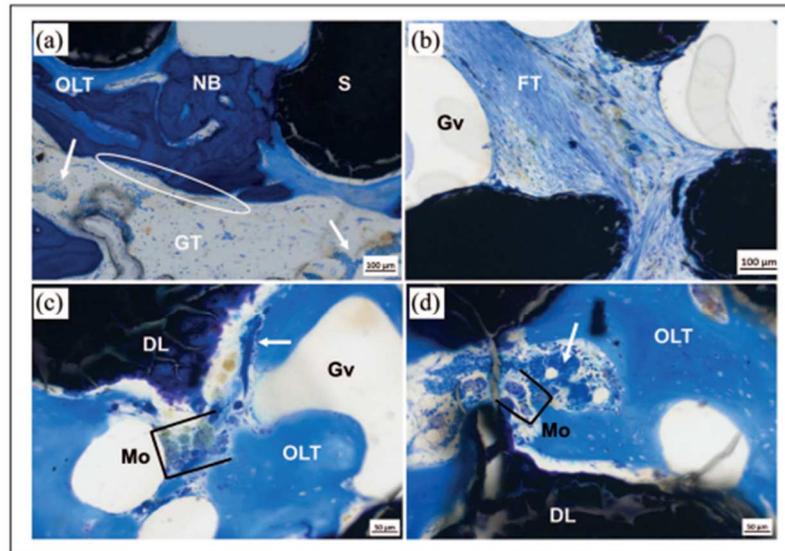


Figure 8. Toluidine blue staining of LAE442 scaffolds (12 and 24weeks): (a) new bone in direct contact to the p500 surface, (b) arrangement of fibrous tissue within p400, (c) group of macrophages, osteoid-like tissue and gas vacuoles in close proximity to the degradation layer of the scaffold within p500, and (d) osteoid-like tissue and blood vessels within p500. Cracks within the alloy become apparent at the edges of the scaffold struts.
DL: degradation layer; FT: fibrous tissue; GT: granulation tissue; Gv: gas vacuoles; Mo: macrophage groups; NB: new bone; OLT: osteoid-like tissue; S: LAE442 scaffold; White arrows: blood vessels; white ellipse: osteoblasts.

implantation site was only closed completely when the gas decreased distinctly. Gas formation was also seen during degradation of LAE442 scaffolds in other *in vivo* studies but did not have a negative effect on clinical tolerability.^{40,46} This was also conformed in studies on solid LAE442 implants in various animal models.^{2,11,19,20,39}

Lu and Leng⁵⁹ observed an indication of good biocompatibility of a bone substitute material when new bone tissue forms in close vicinity to the implant. In the present study, this could be confirmed by various trabecular bone-scaffold contacts partially growing further into the pores. When comparing the pore sizes, a significantly higher number of bone-scaffold contacts were observed for p500 than for p400. According to Brånemark⁶⁰ and Mavrogenis et al.,²⁴ a higher number of bone-scaffold contacts indicates better integration. Trabeculae that have grown on and into p400 and p500 were finely formed. Observations of thin trabeculae being in the periphery of porous LAE442 implants matches with results in former *in vivo* studies on intramedullary LAE442 pins.^{3,11,19} Ca-P precipitates, visible by SEM on the degradation layer and subsequently examined in the EDX, seem to be involved in creating the contact formation between bone and scaffold, as also observed by Witte et al.² and Thomann et al.³ The precipitates, mainly enriched with Ca and P, are considered as a possible mineralization process origin for new bone formation according to Lu and Leng.⁵⁹ In the present study,

both LAE442 pore sizes were found to have more new bone tissue in the outer pore areas than in the central areas, with additional small bone fragments in the central part (CP) of the p500 scaffold. The presence of more bone in outer areas compared to more central areas was also described in AX30 Mg sponges after 24weeks by Lalk et al.⁷ The authors observed externally ingrown trabeculae and island-like bony structures more often in 400 μ m pores than in smaller ones with 100 μ m. A similar situation was also found in the work by Liu et al.¹³ on pure Mg scaffolds after 3 months, in which new bone grew into the scaffolds starting from the outside, and after advanced Mg degradation, also proceeded into the interior of the scaffolds. Furthermore, this kind of bone ingrowth behavior was also observed in ceramics with different pore sizes^{35,61,62} and macro-porous scaffolds made of silk fibroins.^{63,64} In the present study, β -TCP showed a larger number of partly ingrown bone-scaffold contacts in comparison to both LAE442 pore sizes. After 6 weeks, trabeculae already grew into central areas and led to significantly higher bone volume in the quantitative analyses than p400 and p500. Summarized over the entire study period, the bone bonding character of p400 and p500 was rather moderate and could have been more distinct, when compared to β -TCP.

For the semi-quantitative histological evaluation, central histological cross-sections were chosen according to literature.^{7,64} The material loss due to the cutting and

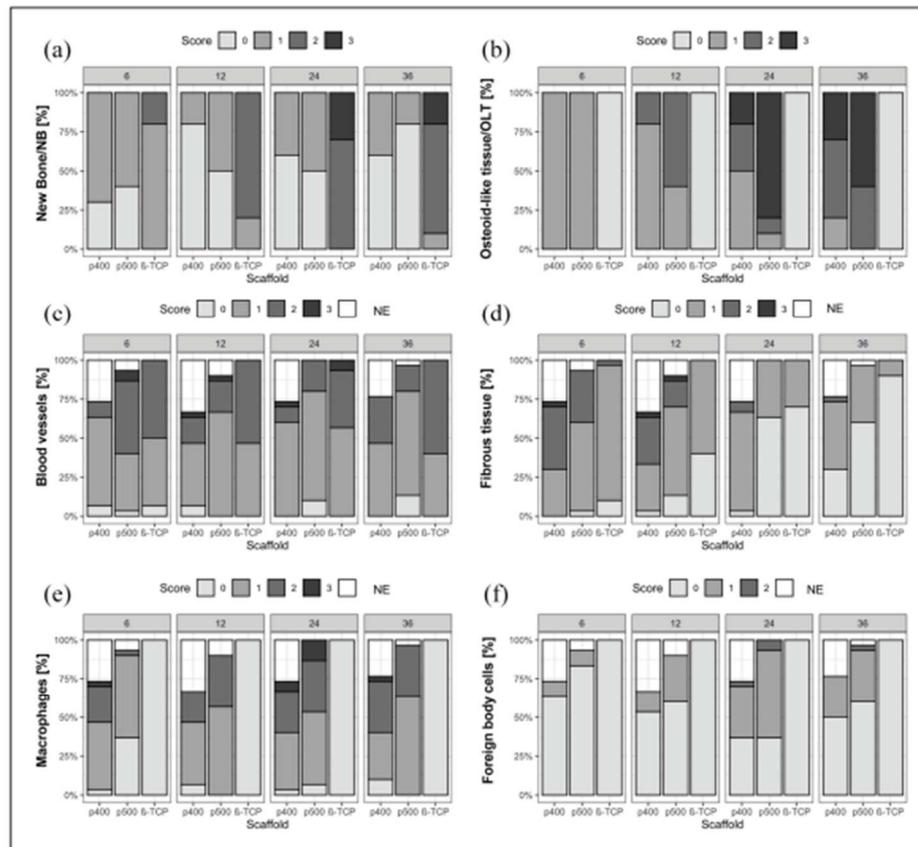


Figure 9. Results of the histological semi-quantitative scoring: (a) new bone/NB, (b) osteoid-like tissue/OLT, (c) blood vessels, (d) fibrous tissue, (e) macrophages, and (f) foreign body cells. The diagrams reflect the percentage distribution of the scores assigned to the mentioned parameters, which were examined on cross-sections of p400, p500, and β -TCP in the respective weeks. Score values ranging from score 0 (none or 0%) to score 3 (many/or >25%) are described in detail in Table 2. NE (not evaluable): Cross-sections that had to be excluded due to technical preparation issues.

grinding technique, in combination with the geometric scaffold architecture, was a challenge. It was not possible to obtain standardized cross-sectional areas in the exact same level with the same fractions of pore or strut layers present in order to undergo precise and convincing histomorphometry.^{65,66} To avoid this bias in the data,⁶⁵ a semi-quantitative analysis was considered as a rather valuable tool for obtaining general trends of scaffold-tissue interaction.⁶³ This limitation is largely compensated by the possibility of a complete, nondestructive 3D calculation of quantitative trabecular bone parameters and scaffold components across the entire region of interest from the μ CT scans.^{17,67}

In the histological sections a cracked, granular degradation layer was seen on the outer struts of the LAE442 scaffolds suggesting material debris. This layer, which was

formed during Mg corrosion, was also described by Angrisani et al.¹⁹ and Dziuba et al.¹² P400 histologically showed a slightly greater tendency concerning surface cracking, significant differences to p500 were absent at most of the investigation time points. These histological observations indicate, analogous to the quantitative volume analyses and morphological changes in μ CT80/SEM, a faster and more irregular degradation of p400 compared to p500. Additionally, it should be mentioned that cracks formed in the implants could also be artifacts that were created during histological processing (cutting, grinding).^{4,68}

Beginning in week 6, newly formed bone (NB) surrounded by osteoid-like tissue (OLT) was observed in the pores of both LAE442. However, compared to β -TCP, significantly less NB was found in p400 and p500, with no significant difference between both LAE442 pore sizes.

The observed difference in the amount of newly ingrown bone between β -TCP and the LAE442 pore sizes may be attributed to the faster bioresorption of β -TCP^{32,38} and the significantly slower degradation behavior of the Mg alloy.^{2-4,18-20} Cao and Kuboyama³² also observed that the bone ingrowth determined over time was significantly lower when using slowly degrading bone substitutes than using faster degrading ones. Compared to the good bone-ceramic interaction, NB, which had grown into both LAE442 pore sizes, often had no direct contact with the inner surface of the LAE442 scaffolds. OLT visible in the present study between scaffold material and NB in histologically stained sections was also observed by Lalk et al.⁷ within sponges of Mg alloy AX30. They assumed that OLT was barely mineralized as it did not appear to be of a bone like density in the μ CT80. This assumption could be supported in the present study by additional SEM/EDX analyses, as OLT showed significantly reduced Ca- and P-contents compared to mature bone. In contrast to physiological osteoid seams of about 20 μ m,⁶⁹ the OLT determined in the present study and by Lalk et al.⁷ was more than ten times wider. Lined-up osteoblasts at the rim of the OLT in the present study as well as embedded osteocytes within the OLT and the degree of mineralization could suggest a preliminary stage of mature bone.⁷ Parfitt et al.⁷⁰ also referred to osteoid as tissue on the way to mineralization and as a kind of pre-bone. In the literature, various causes for increased osteoid production are described. One reason could be the MgF₂ treated surface of the LAE442 alloy.⁷¹⁻⁷³ Another could be the influence of the high Mg content in the LAE442 alloy itself.^{74,75} Stimulating effects of fluoride on osteoblasts and subsequent increased osteoid formation with delayed calcification were observed in mice.⁷¹ However, this had no further influence on the microhardness of the trabecular structures.⁷¹ Studies in rabbits also described a fluoride associated proliferation of the osteoid.^{72,73} Mg ions released during the degradation process are also thought to promote the further differentiation of bone precursor cells, and thus could be the cause of increased osteoid deposition.^{74,75} Systemic homeostasis of Mg is being maintained through intestinal absorption and the effective excretory pathway via the kidneys in healthy organisms.^{76,77} Around 99% of magnesium is stored in bones, muscles, and soft tissues.⁷⁸ Based on some in vitro and in vivo studies in recent years, it is argued that the local excess of Mg ions released by corrosion may have a restraining effect on potential new bone tissue and cell viability.^{15,79,80} The local pH increase at the interface may also lead to a reduced osteogenic differentiation of stem cells, which may further cause cellular non-adhesion or even non-mineralization.¹⁵ In the present LAE442 study a close bone/OLT contact with the Mg alloy was continuously present within both pore sizes of LAE442. This indicates a good osteoconductive effect according to Fischerauer et al.⁵¹ Similarly, to the present results, a

distinct contact was also observed by Witte et al.⁸¹ and Lalk et al.⁷ Both authors described enlarged osteoid seams⁸¹ or extended amounts of osteoid tissue⁷ during in vivo degradation. In the present study, more in-depth investigations of the OLT were carried out (local EDX measurements), but the lack of mineralization due to possible local factors as described above could not be clarified, the question of whether mature bone develops from OLT still needs to be addressed, although the selected observation period was considerably longer than the chosen study period of Lalk et al.⁷ Serum analyses and histological organ examinations were performed in the past and showed no systemic or local signs of toxic or inflammatory tendencies.^{12,19,20,39,82-86} The present study can confirm these findings from clinical examinations together with the fact that only few inflammatory cells were present in the histologic evaluation.

Cell penetration and the ingrowth of oxygen and nutrient-providing vessels is a prerequisite for successful bone regeneration within bone substitute materials of various origins.^{28,29} The amount of blood vessels in the scaffolds interior determined in the granulation tissue showed no significant differences between LAE442 and β -TCP. Pore size comparisons of just under 100 up to 400 μ m demonstrated that the larger macroporous structures tended to show better vascularization.^{7,31,63} Klenke et al.³¹ described a correlation of increasing pore size with the more pronounced vascularization and osseointegration effect on biphasic Ca-P ceramic particles in cranial defects of mice. A trend toward better blood vessel supply within 400 μ m large pores compared to the 100 μ m pore model was also described for the Mg alloy AX30 by Lalk et al.⁷ In the current study, the reported effect of increased vascularization in the larger pore size could only be confirmed in week 6 for p500, because afterward the score values of p400 and p500 converged. The difference in the two pore sizes was possibly not large enough to obtain more pronounced differences in this study.

The increased incidence of fibrocytes in p400 compared to p500, together with the significantly lower vascularization of p400 at week 6, confirms the assumption that reduced oxygenation promotes the formation of mesenchymal fibrous tissue.⁸⁷ Other in vivo studies investigating Mg scaffolds with pore sizes between 100 and 400 μ m^{7,14} also reported an increased fibrous tissue content or capsule formation around the smaller pore size. Despite moderate amounts of fibrous tissue, macrophages, and locally and sporadically occurring FBGCs, a thick capsule formation as described in Nuss and von Rechenberg³⁸ was not seen in both LAE442 pore sizes in the present study. The absence of fibrous capsules generally enables the formation of a good bone-implant contact. Bone bonding can form to varying degrees in bioresorbable materials such as Mg alloys, due to the continuous progress of in vivo corrosion and the erosive scaffold surfaces.³⁸ Therefore, it seems likely that bone-scaffold contacts do not have such a

permanent character as for example in non-degradable metals or within bioabsorbable ceramics. Additionally, the absence of fibrous capsules in the present study over 36 weeks indicates good long-term biocompatibility of the slowly degrading LAE442 scaffolds, as other studies on solid LAE442 pins previously reported.^{11,19,20} Since macrophages and FBGCs also occurred as a cellular response *in vivo* in other Mg alloys⁸⁻¹⁰ and biomaterials of non-metallic origin,^{63,64,88} their presence is not automatically considered to be a pathological or abnormal reaction between implant material and host tissue.³⁸ There is a controversial debate about the general character of FBGCs and macrophages. Nevertheless, they can be interpreted as physiological or cellular responses to slowly biodegradable bone substitutes, as long as their presence does not exceed a certain level.^{38,89,90} According to Nuss and von Rechenberg³⁸ a persistent inflammation, marked by lymphocytes, plasma cells, and neutrophil granulocytes combined with a thick, fibrous capsule therefore suggests non-biocompatible properties. These prerequisites, especially in combination and to such an extent, were not given in the present study.

Angrisani et al.¹⁹ also attributed the presence of macrophages and FBGs after 3.5 years of implantation of LAE442 solid implants in rabbits, to the still proceeding implant degradation in order to remove corrosion products and described the extent of the cellular reaction as absolutely acceptable. In general, the surrounding tissue shows a varying degree of foreign body reaction, depending on the degradation rate of the Mg alloy used.^{19,38} In contrast, Dziuba et al.¹² observed that degradation products can lead to inflammatory defense reactions in the host tissue when using much faster degrading implants like the Mg alloy ZEK100. Such a defense reaction, which is triggered by implant debris, did not occur during the entire duration of the study with the slowly degrading LAE442 scaffolds. Nevertheless, based on the literature and the current observations of the present study, this reaction seems to be typical for degradable biomaterials.^{38,89,90}

Conclusion

The present study demonstrates that bone in growth generally occurred in both LAE442 pore size models. LAE442 p500 showed more successful osseointegration compared to p400, which was characterized by more bone-scaffold contacts and a greater tendency to show newly formed bone, even in central scaffold areas. The increased occurrence of OLT in direct contact with the LAE442 alloy makes p500 appear to be a more osteoconductive pore size model than p400. However, the osseointegration behavior of LAE442 was not equally as good compared to β -TCP. The degradation of both LAE442 scaffolds continued steadily with low volume losses and tolerable gas formation due to degradation. Within the entire study period, a moderate number of

macrophages and only a few FBGC were present within the histological specimens. Lower amounts of fibrocytes within LAE442 p500 compared to p400 suggest better biocompatibility together with more suitable osseointegrative properties for the larger pore size LAE442 p500. Crucial factors for the properties mentioned could be scaffolds with optimized surface coatings and pore sizes above 500 μm in combination with controlled gas release and continuous removal of corrosion products. Further studies on pore sizes, even larger than the mostly recommended range, may also provide further clarity. In this study, the LAE442 scaffolds have been exposed to low forces only. The suitability for repairing load-bearing defects cannot yet be finally clarified on the base of this study and therefore requires further studies on a weight-bearing experimental setting.

Acknowledgements

The authors thank Cristiane Rudolph Meneghelli and Beatrix Limmer for their outstanding technical assistance in histology as well as Lisa Wurm for her technical support and excellent input concerning μCT measurements.

Author contributions

Conceptualization, H.J.M., P.W., and A.M.-L.; funding acquisition, H.J.M. and A.M.-L.; implementation of scaffold production S.J., C.K., and H.J.M.; gaining ethical approval, A.-C.W. and A.M.-L.; methodology and evaluation of *in-vivo* investigations, J.A., F.F. and A.-C.W. and A.M.-L.; project administration, A.-C.W., A.M.-L., P.W., and H.J.M.; supervision, F.F., A.-C.W., and A.M.-L.; visualization, J.A.; writing and original draft preparation, J.A.; all authors reviewed and edited the manuscript and approved the final version of the manuscript.

Data availability statement

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

Declaration of conflicting interests

The author(s) declared no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article.

Funding

The author(s) disclosed receipt of the following financial support for the research, authorship, and/or publication of this article: This work was supported by the German Research Foundation within the project "Interfacial effects and integration behavior of magnesium-based sponges as bioresorbable bone substitute material" [grant number: 271761343].

Guarantor

A. M.-L. takes responsibility for the article, its content, science involved, accuracy of the study, and appropriateness of the references.

ORCID iD

Julia Augustin  <https://orcid.org/0000-0002-2319-3912>

References

- Damien CJ and Parsons JR. Bone graft and bone graft substitutes: a review of current technology and applications. *J Appl Biomater* 1991; 2: 187–208.
- Witte F, Kaese V, Haferkamp H, et al. In vivo corrosion of four magnesium alloys and the associated bone response. *Biomaterials* 2005; 26: 3557–3563.
- Thomann M, Krause C, Bormann D, von der Höh N, Windhagen H and 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. *Materwiss Werksttech* 2009; 40: 82–87.
- Krause A, von der Höh N, Bormann D, et al. Degradation behaviour and mechanical properties of magnesium implants in rabbit tibiae. *J Mater Sci* 2010; 45: 624–632.
- Meyer-Lindenberg A, Thomann M, Krause A, et al. Untersuchungen zum Einsatz einer Magnesiumbasislegierung als neues resorbierbares Implantatmaterial für die Osteosynthese. *Kleintierpraxis* 2010; 55: 349–363.
- Lalk M, Reifenrath J, Rittershaus D, Bormann D and Meyer-Lindenberg A. Biocompatibility and degradation behaviour of degradable magnesium sponges coated with bioglass – method establishment within the framework of a pilot study. *Materwiss Werksttech* 2010; 41: 1025–1034.
- Lalk M, Reifenrath J, Angrisani N, et al. 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: 417–436.
- Reifenrath J, Krause A, Bormann D, von Rechenberg B, Windhagen H and 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. *Materwiss Werksttech* 2010; 41: 1054–1061.
- Erdmann N, Bondarenko A, Hewicker-Trautwein M, et al. 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.
- Huehnerschulte TA, Reifenrath J, von Rechenberg B, et al. In vivo assessment of the host reactions to the biodegradation of the two novel magnesium alloys ZEK100 and AX30 in an animal model. *Biomed Eng Online* 2012; 11(1): 4.
- Hamp C, Angrisani N, Reifenrath J, Bormann D, Seitz JM and 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 Mater Biol Appl* 2013; 33: 317–326.
- Dziuba D, Meyer-Lindenberg A, Seitz JM, Waizy H, Angrisani N and Reifenrath J. Long-term in vivo degradation behaviour and biocompatibility of the magnesium alloy ZEK100 for use as a biodegradable bone implant. *Acta Biomater* 2013; 9: 8548–8560.
- Liu YJ, Yang ZY, Tan LL, Li H and Zhang YZ. An animal experimental study of porous magnesium scaffold degradation and osteogenesis. *Braz J Med Biol Res* 2014; 47: 715–720.
- Cheng MQ, Wahafu T, Jiang GF, et al. A novel open-porous magnesium scaffold with controllable microstructures and properties for bone regeneration. *Sci Rep* 2016; 6: 24134.
- Yu W, Zhao H, Ding Z, et al. 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.
- Kraus T, Fischerauer SF, Hänzli AC, Uggowitzer PJ, Löffler JF and Weinberg AM. Magnesium alloys for temporary implants in osteosynthesis: in vivo studies of their degradation and interaction with bone. *Acta Biomater* 2012; 8: 1230–1238.
- Witte F, Fischer J, Nellesen J, et al. In vitro and in vivo corrosion measurements of magnesium alloys. *Biomaterials* 2006; 27: 1013–1018.
- Angrisani N, Seitz J-M, Meyer-Lindenberg A, et al. Rare earth metals as alloying components in magnesium implants for orthopaedic applications. In: Waldemar AM (ed.) *New features on magnesium alloys*. Rijeka: IntechOpen, 2012, pp.82–96.
- Angrisani N, Reifenrath J, Zimmermann F, et al. 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.
- Rössig C, Angrisani N, Helmecke P, et al. In vivo evaluation of a magnesium-based degradable intramedullary nailing system in a sheep model. *Acta Biomater* 2015; 25: 369–383.
- Marco F, Milena F, Gianluca G and Vittoria O. Peri-implant osteogenesis in health and osteoporosis. *Micron* 2005; 36: 630–644.
- Staiger MP, Pietak AM, Huadmai J and Dias G. Magnesium and its alloys as orthopedic biomaterials: a review. *Biomaterials* 2006; 27: 1728–1734.
- Sennerby L, Thomsen P and Ericson LE. A morphometric and biomechanic comparison of titanium implants inserted in rabbit cortical and cancellous bone. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1992; 7: 62–71.
- Mavrogenis AF, Dimitriou R, Parvizi J and Babis GC. Biology of implant osseointegration. *J Musculoskeletal Neuronal Interact* 2009; 9: 61–71.
- Rosenqvist R, Bylander B, Knutson K, et al. Loosening of the porous coating of bicompartmental prostheses in patients with rheumatoid arthritis. *J Bone Joint Surg Am* 1986; 68: 538–542.
- Mombelli A and Cionca N. Systemic diseases affecting osseointegration therapy. *Clin Oral Implants Res* 2006; 17 Suppl 2(1): 97–103.
- Zhang H, Lewis CG, Aronow MS and Gronowicz GA. The effects of patient age on human osteoblasts' response to Ti-6Al-4V implants in vitro. *J Orthop Res* 2004; 22: 30–38.
- Kuboki Y, Takita H, Kobayashi D, et al. BMP-induced osteogenesis on the surface of hydroxyapatite with geometrically feasible and nonfeasible structures: topology of osteogenesis. *J Biomed Mater Res* 1998; 39: 190–199.
- Karageorgiou V and Kaplan D. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials* 2005; 26: 5474–5491.
- Phemister D. The fate of transplanted bone and regenerative power of its various constituents. *Surg Gyn Obst* 1914; 19: 303–314.

31. Klenke FM, Liu Y, Yuan H, Hunziker EB, Siebenrock KA and Hofstetter W. Impact of pore size on the vascularization and osseointegration of ceramic bone substitutes in vivo. *J Biomed Mater Res* 2008; 85: 777–786.
32. Cao H and Kuboyama N. A biodegradable porous composite scaffold of PGA/beta-TCP for bone tissue engineering. *Bone* 2010; 46: 386–395.
33. Tsuruga E, Takita H, Itoh H, Wakisaka Y and Kuboki Y. Pore size of porous hydroxyapatite as the cell-substratum controls BMP-induced osteogenesis. *J Biochem* 1997; 121: 317–324.
34. Götz HE, Müller M, Emmel A, Holzwarth U, Erben RG and Stangl R. Effect of surface finish on the osseointegration of laser-treated titanium alloy implants. *Biomaterials* 2004; 25: 4057–4064.
35. von Doernberg M-C, von Rechenberg B, Bohner M, et al. In vivo behavior of calcium phosphate scaffolds with four different pore sizes. *Biomaterials* 2006; 27: 5186–5198.
36. Willie BM, Yang X, Kelly NH, et al. Osseointegration into a novel titanium foam implant in the distal femur of a rabbit. *J Biomed Mater Res Part B Appl Biomater* 2010; 92: 479–488.
37. Hulbert SF, Young FA, Mathews RS, Klawitter JJ, Talbert CD and Stelling FH. Potential of ceramic materials as permanently implantable skeletal prostheses. *J Biomed Mater Res* 1970; 4: 433–456.
38. Nuss KMR and von Rechenberg B. Biocompatibility issues with modern implants in bone – a review for clinical orthopedics. *Open Orthop J* 2008; 2: 66–78.
39. Witte F, Fischer J, Nellesen J, et al. In vivo corrosion and corrosion protection of magnesium alloy LAE442. *Acta Biomater* 2010; 6: 1792–1799.
40. Augustin J, Feichtner F, Waselau A-C, et al. Comparison of two pore sizes of LAE442 scaffolds and their effect on degradation and osseointegration behavior in the rabbit model. *J Biomed Mater Res Part B Appl Biomater* 2020; 108: 2776–2788.
41. Seitz J-M, Collier K, Wulf E, et al. The effect of different sterilization methods on the mechanical strength of magnesium based implant materials. *Adv Eng Mater* 2011; 13: 1146–1151.
42. Julmi S, Krüger A-K, Waselau A-C, et al. Processing and coating of open-pored absorbable magnesium-based bone implants. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 2019; 98: 1073–1086.
43. Thomann M, Krause C, Angrisani N, et al. 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: 1609–1619.
44. Donath K and Breuner G. A method for the study of undecalcified bones and teeth with attached soft tissues. *J Oral Pathol Med* 1982; 11: 318–326.
45. Kasten P, Beyen I, Niemeyer P, Luginbühl R, Bohner M and Richter W. Porosity and pore size of β -tricalcium phosphate scaffold can influence protein production and osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells: an in vitro and in vivo study. *Acta Biomater* 2008; 4: 1904–1915.
46. Kleer N, Julmi S, Gartzke AK, et al. Comparison of degradation behaviour and osseointegration of the two magnesium scaffolds, LAE442 and La2, in vivo. *Materialia* 2019; 8: 100436.
47. Makar GL and Kruger J. Corrosion of magnesium. *Int Mater Rev* 1993; 38(3): 138–153.
48. Staesche M. Über die chemische Erzeugung einer dickeren Magnesiumfluorid-Schutzschicht auf Magnesium-Legierungen. *Arch Metallkunde* 1948; 3: 99–102.
49. Song GL and Atrens A. Corrosion mechanisms of magnesium alloys. *Adv Eng Mater* 1999; 1: 11–33.
50. Zeng R, Dietzel W, Witte F, Hort N and Blawert C. Progress and challenge for magnesium alloys as biomaterials. *Adv Eng Mater* 2008; 10: B3–B14.
51. Fischerauer SF, Kraus T, Wu X, et al. In vivo degradation performance of micro-arc-oxidized magnesium implants: a micro-CT study in rats. *Acta Biomater* 2013; 9: 5411–5420.
52. Wang YQ, Zheng MY and Wu K. Microarc oxidation coating formed on SiCw/AZ91 magnesium matrix composite and its corrosion resistance. *Mater Lett* 2005; 59: 1727–1731.
53. Gu Y, Chen CF, Bandopadhyay S, Ning C, Zhang Y and Guo Y. Corrosion mechanism and model of pulsed DC microarc oxidation treated AZ31 alloy in simulated body fluid. *Appl Surf Sci* 2012; 258(16): 6116–6126.
54. Julmi S, Klose C, Krüger A-K, et al. Development of sponge structure and casting conditions for absorbable magnesium bone implants. In: TMS T (ed.) *TMS 2017; 146th annual meeting & exhibition supplemental proceedings*. Cham: Springer, 2017, pp.307–317.
55. Wolters L, Angrisani N, Seitz J, Helmecke P, Weizbauer A and Reifennath J. Applicability of degradable magnesium LAE442 alloy plate-screw-systems in a rabbit model. *Biomed Tech* 2013; 58(1). DOI: 10.1515/bmt-2013-4059.
56. Von der Höh N, Bormann D, Lucas A, et al. Influence of different surface machining treatments of magnesium-based resorbable implants on the degradation behavior in rabbits. *Adv Eng Mater* 2009; 11: B47–B54.
57. Witte F, Hort N, Vogt C, et al. Degradable biomaterials based on magnesium corrosion. *Curr Opin Solid State Mater Sci* 2008; 12: 63–72.
58. Yazdimamaghani M, Razavi M, Vashae D, Moharamzadeh K, Boccaccini AR and Tayebi L. Porous magnesium-based scaffolds for tissue engineering. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 2017; 71: 1253–1266.
59. Lu X and Leng Y. Theoretical analysis of calcium phosphate precipitation in simulated body fluid. *Biomaterials* 2005; 26(10): 1097–1108.
60. Bränemark PI. Osseointegration and its experimental background. *J Prosthet Dent* 1983; 50(3): 399–410.
61. Theiss F, Apelt D, Brand B, et al. Biocompatibility and resorption of a brushite calcium phosphate cement. *Biomaterials* 2005; 26: 4383–4394.
62. Chu TM, Orton DG, Hollister SJ, Feinberg SE and Halloran JW. Mechanical and in vivo performance of hydroxyapatite implants with controlled architectures. *Biomaterials* 2002; 23: 1283–1293.
63. Hofmann S, Hilbe M, Fajardo RJ, et al. Remodeling of tissue-engineered bone structures in vivo. *Eur J Pharm Biopharm* 2013; 85(1): 119–129.
64. Uebersax L, Apfel T, Nuss KM, et al. Biocompatibility and osteoconduction of macroporous silk fibroin implants in cortical defects in sheep. *Eur J Pharm Biopharm* 2013; 85: 107–118.

65. Maglio M, Salamanna F, Brogini S, et al. Histological, histomorphometrical, and biomechanical studies of bone-implanted medical devices: Hard resin embedding. *Biomed Res Int* 2020; 2020: 1804630.
66. Rügsegger P, Koller B and Müller R. A microtomographic system for the nondestructive evaluation of bone architecture. *Calcif Tissue Int* 1996; 58: 24–29.
67. Wachter NJ, Augat P, Krischak GD, Mentzel M, Kinzl L and Claes L. Prediction of cortical bone porosity in vitro by microcomputed tomography. *Calcif Tissue Int* 2001; 68: 38–42.
68. Kraus T, Fischerauer S, Treichler S, et al. The influence of biodegradable magnesium implants on the growth plate. *Acta Biomater* 2018; 66: 109–117.
69. Raina V. Normal osteoid tissue. *J Clin Pathol* 1972; 25: 229–232.
70. Parfitt AM, Drezner MK, Glorieux FH, et al. Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols, and units. Report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *J Bone Miner Res* 1987; 2: 595–610.
71. Mousny M, Omelon S, Wise L, et al. Fluoride effects on bone formation and mineralization are influenced by genetics. *Bone* 2008; 43: 1067–1074.
72. Susheela AK and Jha M. Cellular and histochemical characteristics of osteoid formed in experimental fluoride poisoning. *Toxicol Lett* 1983; 16: 35–40.
73. McCormack AP, Anderson PA and Tencer AF. Effect of controlled local release of sodium fluoride on bone formation: filling a defect in the proximal femoral cortex. *J Orthop Res* 1993; 11: 548–555.
74. Zreiqat H, Howlett CR, Zannettino A, et al. Mechanisms of magnesium-stimulated adhesion of osteoblastic cells to commonly used orthopaedic implants. *J Biomed Mater Res* 2002; 62: 175–184.
75. Revell PA, Damien E, Zhang XS, Evans P and Howlett CR. The effect of magnesium ions on bone bonding to hydroxyapatite coating on titanium alloy implants. *Key Eng Mater* 2003; 254–256: 447–450.
76. Saris N-EL, Mervaala E, Karppanen H, Khawaja JA and Lewenstam A. Magnesium: an update on physiological, clinical and analytical aspects. *Clin Chim Acta* 2000; 294: 1–26.
77. Vormann J. Magnesium: nutrition and metabolism. *Mol Aspects Med* 2003; 24: 27–37.
78. Elin RJ. Assessment of magnesium status for diagnosis and therapy. *Magnes Res* 2010; 23: S194–S198.
79. Yoshizawa S, Brown A, Barchowsky A and Sfeir C. Magnesium ion stimulation of bone marrow stromal cells enhances osteogenic activity, simulating the effect of magnesium alloy degradation. *Acta Biomater* 2014; 10: 2834–2842.
80. Wong HM, Wu S, Chu PK, et al. Low-modulus Mg/PCL hybrid bone substitute for osteoporotic fracture fixation. *Biomaterials* 2013; 34: 7016–7032.
81. Witte F, Ulrich H, Palm C and Willbold E. Biodegradable magnesium scaffolds: part II: peri-implant bone remodeling. *J Biomed Mater Res A* 2007; 81: 757–765.
82. Zhang E, Xu L, Yu G, Pan F and Yang K. In vivo evaluation of biodegradable magnesium alloy bone implant in the first 6 months implantation. *J Biomed Mater Res* 2009; 90: 882–893.
83. Zhang S, Zhang X, Zhao C, et al. Research on an Mg–Zn alloy as a degradable biomaterial. *Acta Biomater* 2010; 6: 626–640.
84. Dickmann J, Bauer S, Weizbauer A, et al. Examination of a biodegradable magnesium screw for the reconstruction of the anterior cruciate ligament: a pilot in vivo study in rabbits. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 2016; 59: 1100–1109.
85. Xu L, Yu G, Zhang E, Pan F and Yang K. In vivo corrosion behavior of Mg–Mn–Zn alloy for bone implant application. *J Biomed Mater Res* 2007; 83: 703–711.
86. Li Z, Gu X, Lou S and Zheng Y. The development of binary Mg–Ca alloys for use as biodegradable materials within bone. *Biomaterials* 2008; 29: 1329–1344.
87. Muschler GF, Nakamoto C and Griffith LG. Engineering principles of clinical cell-based tissue engineering. *J Bone Joint Surg Am* 2004; 86: 1541–1558.
88. Bergsma EJ, Rozema FR, Bos RR and de Bruijn WC. Foreign body reactions to resorbable poly(l-lactide) bone plates and screws used for the fixation of unstable zygomatic fractures. *J Oral Maxillofac Surg* 1993; 51: 666–670.
89. Lassus J, Salo J, Jiranek WA, et al. Macrophage activation results in bone resorption. *Clin Orthop Relat Res* 1998; 1998: 7–15.
90. Anderson JM. Inflammation, wound healing, and the foreign-body response. In: Ratner B, Hoffmann A, Schoen FJ, et al. (eds) *Biomaterials science*. San Diego, CA: Elsevier, 2004, pp.296–303.

Appendix A: Guidelines for accommodation and care of animals

Council of Europe. European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes (ETS No. 123). Council of Europe. Strasbourg, 1986.

IV. DISKUSSION

Mg-Legierungen sind von großem Interesse in der Knochenersatzforschung auf Grund ihrer Bioresorbierbarkeit (Witte et al. 2005, Staiger et al. 2006), hohen Stabilität und dennoch geringem Gewicht (Kirkland et al. 2009, Barbas et al. 2012) sowie ihrer mechanischen Eigenschaften, welche jenen des Knochens sehr ähnlich sind (Witte et al. 2005, Staiger et al. 2006). Zusätzlich können Poren als osteokonduktiv wirkendes Strukturelement während der Herstellung der Mg-Legierung eingearbeitet werden und einen effektiven Beitrag leisten, um neues Knochengewebe gezielt in die Defektstelle zu leiten (Groeneveld et al. 1999, Karageorgiou und Kaplan 2005, Klenke et al. 2008). Bei idealem Ablauf verlaufen Degradation und Osteoneogenese aufeinander abgestimmt, sodass die benötigte Stabilität und zelluläre Leitfunktion des bioresorbierbaren Knochenersatzmaterials so lange aufrechterhalten wird, bis sich ein belastbarer und intakter Knochen in der Defektstelle gebildet hat (Hutmacher 2000, Hannink und Arts 2011).

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die bisher lediglich als resorbierbares Implantat untersuchte Mg-Legierung LAE442 erstmalig als offenporiges, resorbierbares Knochenersatzmaterial auf das Degradations- und das Osseointegrationsverhalten zu untersuchen. Verglichen wurden zwei unterschiedliche Porengrößenmodelle mit homogen verteilten, interkonnektierenden Poren von 400 μm und 500 μm (p400/p500), um zu untersuchen, welche Größe für LAE442 die geeignetere Porenvariante darstellt. Hierfür wurden adulten Kaninchen zylindrische Scaffolds in den *Trochanter major ossis femoris* eingesetzt und in röntgenologischen und μ -computertomographischen Verlaufskontrollen untersucht. Für eine weiterführende und ultrastrukturelle Gegenüberstellung beider Porengrößenmodelle sowie des Grenzflächenbereichs zum Knochen wurden *ex vivo* μ CT-Aufnahmen, stereomikroskopische und rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen angefertigt, um neben der Oberflächentopografie und Elementeverteilung auch die Biokompatibilität zu bewerten. Als Kontrolle wurde eine β -Tricalciumphosphat-Keramik (β -TCP) mit gleichen äußeren Dimensionen (\emptyset : 4 mm, Länge: 5 mm) verwendet.

Untersuchungen während der gesamten Studiendauer der vorliegenden Arbeit ergaben eine insgesamt gute klinische Verträglichkeit der beiden LAE442-Scaffolds mit den jeweiligen Porengrößen. Wie auch in früheren Studien zu

LAE442-Implantaten (Witte et al. 2005, Krause 2008, Thomann et al. 2009, Witte et al. 2010, Hampp et al. 2013, Rössig et al. 2015, Angrisani et al. 2016) oder auch anderer Mg-basierter Knochenersatzstoffe wie AZ91 oder AX30 (Reifenrath 2005, Lalk et al. 2010, Lalk et al. 2013) und Scaffolds aus reinem Mg (Cheng et al. 2016), konzentrierte man sich bei der Beobachtung *in vivo* auf Schwellungen, Lahmheiten, Schmerzreaktionen und anhaltende Wundheilungsstörungen an der Operationsstelle. In der eigenen Studie traten lediglich leichte Schwellungen und Rötungen in den ersten Tagen um die Stelle des Eingriffs auf. Diese entsprachen stets Verhältnissen, wie sie bei einer physiologisch verlaufenden Wundheilung auftreten (Witte und Barbul 1997). Hierbei konnten keine klinischen Unterschiede betreffend palpatorischer oder visueller Anzeichen zwischen LAE442 p400, p500 sowie der Kontrollgruppe β -TCP festgestellt werden. Hampp et al. (2013) und Rössig et al. (2015) berichteten unabhängig des verwendeten Tiermodells von Emphysemen oder kurzweiligen Lahmheiten einzelner Tiere. Dagegen wurden in der eigenen Studie über LAE442-Scaffolds keine Reaktionen dieser Art festgestellt. Witte et al. (2010) verzeichneten sogar keine klinischen Auffälligkeiten bei zylindrischen LAE442-Implantaten während der Untersuchungsdauer von zwölf Wochen. Thomann et al. (2009) weiteten den Zeitraum mit zwölf Monaten deutlich aus und stellten ein Ausbleiben klinischer Nebenwirkungen bei LAE442-Pins in der proximalen Tibia von Kaninchen fest. Angrisani et al. (2016) bestätigte die Langzeit-Verträglichkeit von LAE442-Pins, welche über drei Jahre in der Markhöhle von Kaninchen verblieben. Die zugängliche Literatur spiegelt betreffend etwaiger klinischer Auffälligkeiten seitens LAE442 keine bis mild-moderate und somit insgesamt tolerable klinische Auswirkungen wider, welche den Beobachtungen der eigenen Arbeit in ihrem Ausmaß entsprechen.

Zur Erkennung etwaiger Degradationsunterschiede zwischen LAE442 p400, p500 und β -TCP wurden röntgenologische sowie μ -computertomografische Aufnahmen *in vivo* sowie *ex vivo* zur Beurteilung herangezogen. Im Röntgen sowie im *in-vivo*- μ CT wurde postoperativ kontrolliert, dass alle Scaffolds in die gleiche vorgesehene spongiöse Stelle eingesetzt wurden, um diese in nachfolgende Vergleiche der Studie mit einbeziehen zu können (Lalk et al. 2013). Eine hiervon abweichende Position (Markhöhle, Kortikalis oder Weichgewebe) könnte sonst unterschiedliche Korrosionsgeschwindigkeiten zur Folge haben (McBride 1938, Von der Höh et al. 2009, Zhang et al. 2009), da ortsabhängig unterschiedlich viel Kontakt zu wässrigen

Medien besteht (Song und Atrens 1999, Staiger et al. 2006, Song und Song 2007) und der Blutfluss variiert (Witte et al. 2008). Schon McBride (1938) stellte einen Unterschied in der Korrosion intramedullärer Mg-Stifte fest, welche langsamer korrodierten als bei transkortikaler Platzierung. Von der Höh et al. (2009) beobachteten nach Implantation von MgCa_{0,8}-Zylindern in Epikondylen der Femora von Kaninchen, dass Bereiche, welche näher zum Markraum lagen, schneller *in vivo* abbauten als jene, die in der Spongiosa lagen. Ein ähnliches Abbauverhalten berichteten auch Zhang et al. (2009) mit einer Mg-Zn-Mn Legierung (Legierung aus > 98 mas% Mg, 1 mas% Zn und 0,8 mas% Mn), welche in Femora von Ratten implantiert wurden. In der eigenen Arbeit lag kein solcher extremer Unterschied im Abbau von einzelnen Scaffoldbereichen vor, was an der stets gleichen Platzierung im spöngiösen Anteil des Trochanter und den hierüber geführten Kontrollen, zur Absicherung der korrekten Platzierung, gelegen haben könnte.

In Verbindung mit chloridhaltigen Medien, wie etwa physiologischer Körperflüssigkeit, wird die Entstehung von Wasserstoffgas als chemisches Nebenprodukt der Mg-Korrosion gefördert (Song und Atrens 1999, Witte et al. 2005, Staiger et al. 2006, Song und Song 2007). Eine mg-assoziierte Gasbildung konnte in direkter Scaffold-Umgebung durch das *in-vivo*- μ CT und mittels des noch hochauflösenderen *ex-vivo*- μ CT noch präziser im Inneren von p400 und p500 dargestellt werden. Die Tendenz einer jeweils ansteigenden Gasmenge war bis Woche zwölf erkennbar. Während man bei β -TCP erwartungsgemäß lediglich postoperativ und nachfolgend kein Gas in der Umgebung vorfinden konnte, wurden deutliche Unterschiede peri-implantär zwischen p400 und p500 sowie signifikante Unterschiede seitens persistierenden und deutlicheren Gasmengen für p400 direkt im Poreninneren der Wochen 24 und 36 ermittelt. Aus Mg entsteht während seiner Korrosion Wasserstoffgas (Witte et al. 2005). Fallen dabei zu schnell große Mengen an, kann es zu Akkumulationen in benachbarten Gewebshohlräumen kommen (Verbrugge 1933, McBride 1938, McCord et al. 1942, Witte et al. 2005). Eine zu hohe Gasanreicherung könnte durch den Einsatz langsam korrodierender Mg-Legierungen wie LAE442 verhindert werden (Witte et al. 2010). Insgesamt führte das Ausmaß an Gasbildung bei beiden LAE442 Porengrößen der eigenen Arbeit zu keinen Emphysemen und wirkte sich nicht klinisch beeinträchtigend auf die Tiere aus. Die offenporige und vergrößerte Oberfläche ermöglicht auch eine gesteigerte

Wechselwirkung mit direkt angrenzendem Gewebe. Nach Ansicht vieler Autoren kann sich dies beschleunigend auf den Mg-Abbau auswirken (Karageorgiou und Kaplan 2005, Zeng et al. 2008, Yazdimamaghani et al. 2017). Bei LAE442 p400 mit der faktisch größeren Oberfläche durch kleinere Poren zeigte sich der vermehrte Abbau durch eine höhere *in vivo* Korrosionsrate zusammen mit größeren Volumeneinbußen im *in-vivo*- μ CT sowie auch im *ex-vivo*- μ CT.

Da in der Literatur bisher keine weiteren *in vivo* Studien zu anderen Ersatzmaterialien aus der Mg-Legierung LAE442 vorliegen und *in-vivo*-Ergebnisse nicht zwangsläufig *in-vitro*-Resultate widerspiegeln (Witte et al. 2006 a), musste für die eigene Studie der Vergleich zu LAE442 Implantaten sowie zu anderen porös gestalteten Mg-Legierungen gezogen werden.

Die LAE442-Scaffolds der eigenen Studie degradierten bis Woche 36 um 9,9% (p400) bzw. 7,5% (p500) und somit nur etwas schneller als intramedullär eingesetzte LAE442-Pins, die nach der gleichen Zeit einen Verlust von 3% aufwiesen (Angrisani et al. 2016), oder zu soliden, ebenfalls MgF₂ beschichteten LAE442-Zylindern, die über zwölf Wochen in Femurkondylen untersucht wurden und deren Verluste 4% zum ursprünglich Volumen betragen (Witte et al. 2010). Das Poren die Degradation von Biomaterialien stark voranschreiten lassen können und damit auch die mechanischen Eigenschaften beeinträchtigen, zeigt auch eine Studie zu offenporigen AZ91-Scaffolds in Femurkondylen von Kaninchen. Innerhalb von zwölf Wochen degradierte AZ91 mit Porengrößen zwischen 10 - 1000 μ m viel zu schnell, um in gleicher Zeit eine ausreichende Knorpel- und Knochenneubildung im subchondralen Defekt entstehen zu lassen und dabei noch eine ausreichende Stabilität zu gewährleisten (Witte et al. 2006 b). Die Annahme, dass kleinere Porendurchmesser innerhalb der gleichen Legierung aufgrund der so größer werdenden Materialgesamtoberfläche die Degradation beschleunigen könnten, sahen auch Lalk et al. (2013) als wahrscheinlich an. Die Autoren verwendeten in ihrer Studie die Mg-Legierung AX30 in Form von zylindrischen Schwämmen mit inhomogen verteilten Poren der Größenmodelle 100 μ m bzw. 400 μ m. μ CT-Analysen zeigten dabei langsamere Degradationsverläufe der Schwammzylinder mit 400 μ m Poren, die nach 24 Wochen ein Restvolumen von 44% aufwiesen, wohingegen die AX30-Schwämme mit 100 μ m großen Poren nur noch zu 20% vorhanden waren. In der eigenen Arbeit degradierte das Porengrößenmodell mit 500 μ m sehr homogen, was sich durch geringe

Standardabweichungen im Vergleich zur Studie von Lalk et al. (2013) in den μ CT-Berechnungen in Bezug zum langsam abnehmenden Volumen zeigte. Die LAE442-Scaffolds mit der Porengröße von 400 μ m zeigten dagegen bereits bei der Hälfte der Scaffolds der sechs-Wochengruppe Lochfraßkorrosion und zu späteren Zeitpunkten (Woche 24 und 36) in den Randbereichen größeren, abgelösten Materialdebris, der zu einem fortschreitenden Formverlust führte. Neben der unebeneren, größeren p400-Oberfläche könnte die aufgebraute MgF_2 -Beschichtung eine Ursache für die zügigere Degradation von p400 sein. Bedingt durch die rauere Oberflächenbeschaffenheit dieses Modells nach dessen Herstellung, stellten Julmi et al. (2019), die die Scaffolds zuvor untersuchten, fest, dass keine gleichmäßig dicke MgF_2 -Schutzschicht auf der Oberfläche aufgebracht werden konnte. Diese Unregelmäßigkeit in der Auftragung könnte lokale Korrosionsangriffe und den dortigen Abbau fördern. Dieser Effekt wurde bereits von einigen Autoren zuvor vermutet (Makar und Kruger 1993, Song und Atrens 1999, Witte et al. 2010). Eine Beschädigung der korrosionsverzögernd wirkenden MgF_2 -Schicht bei der Einbringung der LAE442-Scaffolds stellt eine weitere Möglichkeit für einen schnelleren und ungleichmäßigeren Abbau von p400 dar (Thomann 2008). Da das operative Vorgehen für die eigene Studie standardisiert ablief und es keine Komplikationen während des chirurgischen Eingriffs gab, ist dies als eher unwahrscheinlich anzusehen. Größere Korrosionspartikel, wie sie im Fall von p400 vorlagen und gut im *ex-vivo*- μ CT darstellbar waren, können Entzündungen hervorrufen (Goodman 2007, Hallab und Jacobs 2009), welche wiederum den Heilungsprozess und die erforderliche Osteoneogenese in der Defektstelle beeinträchtigen können (Hallab und Jacobs 2009). Die in den eigenen Untersuchungen nachgewiesenen Abweichungen bei der Degradation von LAE442 p400 lassen p500 als homogener hinsichtlich des Degradationsverlaufs erscheinen. Aufgrund des Alleinstellungsmerkmals der vorliegenden Studie zu offenporigen LAE442-Scaffolds sollten künftig weitere Studien zu unterschiedlichen Porenspektren erfolgen, um die hier festgestellte Tendenzen zu überprüfen. Im Vergleich dazu zeigte β -TCP besonders zu den ersten Wochenzeitpunkten sehr variable Volumenverluste und eine unkalkulierbare Bioresorption. Der unkalkulierbare Abbaucharakter der β -TCP-Keramik würde zudem keine ausreichende mechanische Stabilität im lasttragenden Knochen geben (Nuss und von Rechenberg 2008). Für abbaubare Gerüstsubstanzen in knöchernen Arealen

sollte diese über mindestens zwei Monate nach dem operativen Eingriff stabil bleiben, bevor ein weiterer Abbau einsetzt (Hutmacher 2000).

Interkonnektierende Poren zeichnen sich durch ihre osteokonduktiven Eigenschaften aus (Groeneveld et al. 1999). Die Auswahl der Porengröße und Porosität hat einen wesentlichen Einfluss auf die Funktionalität des Knochenersatzmaterials, um im Sinne einer Leitstruktur für die benötigte Zellmigration fungieren zu können (Hutmacher 2000, Pérez et al. 2013). Dementsprechend wurde in der vorliegenden Arbeit anhand verschiedener deskriptiver und (semi-) quantitativer Knochenparameter überprüft, inwieweit sich eines der beiden Porenmodelle p400 bzw. p500 innerhalb LAE442 als geeignetere Leitstruktur herausstellt. Für die Analyse der μ CT-Daten wurde eine standardisierte Ringzone um alle Scaffolds definiert und darin folgende Parameter gemessen: prozentualer Knochenanteil (BV/TV), Knochendichte, Trabekelanzahl (Tb.N), Trabekeldicke (Tb.Th) und Trabekelseparation (Tb.Sp). Anhand dieser Parameter konnten knöcherne Umbauvorgänge um die LAE442- und β -TCP-Scaffolds über die Untersuchungsperiode hinweg verfolgt werden. Die in direkter Umgebung über die Zeit ansteigenden Verlaufparameter BV/TV, Tb.N und Tb.Th konnten zusammen mit den direkten Knochen-Scaffold Kontakten einen proaktiven Umbau in Richtung LAE442- als auch der β -TCP Scaffolds belegen. Bezüglich der Knochen-Scaffold Kontakte lieferte das *ex-vivo*- μ CT und die mit Toluidinblau gefärbten Hartschliffpräparate detailliertere Erkenntnisse als die zuvor mit dem *in-vivo*- μ CT erstellten Scans. Die kombinierte Nutzung verschiedener Methoden ermöglichte dadurch umfassendere Bewertungen von Osteoneogenese, Biokompatibilität und Integrationsverhalten (Engelke et al. 1999, Wachter et al. 2001, Thomsen et al. 2005). Der recht steile Anstieg der gemessenen Knochenparameter als auch die Entwicklung periostaler Zubildungen innerhalb der ersten beiden Wochen von p400, p500 sowie β -TCP könnte zum einen an einer gesteigerten ersten Reizung der Implantationsstelle durch das Implantatmaterial (Krause 2008) und zum anderen im Bohrvorgang liegen, welcher den Start des knöchernen Umbaus triggern könnte (Danckwardt-Lillieström 1969, Krause 2008, Von der Höh et al. 2009, Hampp et al. 2013). Darüber hinaus wird angenommen, dass eine operationsbedingt unterbrochene Blutversorgung ein weiterer Grund für endostale und periostale Umbaureaktionen ist (Richany et al. 1965, Danckwardt-Lillieström 1969). Zusätzlich wird Mg selbst ein stimulierender Effekt auf die

Knochenbildung zugesprochen (Yamasaki et al. 2002, Zreiqat et al. 2002, Revell et al. 2004, Witte et al. 2005, Pietak et al. 2008). Verschiedene Autoren beschreiben einen Zusammenhang zwischen der Degradationsgeschwindigkeit der untersuchten Mg-Legierung und der damit verbundenen Freisetzung von Mg-Ionen, welche wiederum das Ausmaß des knöchernen Umbaus auf peri-implantär ablaufende Prozesse bedingen (Witte et al. 2005, Witte et al. 2007, Krause 2008, Yu et al. 2017). Diese verstärkende Wirkung zeigte sich auch bereits vorab *in vitro* (Zreiqat et al. 2002, Pietak et al. 2008). Zreiqat et al. (2002) stellten eine erhöhte Knochenzelladhäsion auf mit Mg angereichertem Aluminiumoxid fest. Der Verwendung Mg-basierter Substrate wurde eine förderliche Wirkung in Bezug auf die Adhäsion und Differenzierung von Stromazellen in Richtung knöcherner Zelllinien zugesprochen (Pietak et al. 2008). Diese Beobachtungen wurden von Revell et al. (2004) im Kaninchenmodell bestätigt. In der genannten Studie wurde von einer gesteigerten Osteoneogenese für HA-beschichtete Titanzylinder berichtet, welche zusätzlich Mg-Ionen in der Beschichtung enthielten. Ebenso beschrieben die Autoren eine verbesserte Bindung zwischen neuem Knochen und dem Implantat im Vergleich zu den Anfertigungen ohne Mg-Anreicherung auf der Oberfläche.

Der Gesamteindruck der ablaufenden Knochenneubildung um die Scaffolds in der vorliegenden Arbeit ähnelt einer Studie von Witte et al. (2007), die poröse AZ91D Scaffolds in Kaninchenfemora implantierten. Die Autoren beschrieben zunächst unorganisiert wirkende, knöcherne Strukturen um die Mg-Scaffolds. Diese Strukturen reorganisierten sich zu späteren Wochenzeitpunkten und das Trabekelnetzwerk wurde regelmäßiger, was sich im ansteigenden BV/TV, höherer Tb. N und Tb. Th widerspiegelte. Dieser biphasische Verlauf wurde auch von anderen Arbeitsgruppen im Zusammenhang mit *in vivo* verwendeten Mg-Legierungen beschrieben (Witte et al. 2007, Xu et al. 2009, Lalk et al. 2013). Lalk et al. (2013) bezeichneten die anfänglich ausgebildeten Trabekel um AX30 Mg-Schwämme als vermehrt ungeordnet und feinmaschig. Das knöcherne Gesamtgefüge entwickelte sich nach zwölf Wochen hin zu einem weitmaschigeren und organisierten Trabekelnetz. Dies geschah besonderes bei den gleichmäßiger degradierenden Schwammvarianten, die mit einer MgF₂-Schicht versehen waren und die deutlich größere Porengröße (400 µm) aufwiesen. In der eigenen Arbeit kann nicht gänzlich ausgeschlossen werden, dass der steile Anstieg der knöchernen

Messwerte kurz nach der Operation (2. Woche) auch teils durch persistierende Bohrmehlreste verursacht wurde, die nicht komplett entfernt werden konnten, trotz der Verwendung eines Wundsaugers während der Operation. Außerdem kann Bohrmehl gemäß Bonetta (2006) ein osteogenetisches Potenzial aufweisen.

Da die Bildung von Knochengewebe bei den eigenen Scaffolds mit den 400 µm großen Poren nach etwa zehn Wochen stagnierte und sogar gegenüber der 500 µm Variante leicht zurückging, erschien p500 als geeignetere Porengröße. Nach anfänglichen Gemeinsamkeiten beider Porengrößen im postoperativen Verlauf, verdeutlichte sich nach zehn bis zwölf Wochen, dass die Kontrollkeramik β-TCP sowie p500 Knochenparameter vorweisen konnten, die physiologischer Spongiosa im OP-Bereich von Kaninchen, die kein Scaffolds erhielten, entsprachen. In der Literatur bestätigen *in-vivo*-Ergebnisse von auf Mg basierenden Knochenersatzstoffen, dass die jeweils größere der dort untersuchten Porenvarianten im peri-implantären Bereich auch größere Anteile an neuer Knochenmasse aufwies (Lalk et al. 2013, Cheng et al. 2016). Zudem kann die Beobachtung in der eigenen Studie größerer und kontinuierlich vorhandener Gas-Scoringwerte bei p400 im Vergleich zu p500 mit zeitgleich nur mäßig vorhandenen direkten Kontaktstellen zu Trabekeln bei p400 durch frühere Studien in Verbindung gebracht werden. Lalk et al. (2013) ermittelten, dass AX30-Schwämme mit Poren von etwa 100 µm sehr schnell im *Trochanter major* von Kaninchen innerhalb von 24 Wochen degradierten und mehr Gas in das umliegende Gewebe freisetzen. Dies führte zu lediglich sehr feinen und inkonsistenten Trabekelkontakten und damit zu einer schlechteren Integration, verglichen mit den langsamer degradierenden AX30 Modellvarianten, welche 400 µm große Poren beinhalteten. Kraus et al. (2012) untersuchten den Einfluss der Gasfreisetzung auf die Knochenneubildung anhand schnelldegradierender ZX50-Pins im Vergleich zu langsamer abbauenden WZ21-Pins in Femurkondylen männlicher Ratten. Die Autoren zeigten, dass bei geringen Abbauraten zeitgleich ablaufende Gasentwicklungen unproblematisch sind und die Knochenregeneration und Kontaktaufnahme durch den Knochen zur WZ21 Pinoberfläche davon nicht nachwirkend beeinträchtigt werden. All diese Studien zeigen, dass eine abbaubedingte Gasbildung zeitgleich zur Osteoneogenese stattfinden kann, soweit die Knochenneubildung davon unbeeinflusst bleibt (Kraus et al. 2012, Lalk et al. 2013). Unter Berücksichtigung dieser Bedingung ist, aufgrund der in der eigenen Studie festgestellten Ergebnissen zu p500, dies

insbesondere für den peri-implantären Bereich deutlicher gegeben. Des Weiteren ist gemäß Literatur eine Porengröße von 300 - 400 μm als Mindestgröße für eine ausreichende Vaskularisation des betroffenen Defekts erforderlich, um später dort Osteoneogenese vorfinden zu können (Tsuruga et al. 1997, Kuboki et al. 2002, Feng et al. 2011). Demnach befände sich die LAE442-Scaffoldvariante mit den 400 μm großen Poren am unteren Bereich der Empfehlung und würde demnach die hier festgestellte Tendenz einer deutlicheren Knochenneubildung betreffend LAE442 p500 bestärken. Jedoch muss erwähnt werden, dass auch einzelne Studien zu weitaus kleineren Porengrößen innerhalb unterschiedlicher Materialien wie Keramiken und Metallen den Beleg lieferten, dass auch innerhalb dieser Größenmodelle neuer Knochen vorgefunden wurde (Itälä et al. 2001, Galois und Mainard 2004, von Doernberg et al. 2006, Cheng et al. 2016).

Osseointegration definiert sich über den direkten Kontakt zwischen dem lebenden Knochen und dem Implantat (Brånemark et al. 1977, Albrektsson et al. 1981). Wie auch in vorherigen Studien über LAE442-Implantate (Witte et al. 2007, Rössig et al. 2015, Angrisani et al. 2016), konnten in den histologischen Präparaten der eigenen Studie Kontaktflächen an den beiden Grenzflächen nachgewiesen werden. Da man gemäß Witte et al. (2006 a) aus histologischen Schliffpräparaten nur eine lokal begrenzte Information erhält, konnten mittels *in-vivo*- sowie *ex-vivo*- μCT weitere Knochen-Scaffold Kontakte ergänzend entlang der Schnittebenen aller Scaffolds dargestellt und bewertet werden. Über die einzelnen Scanebenen hinweg wies p500 signifikant mehr Kontakte auf und zeigte somit, wie bereits beschrieben, ein überlegeneres Osseointegrationsverhalten als p400. Anteilig wuchsen Trabekel auch in die äußere Hälfte der LAE442-Scaffolds hinein. Dies war besonders an den äußeren Rand- und Eckbereichen der Scaffoldstreben der Fall und deckt sich mit weiteren Ergebnissen von Knochenersatzmaterialien auf Basis von Mg (Witte et al. 2006, Lalk et al. 2013, Liu et al. 2014, Cheng et al. 2016), Keramiken (Chu et al. 2002, Theiss et al. 2005, von Doernberg et al. 2006, Jones et al. 2007) oder Polymeren (Hofmann et al. 2013, Uebersax et al. 2013). Ergänzend zeigten REM/EDX-Analysen ausgewählter Bereiche der eigenen Studie knöcherne Kontakte an Stellen von LAE442, an welchen gleichzeitig weiße CaP-Präzipitationen auf der Degradationsschicht der Mg-Legierung erkennbar waren, die als wichtige Grenzflächenverbindung angesehen werden können (Lu und Leng 2005, Witte et al. 2005). Auch Witte et al. (2005) ermittelten mittels EDX bei Pins

aus unterschiedlichen Mg-Legierungen lokale Anhäufungen dieser Präzipitate, die erhöhte Massenanteile an Ca und P beinhalteten. Diese Präzipitationen können als eine Startquelle der Mineralisation gelten (Lu und Leng 2005) und wurden auch später im Zusammenhang mit Studien über Mg-Legierungen erwähnt (Thomann et al. 2009, Zhang et al. 2009, Meyer-Lindenberg et al. 2010, Ullmann et al. 2013). Es besteht die Annahme, dass Ausfällungen von Calciumphosphaten und Korrosionsprodukten (Magnesiumoxide und Magnesiumhydroxide) als Teil der Degradationsschicht dazu beitragen, die Korrosionsbeständigkeit zu erhöhen, indem sie zusammen die Funktion einer Schutzbarriere vor Korrosionsangriffen ausüben (Witte et al. 2005). *In vitro* Studien zeigten, dass Mg die Ausfällung von CaP fördert und diese Eigenschaft ferner genutzt werden kann, um die Osteokonduktivität des Materials zu steigern sowie die *in-situ*-Korrosionsbeständigkeit zu verbessern (Kuwahara et al. 2001, Li et al. 2004).

Bei allen Scaffolds der eigenen Untersuchung (p400, p500 sowie β -TCP) stimmte die mittels μ CT bestimmte quantitative Knochenmenge mit der Bewertung über semiquantitative Scoringschemata der histologischen Querschnitte überein. Zwar waren einzelne Trabekel zu jedem Zeitpunkt im *ex vivo*- μ CT in der äußeren Ringhälfte der LAE442-Scaffolds sichtbar, jedoch waren im zentralen Abschnitt der porösen LAE442-Zylinder lediglich einzelne, kleine Knochenfragmente vorzufinden. Deren schollen- oder inselartige Form glich optisch den Darstellungen von Lalk et al. (2013) und die Fragmente waren mittig und unverzweigt innerhalb der Poren positioniert. In den Poren von p400 und p500 wurde durch die μ CT als auch histologisch signifikant weniger ausmineralisierter Knochen vorgefunden als innerhalb der β -TCP-Scaffolds. Der Mengenunterschied zwischen β -TCP und LAE442 könnte auf die bedeutend schnellere Resorption von β -TCP zurückgeführt werden. Auch Cao und Kuboyama (2010) beobachteten, dass neuer Knochen innerhalb langsam bioabsorbierender, poröser HA-Scaffolds signifikant weniger vorhanden war als innerhalb von deutlich schneller abbauenden Kompositmaterialien mit volumenkontrollierten Anteilen von β -TCP und PGA. Die Autoren hielten einen Zusammenhang zwischen der jeweils vorhandenen Knochenmassen und den sich deutlich unterscheidenden Resorptionsgeschwindigkeiten für möglich.

In den histologischen Präparaten der vorliegenden Studie wurde deutlich, dass neuer Knochen in beiden LAE442 Porengrößen ab Woche sechs vorhanden war.

Konträr zu den Knochen trabekeln der äußeren Umgebung hatte der Knochen innerhalb zumeist keinen direkten Kontakt mit der Scaffoldoberfläche. In Übereinstimmung mit Lalk et al. (2013) konnte eine hellblaue Matrix mittels der Toluidinblaufärbung sichtbar gemacht werden. Diese ähnelte Osteoid und wird demnach als OLT („*Osteoid-like tissue*“) bezeichnet. Im Gegensatz zum neuen Knochen in den Poren hatte das OLT stets breitflächigen Kontakt mit der LAE442 Oberfläche. Die Saumdicke des OLT stellte sich im Zeitverlauf breiter da und die erwähnten Knochenfragmente waren darin vereinzelt erkennbar. Osteoid besitzt laut Raina (1972) eine Dicke von etwa 20 µm. Demgegenüber war in der eigenen Untersuchung und bei Lalk et al. (2013) das ermittelte OLT um etwa das Zehnfache breiter. Lalk et al. (2013) nahmen an, dass deren hellblaue, knochenähnliche Matrix eine geringe Mineralisierung aufwies, da es im *in-vivo*- sowie im *ex-vivo*-µCT nicht knochendicht erschien. Dies deckt sich mit der eigenen Studie, denn das OLT war lediglich im histologischen Schnittbild zu erkennen. Ergänzend dazu konnte in der eigenen Untersuchung die Annahme des geringeren Mineralisierungsgrades durch weiterführende lokale EDX-Analysen der entsprechenden Areale gestützt werden. Zusammen mit am Rand aufgereihten Osteoblasten und innerhalb des OLT liegenden Osteozyten könnte dies auf ein Vorstadium von Knochen hindeuten (Lalk et al. 2013). Parfitt et al. (1987) bezeichneten Osteoid als Gewebe auf dem Weg der Mineralisierung und als eine Art „Vorläufer-Knochen“. Laut Literatur können für das Auftreten von vermehrtem Osteoid verschiedene Ursachen in Frage kommen. Ein Grund könnte in der angewandten MgF₂-Beschichtung liegen (Susheela und Jha 1983, McCormack et al. 1993, Mousny et al. 2008). So wurden bei Mäusen stimulierende Effekte des Fluorids auf Osteoblasten und eine erhöhte Osteoidproduktion samt dessen verzögerter Kalzifizierung beobachtet (Mousny et al. 2008). An Kaninchen wurde eine Proliferation von Osteoid im Trabekelnetzwerk des Beckenkammes in Verbindung mit einer über zehn Monate andauernden, oralen Natriumfluoridgabe nachgewiesen (Susheela und Jha 1983). Die Heilung und Kalzifizierung eines am proximalen Ende des Femurs gesetzten, kortikalen Defekts bei Kaninchen, in welchen PGA-Zylinder eingesetzt wurden, welche über zehn Wochen kontrolliert Natriumfluorid abgaben, wurde verzögert (McCormack et al. 1993). In der eigenen Studie wurde Fluorid lediglich in Woche sechs in der Degradationsschicht der LAE442-Scaffolds nachgewiesen. In den darauffolgenden Zeitpunkten konnte kein Fluorid mittels EDX mehr nachgewiesen werden. Ein längerfristiger Einfluss erscheint aufgrund der fehlenden Detektion

von Fluorid zu späteren Wochenzeitpunkten in der eigenen Studie unwahrscheinlich, da das OLT insbesondere in den darauffolgenden Wochen noch weiter an Dicke zunahm. Ein anderer Grund könnte im osteogenen Einfluss des Mg liegen. Dieser könnte die weitere Differenzierung von Knochenvorläuferzellen fördern und infolgedessen die Bildung von Osteoid triggern (Zreiqat et al. 2002, Revell et al. 2004, Witte et al. 2005, Witte et al. 2007). Zur Diskussion steht, dass dieser zunächst positive und proliferative Effekt dazu tendiert, sich später nachteilig auszuwirken, denn in zu großer Menge und Schnelligkeit freigesetzte Mg-Ionen können schädlich für die Zellviabilität sein (Serre et al. 1998, Wong et al. 2013, Yu et al. 2017). Deren Akkumulation an der Grenzfläche zum Wirtsgewebe, damit verbundene lokale pH-Wert Änderungen (Monfoulet et al. 2014, Yu et al. 2017) und veränderte osmotische Druckverhältnisse (Lang et al. 2007) können zu einer Herunterregulierung der Stammzelldifferenzierung zu Osteoblasten und weiter zu Osteozyten aus dem Knochenmark führen. Weiterhin sind in der Literatur eine fehlende Zelladhäsion und eine nicht ausmineralisierte Knochenmatrix beschrieben (Monfoulet et al. 2014, Yu et al. 2017). Konträr hierzu wird jedoch eine Umgebung mit hoher Ca- und Mg-Konzentration auch als gute Startbedingung für die Bildung von CaP-Präzipitaten, wie sie auch in der eigenen Studie nachgewiesen wurden, für die Osseointegration angesehen (TenHuisen und Brown 1997, Kuwahara et al. 2001, Li et al. 2004). Da ein ungestörter Sauerstoff- und Nährstofffluss und der Abtransport von Abbauprodukten für die Geweberegeneration sichergestellt werden muss (Hutmacher 2000, Hollister 2005), könnten die innerhalb der Poren verteilten Gasvakuolen den effektiven Abtransport der Mg-Ionen verhindern. Lokal vorherrschende Element-Konzentrationen beziehungsweise Verteilungen sollten in zukünftigen Studien genauer untersucht werden, um diese Frage hinreichend beantworten zu können, da auch kontroverse Meinungen seitens der Verträglichkeit von SE-Elementen (Feyerabend et al. 2010, Willbold et al. 2013) oder Aluminium (Robertson et al. 1983, El-Rahman 2003) bestehen. Wegen des sehr langsamen Abbaus von LAE442-Implantaten wurden Serum- und Organuntersuchungen durchgeführt. Systemische oder lokale Anzeichen einer toxischen oder entzündlichen Reaktion wurden bis dato nicht beobachtet (Witte et al. 2010, Rössig et al. 2015, Angrisani et al. 2016). Untersuchungen anderer Mg-basierter Implantate (Xu et al. 2007, Li et al. 2008, Zhang et al. 2009, Liu et al. 2014, Cheng et al. 2016, Diekmann et al. 2016) decken sich ebenfalls mit den Beobachtungen der eigenen Studie, denn eklatante Abwehrreaktionen durch Schmerzen oder eine verzögerte

Wundheilung blieben in allen Studien aus und histologisch waren lediglich vereinzelt neutrophile Granulozyten sichtbar.

Die biologische Aktivität von Mg birgt ein großes Potenzial für die Osteoneogenese, welches bisher nicht genügend definiert zu sein scheint (Staiger et al. 2006). Insbesondere konnte noch nicht eindeutig geklärt werden, wo sich die Grenze hinsichtlich einer förderlichen und zugleich noch verträglichen Menge an Mg befindet (Yu et al. 2017). Vergleichende Elementanalysen in der eigenen Studie durch EDX-Analysen am OLT und dem Wirtsknochen konnten lokal hohe Massengehalte an Mg im OLT und einen geringeren Mineralisierungsgrad als im Wirtsknochen aufzeigen. Der dargelegte Effekt einer unzureichenden oder verzögerten Mineralisierung kann aufgrund der bereits erläuterten lokalen Faktoren nicht vollständig ausgeschlossen werden. Die Zusammenhänge sollten weiter kritisch geprüft werden, um optimale Umgebungsbedingungen beim Materialabbau von Mg-Legierungen an der Grenzfläche festlegen zu können. Die Frage, ob sich aus dem OLT reifer Knochen entwickelt, konnte in der vorliegenden Studie nicht abschließend geklärt werden, obwohl die gewählte Studiendauer, mit Bezug auf die Untersuchung von Lalk et al. (2013), sogar auf 36 Wochen verlängert wurde.

Blutgefäße waren in der eigenen Untersuchung besonders regelmäßig in zentralen Bereichen der β -TCP Keramik vorzufinden und häufiger gegenüber LAE442 p400 vorhanden, wohingegen der Unterschied von β -TCP zu LAE442 p500 schwächer ausgeprägt war. Arbeitsgruppen um Kuboki et al. (2002) und Klenke et al. (2008) erkannten eine Wechselbeziehung von zunehmender Porengröße und einer ausgeprägteren Vaskularisation und Osteoneogenese. Eine bessere vaskuläre Versorgungssituation innerhalb größer werdenden Porenspektren im Vergleich zu den kleineren Alternativen wurde auch von weiteren Autoren, unabhängig vom verwendeten Biomaterial, beschrieben (Klenke et al. 2008, Feng et al. 2011, Lalk et al. 2013, Cheng et al. 2016). Die analysierten Porengrößen erstreckten sich dabei entweder auf ein weites Spektrum von 50 bis 280 μm (Klenke et al. 2008), beziehungsweise 300 bis 700 μm (Feng et al. 2011), oder die untersuchten Porengrößenmodelle wiesen deutlichere Unterschiede in ihrem Durchmesser von weit mehr als 100 μm zueinander auf (Lalk et al. 2013, Cheng et al. 2016). Dagegen konnte in der eigenen Arbeit nur eine signifikant höhere Vaskularisation bei p500 gegenüber p400 in Woche sechs den Trend einer deutlicheren Gefäßeinsprossung bestätigen. Da in der Literatur auch Studien vorliegen, die über keine wesentlichen

Auswirkungen seitens der Vaskularisation bei unterschiedlichen Porengrößen berichten (Ayers et al. 1999, Fisher et al. 2002, Kujala et al. 2003), muss in Betracht gezogen werden, dass der Größenunterschied in der eigenen Studie zwischen LAE442 p400 und p500 mit 100 µm womöglich nicht groß genug war, um für Fragestellungen über die Vaskularisation oder der Osteoneogenese markantere Unterschiede zu erhalten. Es bleibt zukünftigen Vergleichsstudien über Knochenersatzmaterial aus LAE442 überlassen zu untersuchen, inwiefern ein größerer Unterscheid in den Porengrößen womöglich deutlichere Effekte nach sich ziehen würde.

In der vorliegenden Studie stützen die deutlicheren Mengen an Fibrozyten zusammen mit der insgesamt schwächer ausgeprägten Vaskularisation in den histologischen Querschnitten die Annahme, dass bei p400 eine geringe Sauerstoffversorgung die Bildung von mesenchymalem Fasergewebe fördert und eine Differenzierung zu reifem Knochen in den entsprechenden Bereichen ausbleibt, wie dies auch von Muschler et al. (2004) beschrieben wird. Dies deckt sich mit Studien anderer Knochenersatzmaterialien auf Mg-Basis mit Poren zwischen 100 und 400 µm (Lalk et al. 2013, Cheng et al. 2016) aber auch mit einer Studie über Keramiken, in der Poren zwischen 300 und 700 µm eingesetzt wurden, konnte ein erhöhter Anteil an fibrösem Gewebe mit kleiner werdender Porengröße beobachtet werden (Feng et al. 2011). Die fehlende Bildung einer fibrösen Kapsel gilt im Allgemeinen als förderlich für den Kontakt zwischen Knochen und Scaffold (Anselme 2000, Nuss und von Rechenberg 2008, Mavrogenis et al. 2009). In der vorliegenden Studiendauer über 36 Wochen deutet dies auf eine gute Langzeit-Biokompatibilität der homogen und langsam resorbierbaren LAE442-Scaffolds hin, wie es auch Studien mit soliden LAE442-Pins bereits beschrieben haben (Hampp et al. 2013, Rössig et al. 2015, Angrisani et al. 2016). Da bei der Degradation eine gewisse Menge an Makrophagen und Fremdkörperriesenzellen als Reaktion ebenfalls bei anderen Mg-Legierungen (Huehnerschulte et al. 2012, Dziuba et al. 2013) oder Biomaterialien nicht-metallischen Ursprungs präsent sind (Bergsma et al. 1993, Hofmann et al. 2013, Uebersax et al. 2013), können diese auch als physiologische Reaktion auf biologisch langsam abbaubare Biomaterialien interpretiert werden, sofern deren Bestand nicht überhandnimmt (Lassus et al. 1998, Anderson 2001, Anderson 2004, Nuss und von Rechenberg 2008). Die Kombination aus einer persistierenden Entzündung, welche durch das Vorliegen

von Lymphozyten, Plasmazellen und neutrophilen Granulozyten sowie einer dicken, fibrösen Kapsel gekennzeichnet ist, wird als Zeichen dafür gesehen, dass ein Material nicht biokompatibel ist (Anderson 2001, Nuss und von Rechenberg 2008). Diese Bedingungen lagen in der eigenen Studie bei keinem Material vor. Jedoch konnte ein geringes Vorkommen von Makrophagen und Fremdkörperriesenzellen auch bei den LAE442-Scaffolds während der Untersuchungsdauer nachgewiesen werden. Angrisani et al. (2016) konnten ebenfalls in ihrer Studie zu intramedullär implantierten LAE442-Pins im Kaninchenmodell nach 3,5 Jahren noch immer Makrophagen und Fremdkörperriesenzellen im Bereich ihrer Mg-Implantate nachweisen. Die Autoren führten dies auf den noch immerwährenden Abbau zur stetigen Entfernung von Korrosionsprodukten zurück und beschrieben das Ausmaß der zellulären Reaktion unter den gegebenen Umständen als akzeptabel.

V. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, inwiefern unterschiedliche Porengrößen in der Magnesiumlegierung LAE442 eine Auswirkung auf die ablaufende *in-vivo*-Degradation, die Biokompatibilität und das Einwuchsverhalten des umgebenden Gewebes in das Knochenersatzmaterial haben. Es sollte ermittelt werden, ob sich eine der beiden Porengrößen als die geeignetere Variante herausstellt und eine erfolgreichere Osseointegration und Biokompatibilität mit dem Wirtsgewebe aufweist.

Es wurden zylindrische Scaffolds (\varnothing : 4 mm, Länge: 5 mm) aus der Mg-Legierung LAE442 mit homogen verteilten Poren in den Größen 400 μm (LAE442 p400, $n = 40$) und 500 μm (LAE442 p500, $n = 40$) hergestellt und mit einer Beschichtung aus Magnesiumfluorid überzogen. Eine poröse β -Tricalciumphosphat-Keramik (β -TCP, $n = 40$) diente als Kontrolle. Die porösen Zylinder wurden randomisiert in den spongiösen Anteil des *Trochanter majors* beider Femora von 60 Kaninchen implantiert und für jeweils 6, 12, 24 und 36 Wochen dort belassen. Die *in-vivo*-Untersuchungen beinhalteten regelmäßige klinische Untersuchungen, Röntgenaufnahmen und μCT Aufnahmen der Implantationsstelle. Nach den jeweiligen Untersuchungszeiten wurden die Kaninchen euthanasiert und der Knochen-Implantat-Verbund mittels hochauflösendem μCT sowie histologisch mittels Trendünnschliff-Technik nach Donath mit der Toluidinblaufärbung untersucht. Bevor die Präparate gefärbt wurden, wurden lokal ergänzende SEM/EDX Analysen angefertigt, um topographische Informationen sowie Auskünfte über Elementverteilungen zu erhalten. Die *in-vivo*-Methoden waren gut auf die peri-implantäre Umgebung anwendbar und ermöglichen, einen Gesamteindruck über das Knochen-Scaffold-Gefüge zu erhalten sowie die Degradationsgeschwindigkeit und die Entwicklung des trabekulären Knochengeflechts zu verfolgen. Die *ex-vivo*-Methoden lieferten ergänzende Informationen betreffend des einwachsenden Gewebes und konnten dies auch innerhalb der Poren wesentlich differenzierter darstellen.

Klinisch wurden alle Scaffolds gut vertragen. LAE442 p400 und p500 entwickelten *in vivo* eine unbedenkliche und auf die Implantationsstelle begrenzte Menge an Gas, welche ab Woche 20 für beide Porengrößen peri-implantär abnahm. Die peri-implantär ermittelten knöchernen Werte von p500 befanden sich stets nahe derer von β -TCP und physiologischer Kaninchenspongiosa, was auf eine positive

Entwicklungstendenz und auf eine bessere Osseointegration der LAE442 Scaffolds mit den größeren Poren in dieser Arbeit hindeutet. Dagegen stagnierten die Werte von p400 oder zeigten bezüglich des Knochenvolumens und der Trabekelanzahl leicht abfallende Tendenzen. LAE442 p500 konnte peri-implantär deutlicher als osteokonduktive Leitstruktur überzeugen.

Nach 36 Wochen zeigten p400 und p500 Volumenreduktionen im *in-vivo*- μ CT / *ex-vivo*- μ CT von 15,9% / 9,9% und 11,1% / 7,5%, während β -TCP 74,6% / 78,5% seines ursprünglichen Volumens verlor und sich signifikant schneller und inhomogener abbaute. Bei p400 verblieben auch zu späten Wochenzeitpunkten deutlichere Gasmengen in den Poren, während innerhalb p500 nur kleinere Bläschen erkennbar waren. Im *ex-vivo*- μ CT sowie im SEM fiel p400 durch Lochfraßkorrosion und größere Material-Abspaltungen auf, was die zuvor für p400 höhere *in-vivo*-Korrosionsrate gegenüber p500 erklären könnte. β -TCP wies in den Poren signifikant mehr vernetzten neuen Knochen gegenüber beiden LAE442 Porenmodellen auf. Kleinere, unvernetzte Knochenareale wurden bei p400 und p500 vorgefunden. Einzelne Scaffolds von p500 wiesen auch im Zentrum kleine Knochenareale auf. Weitere Unterschiede waren seitens einer initial gleichmäßigeren Gefäßversorgung bei p500 und einer erhöhten Fibrozytenmenge bei p400 zu einzelnen Zeitpunkten vorhanden. Gasvakuolen, Granulationsgewebe mit Blutgefäßen und eine breitflächige, gering mineralisierte Knochenmatrix, welche in beiden Porengrößen der LAE442-Scaffolds in Kontakt zur Mg-Legierung stand, waren mittels Histologie und lokalen EDX Messungen differenzierbar. Makrophagen und Fremdkörperriesenzellen waren jeweils im physiologischen Ausmaß vorhanden.

Dezente intraporösen Unterschiede zusammen mit der erhöhten Gasretention innerhalb von p400 verstärken die Notwendigkeit zukünftiger Untersuchungen hinsichtlich der Auswirkungen größer gewählter Porendurchmesser. Die Arbeit gibt Anlass weiterzuerfolgen, inwiefern Durchmesser über 500 μ m oder länger widerstandsfähigere Beschichtungen einen effektiveren Abtransport von Abbauprodukten und Gas gewährleisten können, um die Knochenmatrix ausreifen lassen zu können.

VI. SUMMARY

The aim of this study was to investigate the influence of two different pore sizes in scaffolds of the Mg alloy LAE442 on the *in vivo* degradation, biocompatibility, and ingrowth of the surrounding tissue into the bone substitute. Additionally, the study investigated whether one of the pore size models demonstrated a more pronounced osseointegration and tissue proliferation together with being biocompatible with the host tissue.

Cylindrical scaffolds (\varnothing : 4 mm, length: 5 mm) were produced from the Mg alloy LAE442 with homogeneously distributed pore sizes of 400 μm (LAE442 p400, $n = 40$) and 500 μm (LAE442 p500, $n = 40$). Additionally, the scaffolds were coated with a protective layer of magnesium fluoride and were implanted into the cancellous part of the greater trochanter of both femora of rabbits. Porous β -tricalcium phosphate ceramic (β -TCP, $n = 40$) served as control. The porous cylinders were randomly implanted into the cancellous part of the greater trochanter of both femora of 60 rabbits and remained for 6, 12, 24 and 36 weeks respectively. The *in vivo* examinations included regular clinical examinations, radiographs and *in vivo* μCT scans of the implantation site. After the respective examination periods, the rabbits were euthanised and the bone-implant compound was examined using high-resolution- μCT and histology, based on the cutting and grinding technique according to Donath with toluidine blue staining. Before the samples were stained, supplementary SEM/EDX analyses were performed locally to obtain topographical information and element distributions. The *in vivo* methods were well applicable to the peri-implant environment to get an overall impression of the bone-scaffold interface and to observe the degradation rate and the formation of the trabecular meshwork. The *ex vivo* methods provided supplementary information regarding the ingrowing tissue and were also able showing the existing tissue in a much more differentiated way, even within the pores.

All scaffolds were clinically well tolerated. LAE442 p400 and p500 showed clinically uncritical gas releases due to Mg-associated *in vivo* corrosion. The amount of gas decreased in the peri-implant surroundings from week 20 onwards for both pore sizes. In the present study, peri-implant bone parameters of p500 were always close to those of β -TCP and cancellous bone of healthy rabbits. They were indicating a positive developmental trend and better osseointegration behaviour. In contrast, the values of p400 stagnated or showed slightly decreasing tendencies

regarding bone volume and trabecular number. In our study, LAE442 p500 was more convincing as an osteoconductive matrix on the peri-implant site. After the implantation period of 36 weeks, p400 and p500 showed gas volume reductions in the *in vivo* μ CT / *ex vivo* μ CT of 15, 9% / 9,9% and 11,1% / 7, 5%, respectively, while β -TCP lost 74,6% / 78,5% of its initial volume and degraded significantly faster and more inhomogeneously. In p400, more significant amounts of gas remained in the pores even at later times, whereas within p500 only smaller bubbles were detectable. In the *ex vivo* μ CT as well as SEM, p400 was evident by pitting corrosion and larger material detachments, which could explain the previously higher *in vivo* corrosion rate for p400 compared to p500. β -TCP showed significantly more branched bone structures in the centre of the pores compared to both LAE442 pore size models, which showed smaller unbranched bone areas. A single number of p500 scaffolds exhibited small bone areas in their centre, too. Further differences between pore sizes could only be detected at individual time points. LAE442 p500 demonstrated an initially higher and more uniform vascularization, while p400 showed an increased amount of fibrocytes. Furthermore, gas vacuoles, granulation tissue with blood vessels, and a broad but low mineralised bone matrix next to both LAE442-scaffolds were detectable in histology and local EDX measurements. Physiological levels of macrophages and foreign body giant cells were present.

Slight intraporous differences paired with increased gas retention within p400 confirm the need for future investigations regarding the effects of larger than the chosen pore diameters. The study also gives reason to further investigate whether pore diameters larger than 500 μ m or more resilient coatings would promote an increased ingrowth of blood vessels and cellular tissue. In this context, it would be interesting if they would also provide a more effective removal of degradation products and gas from the LAE442-scaffold centre as well. This could result in improved maturation of the bone matrix.

VII. LITERATURVERZEICHNIS**Agrawal CM**

Reconstructing the human body using biomaterials.
JOM. 1998; 50(1): 31-35

Albrektsson T, Brånemark PI, Hansson HA, Lindström J

Osseointegrated Titanium Implants: Requirements for Ensuring a Long-Lasting, Direct Bone-to-Implant Anchorage in Man.
Acta Orthopaedica Scandinavica. 1981; 52(2): 155-170

Alexander JM, Bab I, Fish S, Müller R, Uchiyama T, Gronowicz G, Nahounou M, Zhao Q, White DW, Chorev M, Gazit D, Rosenblatt M

Human Parathyroid Hormone 1–34 Reverses Bone Loss in Ovariectomized Mice.
Journal of Bone and Mineral Research. 2001; 16(9): 1665-1673

Alvarez K, Nakajima H

Metallic scaffolds for bone regeneration.
Materials. 2009; 2(3): 790-832

An YH, Martin KL

Handbook of Histology Methods for Bone and Cartilage.
Totowa, NJ, Humana Press Inc., 2003

Anderson JM

Biological Responses to Materials.
Annual Review of Materials Research. 2001; 31(1): 81-110

Anderson JM

Biomaterials Science: Inflammation, wound healing, and the foreign-body response.
In Ratner B, Hoffmann A, Schoen FJ and Lemons JE: Biomaterials Science, San Diego, Elsevier, 2004

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 Biomaterialia. 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 Waldemar AM: New Features on Magnesium Alloys, 2012

Anselme K

Osteoblast adhesion on biomaterials.
Biomaterials. 2000; 21(7): 667-681

Augat P, Simon U, Liedert A, Claes L

Mechanics and mechano-biology of fracture healing in normal and osteoporotic bone.
Osteoporosis International. 2005; 16(2): 36-43

Ayers RA, Simske SJ, Bateman TA, Petkus A, Sachdeva RLC, Gyunter VE

Effect of nitinol implant porosity on cranial bone ingrowth and apposition after 6 weeks.
Journal of Biomedical Materials Research. 1999; 45(1): 42-47

Ballanti P, Minisola S, Pacitti MT, Scarnecchia L, Rosso R, Mazzuoli GF, Bonucci E

Tartrate-resistant acid phosphate activity as osteoclastic marker: Sensitivity of cytochemical assessment and serum assay in comparison with standardized osteoclast histomorphometry.

Osteoporosis International. 1997; 7(1): 39-43

Balto K, Muller R, Carrington DC, Dobeck J, Stashenko P

Quantification of Periapical Bone Destruction in Mice by Micro-computed Tomography. Journal of Dental Research. 2000; 79(1): 35-40

Barbas A, Bonnet AS, Lipinski P, Pesci R, Dubois G

Development and mechanical characterization of porous titanium bone substitutes. Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials. 2012; 9: 34-44

Barbier A, Martel C, de Vernejoul MC, Tirode F, Nys M, Mocaer G, Morieux C, Murakami H, Lacheretz F

The visualization and evaluation of bone architecture in the rat using three-dimensional X-Ray microcomputed tomography.

Journal of Bone and Mineral Metabolism. 1999; 17(1): 37-44

Bennett SM, Arumugam M, Wilberforce S, Enea D, Rushton N, Zhang XC, Best SM, Cameron RE, Brooks RA

The effect of particle size on the in vivo degradation of poly(d,l-lactide-co-glycolide)/ α -tricalcium phosphate micro- and nanocomposites.

Acta Biomaterialia. 2016; 45: 340-348

Bergsma EJ, Rozema FR, Bos RRM, de Bruijn WC

Foreign body reactions to resorbable poly(l-lactide) bone plates and screws used for the fixation of unstable zygomatic fractures.

Journal of Oral and Maxillofacial Surgery. 1993; 51(6): 666-670

Bergsma JE, de Bruijn WC, Rozema FR, Bos RRM, Boering G

Late degradation tissue response to poly (L-lactide) bone plates and screws.

Biomaterials. 1995; 16(1): 25-31

Bernhardt R, Scharnweber D, Müller B, Thurner P, Schliephake H, Wyss P, Beckmann F, Goebbels J, Worch H

Comparison of microfocus- and synchrotron X-ray tomography for the analysis of osteointegration around Ti6Al4V-implants.

European Cells and Materials. 2004; 7: 42-51

Bockholdt B

Morphologische und histomorphometrische Untersuchungen der Aortenwand in einem Vergleichskollektiv und in Todesfällen durch spontane (nicht traumatische und nicht arteriosklerotische) Aortenruptur unter Berücksichtigung forensisch relevanter Fragestellungen.

Berlin, Medizinische Fakultät Charité, Habil.-Schr., 2005

Bohner M

Calcium orthophosphates in medicine: from ceramics to calcium phosphate cements. Injury. 2000; 31 Suppl 4: 37-47

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

Comparison of morphological changes in efferent lymph nodes after implantation of resorbable and non-resorbable implants in rabbits.

BioMedical Engineering OnLine. 2011; 10(1): 32

Bonetta M

Einfluss des Bohrmehls auf die Kallusbildung bei Tibiadefekten: eine histomorphologische Untersuchung an der Schafstibia.
Freiburg, Albert-Ludwigs-Universität, Medizinische Fakultät, Diss., 2006

Bonfield W

Designing porous scaffolds for tissue engineering.
Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences. 2006; 364(1838): 227-232

Böstman OM, Pihlajamäki HK

Adverse Tissue Reactions to Bioabsorbable Fixation Devices.
Clinical Orthopaedics and Related Research®. 2000; 371: 216-227

Bouxsein ML, Boyd SK, Christiansen BA, Guldberg RE, Jepsen KJ, Müller R

Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography.
Journal of Bone and Mineral Research. 2010; 25(7): 1468-1486

Bouxsein ML, Myers KS, Shultz KL, Donahue LR, Rosen CJ, Beamer WG

Ovariectomy-Induced Bone Loss Varies Among Inbred Strains of Mice.
Journal of Bone and Mineral Research. 2005; 20(7): 1085-1092

Boyd SK, Moser S, Kuhn M, Klinck RJ, Krauze PL, Müller R, Gasser JA

Evaluation of Three-dimensional Image Registration Methodologies for In Vivo Micro-computed Tomography.
Annals of Biomedical Engineering. 2006; 34(10): 1587-1599

Braatz F

Auffüllung von Knochendefekten mit bioresorbierbaren Implantatmaterialien.
In Peters KM and König DP: Fortbildung Osteologie 1, Darmstadt, Steinkopff, 2006

Brånemark PI, Hansson BO, Adell R, Breine U, Lindström J, Hallén O, Ohman A

Osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. Experience from a 10-year period.
Scand J Plast Reconstr Surg Suppl. 1977; 16: 1-132

Burr DB

Targeted and nontargeted remodeling.
Bone 2002; 30(1): 2-4

Cao H, Kuboyama N

A biodegradable porous composite scaffold of PGA/beta-TCP for bone tissue engineering.
Bone. 2010; 46(2): 386-395

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.
Scientific Reports. 2016; 6(1): 24134

Chu TMG, Orton DG, Hollister SJ, Feinberg SE, Halloran JW

Mechanical and in vivo performance of hydroxyapatite implants with controlled architectures.
Biomaterials. 2002; 23(5): 1283-1293

Claes L, Eckert-Hübner K, Augat P

The effect of mechanical stability on local vascularization and tissue differentiation in callus healing.

Journal of Orthopaedic Research. 2002; 20(5): 1099-1105

Claes L, Wolf S, Augat P

Mechanische Einflüsse auf die Callusheilung.

Der Chirurg. 2000; 71(9): 989-994

Claes LE

Mechanical characterization of biodegradable implants.

Clinical Materials. 1992; 10(1): 41-46

Clarke B

Normal Bone Anatomy and Physiology.

Clinical Journal of the American Society of Nephrology. 2008; 3(Supplement 3): 131-139

Cohen DJ, Cheng A, Sahingur K, Clohessy RM, Hopkins LB, Boyan BD, Schwartz Z

Performance of laser sintered Ti-6Al-4V implants with bone-inspired porosity and micro/nanoscale surface roughness in the rabbit femur.

Biomedical Materials. 2017; 12(2): 025021

Damien CJ, Parsons JR

Bone graft and bone graft substitutes: a review of current technology and applications.

Journal of Applied Biomaterials. 1991; 2(3): 187-208

Danckwardt-Lillieström G

Reaming of the medullary cavity and its effect on diaphyseal bone: a fluorochromic, microangiographic and histologic study on the rabbit tibia and dog femur.

Acta Orthopaedica Scandinavica. 1969; Suppl.(128): 1-165

Day JS, Ding M, Bednarz P, van der Linden JC, Mashiba T, Hirano T, Johnston CC, Burr DB, Hvid I, Sumner DR, Weinans H

Bisphosphonate treatment affects trabecular bone apparent modulus through micro-architecture rather than matrix properties.

Journal of Orthopaedic Research. 2004; 22(3): 465-471

de Bruijn JD, van Blitterswijk CA, Davies JE

Initial bone matrix formation at the hydroxyapatite interface in vivo.

Journal of Biomedical Materials Research. 1995; 29(1): 89-99

Dempster D

Bone modeling and remodeling.

In Dempster D, Felsenberg D and van der Geest S: The bone quality book: a guide to factors influencing bone strength, Amsterdam, Netherlands, Excerpta Medica, 2006

Diekmann J, Bauer S, Weizbauer A, Willbold E, Windhagen H, Helmecke P, Lucas A, Reifenrath J, Nolte I, Ezechieli M

Examination of a biodegradable magnesium screw for the reconstruction of the anterior cruciate ligament: A pilot in vivo study in rabbits.

Materials Science and Engineering: C. 2016; 59: 1100-1109

Ding M, Odgaard A, Hvid I

Changes in the three-dimensional microstructure of human tibial cancellous bone in early osteoarthritis.

The Journal of Bone and Joint Surgery. British volume. 2003; 85(6): 906-912

Dobnig H, Turner RT

Evidence that intermittent treatment with parathyroid hormone increases bone formation in adult rats by activation of bone lining cells.
Endocrinology. 1995; 136(8): 3632-3638

Donath K

Die Trenn-Dünnschliff-Technik zur Herstellung histologischer Präparate von nicht schneidbaren Geweben und Materialien.
Der Präparator. 1988; 34: 197-206

Donath K, Breuner G

A method for the study of undecalcified bones and teeth with attached soft tissues*.
Journal of Oral Pathology & Medicine. 1982; 11(4): 318-326

Draenert K, Wiese FG, Garde U, Draenert Y, Helber U, Börner M

Synthetische Knochenersatzwerkstoffe auf HA- und TCP-Basis.
Trauma und Berufskrankheit. 2001; 3(4): 293-300

Ducheyne P, Hench LL, Kagan II A, Martens M, Bursens A, Mulier JC

Effect of hydroxyapatite impregnation on skeletal bonding of porous coated implants.
Journal of Biomedical Materials Research. 1980; 14(3): 225-237

Ducheyne P, Radin S, Heughebaert M, Heughebaert JC

Calcium phosphate ceramic coatings on porous titanium: effect of structure and composition on electrophoretic deposition, vacuum sintering and in vitro dissolution.
Biomaterials. 1990; 11(4): 244-254

Dumic-Cule I, Pecina M, Jelic M, Jankolija M, Popek I, Grgurevic L, Vukicevic S

Biological aspects of segmental bone defects management.
International Orthopaedics. 2015; 39(5): 1005-1011

Duvall CL, Taylor WR, Weiss D, Wojtowicz AM, Guldborg RE

Impaired Angiogenesis, Early Callus Formation, and Late Stage Remodeling in Fracture Healing of Osteopontin-Deficient Mice.
Journal of Bone and Mineral Research. 2007; 22(2): 286-297

Dziuba D, Meyer-Lindenberg A, Seitz JM, Waizy H, Angrisani N, Reifenrath J

Long-term in vivo degradation behaviour and biocompatibility of the magnesium alloy ZEK100 for use as a biodegradable bone implant.
Acta Biomaterialia. 2013; 9(10): 8548-8560

Einhorn TA

Enhancement of fracture-healing.
The Journal of Bone and Joint Surgery. American volume. 1995; 77(6): 940-956

Einhorn TA

Breakout Session 1: Definitions of Fracture Repair.
Clinical Orthopaedics and Related Research (1976-2007). 1998; 355: S353

El-Rahman SSA

Neuropathology of aluminum toxicity in rats (glutamate and GABA impairment).
Pharmacological Research. 2003; 47(3): 189-194

Engelke K, Karolczak M, Lutz A, Seibert U, Schaller S, Kalender W

Micro-CT. Technology and application for assessing bone structure.
Der Radiologe. 1999; 39(3): 203-212

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 Biomaterialia. 2011; 7(3): 1421-1428

Eriksen EF

Normal and pathological remodeling of human trabecular bone: three dimensional reconstruction of the remodeling sequence in normals and in metabolic bone disease.

Endocr Rev. 1986; 7(4): 379-408

Feldkamp LA, Goldstein SA, Parfitt AM, Jasion G, Kleerekoper M

The direct examination of three-dimensional bone architecture in vitro by computed tomography.

Journal of Bone and Mineral Research. 1989; 4(1): 3-11

Feng B, Jinkang Z, Zhen W, Jianxi L, Jiang C, Jian L, Guolin M, Xin D

The effect of pore size on tissue ingrowth and neovascularization in porous bioceramics of controlled architecture in vivo.

Biomedical Materials. 2011; 6(1): 015007

Feyerabend F, Fischer J, Holtz J, Witte F, Willumeit R, Drücker H, Vogt C, Hort N

Evaluation of short-term effects of rare earth and other elements used in magnesium alloys on primary cells and cell lines.

Acta Biomaterialia. 2010; 6(5): 1834-1842

Fisher JP, Vehof JW, Dean D, van der Waerden JPC, Holland TA, Mikos AG, Jansen JA

Soft and hard tissue response to photocrosslinked poly (propylene fumarate) scaffolds in a rabbit model.

Journal of Biomedical Materials Research. 2002; 59(3): 547-556

Frosch KH, Barvencik F, Lohmann CH, Viereck V, Siggelkow H, Breme J, Dresing K, Stürmer KM

Migration, Matrix Production and Lamellar Bone Formation of Human Osteoblast-Like Cells in Porous Titanium Implants.

Cells Tissues Organs. 2002; 170(4): 214-227

Fujisawa A, Shimotoso T, Masuda S, Makinouchi K

The development of Zirconia ball for THR with a high mechanical strength, low phase transformation.

In Kokubo T, Nakamura T and Miyaji F: Bioceramics 9, Amsterdam, Elsevier Science Publ., 1996

Galois L, Mainard D

Bone ingrowth into two porous ceramics with different pore sizes: an experimental study.

Acta Orthop Belg. 2004; 70(6): 598-603

Garcia-Sanz A, Rodriguez-Barbero A, Bentley MD, Ritman EL, Romero JC

Three-Dimensional Microcomputed Tomography of Renal Vasculature in Rats.

Hypertension. 1998; 31(1): 440-444

Gardner MJ, Ricciardi BF, Wright TM, Bostrom MP, van der Meulen MCH

Pause Insertions During Cyclic In Vivo Loading Affect Bone Healing.

Clinical Orthopaedics and Related Research. 2008; 466(5): 1232-1238

Gauthier O, Bouler JM, Aguado E, Pilet P, Daculsi G

Macroporous biphasic calcium phosphate ceramics: influence of macropore diameter and macroporosity percentage on bone ingrowth.

Biomaterials. 1998; 19(1-3): 133-139

Gerlach KL

Resorbierbare Polymere als Osteosynthesematerialien.
Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie. 2000; 4(1): 91-102

Gogolewski S

Resorbable polymers for internal fixation.
Clinical Materials. 1992; 10(1): 13-20

Gogolewski S

Bioresorbable polymers in trauma and bone surgery.
Injury. 2000; 31: 28-32

Goodman SB

Wear particles, periprosthetic osteolysis and the immune system.
Biomaterials. 2007; 28(34): 5044-5048

Groeneveld EHJ, van den Bergh JPA, Holzmann P, ten Bruggenkate CM, Tuinzing DB, Burger EH

Mineralization processes in demineralized bone matrix grafts in human maxillary sinus floor elevations.
Journal of Biomedical Materials Research. 1999; 48(4): 393-402

Groves EWH

An experimental study of the operative treatment of fractures.
British Journal of Surgery. 1913; 1(3): 438-501

Grün NG, Donohue N, Holweg P, Weinberg A-M

Resorbierbare Implantate in der Unfallchirurgie.
Journal für Mineralstoffwechsel & Muskuloskelettale Erkrankungen. 2018; 25(3): 82-89

Gu Y, Chen C-f, Bandopadhyay S, Ning C, Zhang Y, Guo Y

Corrosion mechanism and model of pulsed DC microarc oxidation treated AZ31 alloy in simulated body fluid.
Applied Surface Science. 2012; 258(16): 6116-6126

Guild F, Bonfield W

Predictive modelling of the mechanical properties and failure processes in hydroxyapatite-polyethylene (Hapex™) composite.
Journal of Materials Science: Materials in Medicine. 1998; 9(9): 497-502

Hallab NJ, Jacobs JJ

Biologic effects of implant debris.
Bulletin of the NYU Hospital for Joint Diseases. 2009; 67(2): 182-188

Hammer F

Vergleich von Nd: YAG Laserkürettage und konventioneller Wurzelreinigung bezüglich histologischer und morphologischer Veränderungen; eine in vivo Studie. Marburg, Philipps-Universität Marburg a.d. Lahn, Medizinisches Zentrum für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde, Diss., 1997

Hampp C, Angrisani N, Reifenrath J, Bormann D, Seitz J-M, 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.
Materials Science and Engineering: C. 2013; 33(1): 317-326

Hankenson KD, Hormuzdi SG, Meganck JA, Bornstein P

Mice with a Disruption of the Thrombospondin 3 Gene Differ in Geometric and Biomechanical Properties of Bone and Have Accelerated Development of the Femoral Head.
Molecular and Cellular Biology. 2005; 25(13): 5599-5606

Hannink G, Arts JJC

Bioresorbability, porosity and mechanical strength of bone substitutes: What is optimal for bone regeneration?

Injury. 2011; 42: 22-25

Hench LL

Bioceramics: From Concept to Clinic. Journal of the American Ceramic Society. 1991; 74(7): 1487-1510

Hench LL, Andersson Ö

Bioactive glasses.

In Hench LL and Wilson J: An introduction to bioceramics, Singapore, World scientific Publishing Co. Pte. Ltd., 1993

Hench LL, Polak JM

Third-Generation Biomedical Materials.

Science. 2002; 295(5557): 1014-1017

Herrmann JB, Kelly RJ, Higgins GA

Polyglycolic Acid Sutures: Laboratory and Clinical Evaluation of a New Absorbable Suture Material.

Archives of Surgery. 1970; 100(4): 486-490

Heublein B, Rohde R, Kaese V, Niemeyer M, Hartung W, Haverich A

Biocorrosion of magnesium alloys: a new principle in cardiovascular implant technology?

Heart. 2003; 89(6): 651-656

Hillam RA, Skerry TM

Inhibition of bone resorption and stimulation of formation by mechanical loading of the modeling rat ulna in vivo.

Journal of Bone and Mineral Research. 1995; 10(5): 683-689

Hing KA

Bone repair in the twenty-first century: biology, chemistry or engineering?

Philosophical Transactions of the Royal Society A. 2004; 362(1825): 2821-2850

Hing KA, Best SM, Bonfield W

Characterization of porous hydroxyapatite.

Journal of Materials Science: Materials in Medicine. 1999; 10(3): 135-145

Hofmann GO

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

Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery. 1995; 114(3): 123-132

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

Remodeling of tissue-engineered bone structures in vivo.

European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics. 2013; 85(1): 119-129

Holdsworth D, Thornton M

Micro-CT in small animal and specimen imaging.

Trends in Biotechnology. 2002; 20(8. Suppl.): 34-39

Hollister SJ

Porous scaffold design for tissue engineering.

Nature Materials. 2005; 4(7): 518-524

Holmes JM, Beebe RA

Surface areas by gas adsorption on amorphous calcium phosphate and crystalline hydroxyapatite.

Calcified Tissue Research. 1971; 7(1): 163-174

Horch HH, Sader R, Kolk A

Synthetische, phasenreine Beta-Tricalciumphosphat-Keramik (Cerasorb) zur Knochenregeneration bei der rekonstruktiven Chirurgie der Kiefer-Eine klinische Langzeitstudie mit Literaturübersicht.

Deutsche Zahnärztliche Zeitschrift. 2004; 59(12): 680-686

Hu JH, Ding M, Søballe K, Bechtold JE, Danielsen CC, Day JS, Hvid I

Effects of short-term alendronate treatment on the three-dimensional microstructural, physical, and mechanical properties of dog trabecular bone.

Bone. 2002; 31(5): 591-597

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.

BioMedical Engineering OnLine. 2012; 11(1): 14

Hulbert SF, Young FA, Mathews RS, Klawitter JJ, Talbert CD, Stelling FH

Potential of ceramic materials as permanently implantable skeletal prostheses.

Journal of Biomedical Materials Research. 1970; 4(3): 433-456

Hulth A

Current concepts of fracture healing.

Clin Orthop Relat Res. 1989(249): 265-284

Huse EC

A new ligature.

Chicago Med J Exam. 1878; 172(2): 11

Hutmacher DW

Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage.

Biomaterials. 2000; 21(24): 2529-2543

Isaksson H, Wilson W, van Donkelaar CC, Huiskes R, Ito K

Comparison of biophysical stimuli for mechano-regulation of tissue differentiation during fracture healing.

Journal of Biomechanics. 2006; 39(8): 1507-1516

Itälä AI, Ylänen HO, Ekholm C, Karlsson KH, Aro HT

Pore diameter of more than 100 μm is not requisite for bone ingrowth in rabbits.

Journal of Biomedical Materials Research. 2001; 58(6): 679-683

Jacobs JJ, Gilbert JL, Urban RM

Current Concepts Review - Corrosion of Metal Orthopaedic Implants.

The Journal of Bone and Joint Surgery. 1998; 80(2): 268-282

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 Biomaterialia. 2010; 6(5): 1861-1868

Jansen JA, Dhert WJA, Van Der Waerden JPCM, Von Recum AF

Semi-Quantitative and Qualitative Histologic Analysis Method for the Evaluation of Implant Biocompatibility.

Journal of Investigative Surgery. 1994; 7(2): 123-134

Jones AC, Arns CH, Sheppard AP, Hutmacher DW, Milthorpe BK, Knackstedt MA

Assessment of bone ingrowth into porous biomaterials using MICRO-CT.

Biomaterials. 2007; 28(15): 2491-2504

Jorgensen SM, Demirkaya O, Ritman EL

Three-dimensional imaging of vasculature and parenchyma in intact rodent organs with X-ray micro-CT.

American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology. 1998; 275(3): H1103-H1114

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

Development of Sponge Structure and Casting Conditions for Absorbable Magnesium Bone Implants.

In: TMS 2017 146th Annual Meeting & Exhibition Supplemental Proceedings, 2017

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.

Materials Science and Engineering: C. 2019; 98: 1073-1086

Junqueira LCU, Carneiro J

Histologie.

Berlin, Springer, 2004

Kaesel V, Tai P-T, Bach F-W, Haferkamp H, Witte F, Windhagen H

Approach to Control the Corrosion of Magnesium by Alloying.

In Kainer KU: Magnesium, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2003

Karageorgiou V, Kaplan D

Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis.

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

Keating JF, McQueen MM

SUBSTITUTES FOR AUTOLOGOUS BONE GRAFT IN ORTHOPAEDIC TRAUMA.

The Journal of Bone and Joint Surgery. British volume. 2001; 83-B(1): 3-8

Keleş A, Alcin H, Kamalak A, Versiani MA

Micro-CT evaluation of root filling quality in oval-shaped canals.

International Endodontic Journal. 2014; 47(12): 1177-1184

Kenwright J, Richardson JB, Cunningham JL, White SH, Goodship AE, Adams MA, Magnussen PA, Newman JH

Axial movement and tibial fractures. A controlled randomised trial of treatment.

The Journal of Bone and Joint Surgery. British volume. 1991; 73-B(4): 654-659

Kerr JB

Atlas of Functional Histology.

London, Tokyo, Mosby Verlag, 1999

Kiba H, Hayakawa T, Oba S, Kuwabara M, Habata I, Yamamoto H

Potential application of high-resolution microfocus X-ray techniques for observation of bone structure and bone-implant interface.

International Journal of Oral & Maxillofacial Implants. 2003; 18(2): 279-285

Kirkland N, Kolbeinsson I, Woodfield T, Dias G, Staiger M

Processing-Property Relationships of As-Cast Magnesium Foams with Controllable Architecture.

International Journal of Modern Physics B. 2009; 23: 1002-1008

Kleer-Reiter N, Julmi S, Feichtner F, Waselau AC, Klose C, Wriggers P, Maier HJ, Meyer-Lindenberg A

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

Biomedical Materials. 2021; 16(3): 035037

Kleer N, Julmi S, Gartzke AK, Augustin J, Feichtner F, Waselau AC, Klose C, Maier HJ, Wriggers P, Meyer-Lindenberg A

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

Materialia. 2019; 8: 100436

Klein K

In vivo Studie verschiedener Hydrogele mit variabler Porenstruktur im Vergleich. Zürich, Universität Zürich, Vetsuisse-Fakultät, Diss., 2008

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.

Journal of Biomedical Materials Research Part A. 2008; 85A(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.

Medical Engineering & Physics. 2008; 30(7): 888-895

Kraus T, Fischerauer SF, Hänni AC, Uggowitz PJ, Löffler JF, Weinberg AM

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

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

Krause A

Untersuchung der Degradation und Biokompatibilität von degradablen, intramedullären Implantaten auf Magnesiumbasis im Kaninchenmodell.

Hannover, tierärztl. Hochsch., Diss., 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. Journal of Materials Science. 2009; 45(3): 624-632

Kuboki Y, Jin Q, Kikuchi M, Mamood J, Takita H

Geometry of Artificial ECM: Sizes of Pores Controlling Phenotype Expression in BMP-Induced Osteogenesis and Chondrogenesis.

Connective Tissue Research. 2002; 43(2-3): 529-534

Kuhlmann J, Bartsch I, Willbold E, Schuchardt S, Holz O, Hort N, Hoche D, Heineman WR, Witte F

Fast escape of hydrogen from gas cavities around corroding magnesium implants.

Acta Biomaterialia. 2013; 9(10): 8714-8721

Kuhn JL, Goldstein SA, Feldkamp LA, Goulet RW, Jesion G

Evaluation of a microcomputed tomography system to study trabecular bone structure.

Journal of Orthopaedic Research. 1990; 8(6): 833-842

Kujala S, Ryhänen J, Danilov A, Tuukkanen J

Effect of porosity on the osteointegration and bone ingrowth of a weight-bearing nickel-titanium bone graft substitute.

Biomaterials. 2003; 24(25): 4691-4697

Kujoory MA, Hillman BJ, Barrett HH

High-Resolution Computed Tomography of the Normal Rat Nephrogram.

Investigative Radiology. 1980; 15(2): 148-154

Kundu J, Pati F, Hun Jeong Y, Cho D-W

Chapter 2 - Biomaterials for Biofabrication of 3D Tissue Scaffolds.

In Forgacs G and Sun W: Biofabrication, Boston, William Andrew Publishing, 2013

Kuwahara H, Al-Abdullat Y, Mazaki N, Tsutsumi S, Aizawa T

Precipitation of Magnesium Apatite on Pure Magnesium Surface during Immersing in Hank's Solution.

Materials Transactions. 2001; 42(7): 1317-1321

Laib A, Barou O, Vico L, Lafage-Proust MH, Alexandre C, Rügsegger P

3D micro-computed tomography of trabecular and cortical bone architecture with application to a rat model of immobilisation osteoporosis.

Medical and Biological Engineering and Computing. 2000; 38(3): 326-332

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

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

Journal of Materials Science: Materials in Medicine. 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

Technique et indication des prothèses dans le traitement des fractures.

Presse Med Belge. 1909; 17: 321-323

Lambotte A

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

Bull Mém Soc Nat Chir. 1932; 28: 1325-1334

Landis WJ

The strength of a calcified tissue depends in part on the molecular structure and organization of its constituent mineral crystals in their organic matrix.

Bone. 1995; 16(5): 533-544

Lang F, Föllner M, Lang K, Lang P, Ritter M, Vereninov A, Szabo I, Huber SM, Gulbins E

Chapter Eleven - Cell Volume Regulatory Ion Channels in Cell Proliferation and Cell Death.

In Häussinger D and Sies H: Methods in Enzymology Bd. 428, Academic Press, 2007

Lang G

Histochnik.

Wien, Springer, 2006

Lassus J, Salo J, Jiranek WA, Santavirta S, Nevalainen J, Matucci-Cerinic M, Horák P, Kontinen Y

Macrophage activation results in bone resorption.

Clinical orthopaedics and related research. 1998(352): 7-15

Layton MW, Goldstein SA, Goulet RW, Feldkamp LA, Kubinski DJ, Bole GG

Examination of subchondral bone architecture in experimental osteoarthritis by microscopic computed axial tomography.

Arthritis and Rheumatism. 1988; 31(11): 1400-1405

Lee HS, Berg JH, García-Godoy F, Jang KT

Long-term evaluation of the remineralization of interproximal caries-like lesions adjacent to glass-ionomer restorations: a micro-CT study.
Am J Dent. 2008; 21(2): 129-132

Lee JW, Han HS, Han KJ, Park J, Jeon H, Ok MR, Seok HK, Ahn JP, Lee KE, Lee DH, Yang SJ, Cho SY, Cha PR, Kwon H, Nam TH, Han JH, Rho HJ, Lee KS, Kim YC, Mantovani D

Long-term clinical study and multiscale analysis of in vivo biodegradation mechanism of Mg alloy.
Proceedings of the National Academy of Sciences. 2016; 113(3): 716-721

LeGeros RZ

Formation and transformation of calcium phosphates: relevance to vascular calcification.
Zeitschrift für Kardiologie. 2001; 90(3): 116-124

Lewis G

Properties of open-cell porous metals and alloys for orthopaedic applications.
Journal of Materials Science: Materials in Medicine. 2013; 24(10): 2293-2325

Li L, Gao J, Wang Y

Evaluation of cyto-toxicity and corrosion behavior of alkali-heat-treated magnesium in simulated body fluid.
Surface and Coatings Technology. 2004; 185: 92-98

Li Y, Hodgson PD, Wen C

The effects of calcium and yttrium additions on the microstructure, mechanical properties and biocompatibility of biodegradable magnesium alloys.
Journal of Materials Science. 2011; 46(2): 365-371

Li Z, Gu X, Lou S, Zheng Y

The development of binary Mg–Ca alloys for use as biodegradable materials within bone.
Biomaterials. 2008; 29(10): 1329-1344

Liu YJ, Yang ZY, Tan LL, Li H, Zhang YZ

An animal experimental study of porous magnesium scaffold degradation and osteogenesis.
Brazilian Journal of Medical and Biological Research. 2014; 47(8): 715-720

Lu J, Descamps M, Dejou J, Koubi G, Hardouin P, Lemaitre J, Proust J-P

The biodegradation mechanism of calcium phosphate biomaterials in bone.
Journal of Biomedical Materials Research. 2002; 63(4): 408-412

Lu X, Leng Y

Theoretical analysis of calcium phosphate precipitation in simulated body fluid.
Biomaterials. 2005; 26(10): 1097-1108

Lüllmann-Rauch R

Taschenlehrbuch Histologie.
Stuttgart, Georg Thieme Verlag KG, 2015

Macchetta A, Turner IG, Bowen CR

Fabrication of HA/TCP scaffolds with a graded and porous structure using a camphene-based freeze-casting method.
Acta Biomaterialia. 2009; 5(4): 1319-1327

Maglio M, Salamanna F, Brogini S, Borsari V, Pagani S, Nicoli Aldini N, Giavaresi G, Fini M

Histological, Histomorphometrical, and Biomechanical Studies of Bone-Implanted Medical Devices: Hard Resin Embedding.
BioMed Research International. 2020; 2020

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

Makar GL, Kruger J

Corrosion of magnesium.
International Materials Reviews. 1993; 38(3): 138-153

Malluche HH, Meyer W, Sherman D, Massry SG

Quantitative bone histology in 84 normal American subjects.
Calcified Tissue International. 1982; 34(1): 449

Matsusue Y, Yamamuro T, Yoshii S, Oka M, Ikada Y, Hyon SH, Shikinami Y

Biodegradable screw fixation of rabbit tibia proximal osteotomies.
Journal of Applied Biomaterials. 1991; 2(1): 1-12

Mavrogenis AF, Dimitriou R, Parvizi J, Babis GC

Biology of implant osseointegration.
Journal of Musculoskeletal and Neuronal Interactions. 2009; 9(2): 61-71

McBride ED

Magnesium screw and nail transfixion in fractures.
Southern Medical Journal. 1938; 31(5): 508-514

McCord CP, Prendergast JJ, Meek SF, Harrold GC

Chemical gas gangrene from metallic magnesium.
Ind Med. 1942; 11(2): 71-76

McCormack AP, Anderson PA, Tencer AF

Effect of controlled local release of sodium fluoride on bone formation: Filling a defect in the proximal femoral cortex.
Journal of Orthopaedic Research. 1993; 11(4): 548-555

McKibbin B

The biology of fracture healing in long bones.
The Journal of Bone and Joint Surgery. British volume. 1978; 60-B(2): 150-162

Meyer-Lindenberg A, Thomann M, Krause A, Bormann D, von Rechenberg B, Windhagen H

Untersuchungen zum Einsatz einer Magnesiumbasislegierung als neues resorbierbares Implantatmaterial für die Osteosynthese.
Kleintierpraxis. 2010; 55: 349-363

Monfoulet LE, Becquart P, Marchat D, Vandamme K, Bourguignon M, Pacard E, Viateau V, Petite H, Logeart-Avramoglou D

The pH in the microenvironment of human mesenchymal stem cells is a critical factor for optimal osteogenesis in tissue-engineered constructs.
Tissue Eng Part A. 2014; 20(13-14): 1827-1840

Morgan EF, Mason ZD, Chien KB, Pfeiffer AJ, Barnes GL, Einhorn TA, Gerstenfeld LC

Micro-computed tomography assessment of fracture healing: Relationships among callus structure, composition, and mechanical function.
Bone. 2009; 44(2): 335-344

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

Fluoride effects on bone formation and mineralization are influenced by genetics.
Bone. 2008; 43(6): 1067-1074

Müller R, Rügsegger P

Micro-tomographic imaging for the nondestructive evaluation of trabecular bone architecture.

Stud Health Technol Inform. 1997; 40: 61-79

Müller R, Van Campenhout H, Van Damme B, Van der Perre G, Dequeker J, Hildebrand T, Rügsegger P

Morphometric Analysis of Human Bone Biopsies: A Quantitative Structural Comparison of Histological Sections and Micro-Computed Tomography.

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

Muschler GF, Nakamoto C, Griffith LG

Engineering Principles of Clinical Cell-Based Tissue Engineering.

The Journal of Bone and Joint Surgery. American volume. 2004; 86(7): 1541-1558

Navarro M, Michiardi A, Castaño O, Planell JA

Biomaterials in orthopaedics.

Journal of The Royal Society Interface. 2008; 5(27): 1137-1158

Nickel R, Schummer A, Seiferle E

Lehrbuch der Anatomie der Haustiere, Band I: Bewegungsapparat.

Berlin, Parey Verlag, 2004

Nishiguchi S, Kato H, Neo M, Oka M, Kim H-M, Kokubo T, Nakamura T

Alkali- and heat-treated porous titanium for orthopedic implants.

Journal of Biomedical Materials Research. 2001; 54(2): 198-208

Noyama Y, Miura T, Ishimoto T, Itaya T, Niinomi M, Nakano T

Bone loss and reduced bone quality of the human femur after total hip arthroplasty under stress-shielding effects by titanium-based implant.

Materials Transactions. 2012; 53(3): 565-570

Nuss KMR, von Rechenberg B

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

The Open Orthopaedics Journal. 2008; 2: 66-78

Oh SH, Park IK, Kim JM, Lee JH

In vitro and in vivo characteristics of PCL scaffolds with pore size gradient fabricated by a centrifugation method.

Biomaterials. 2007; 28(9): 1664-1671

Osborn J

Die physiologische Integration von Hydroxylapatitkeramik in das Knochengewebe.

Hefte Unfallheilkd. 1985; 174: 101-105

Oyane A, Kim H-M, Furuya T, Kokubo T, Miyazaki T, Nakamura T

Preparation and assessment of revised simulated body fluids.

Journal of Biomedical Materials Research Part A. 2003; 65A(2): 188-195

Parfitt AM

The cellular basis of bone remodeling: The quantum concept reexamined in light of recent advances in the cell biology of bone.

Calcif Tissue Int. 1984; 36 37-45

Parfitt AM

Targeted and nontargeted bone remodeling: Relationship to basic multicellular unit origination and progression.

Bone 2002; 30(1): 5-7

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.

Journal of Bone and Mineral Research. 1987; 2(6): 595-610

Parfitt AM, Mathews CH, Villanueva AR, Kleerekoper M, Frame B, Rao DS

Relationships between surface, volume, and thickness of iliac trabecular bone in aging and in osteoporosis. Implications for the microanatomic and cellular mechanisms of bone loss.

The Journal of Clinical Investigation. 1983; 72(4): 1396-1409

Paulus MJ, Gleason SS, Easterly ME, Foltz CJ

A review of high-resolution X-ray computed tomography and other imaging modalities for small animal research.

Lab animal. 2001; 30(3): 36-45

Paulus MJ, Gleason SS, Kennel SJ, Hunsicker PR, Johnson DK

High Resolution X-ray Computed Tomography: An Emerging Tool for Small Animal Cancer Research.

Neoplasia. 2000; 2(1): 62-70

Pawelec KM, White AA, Best SM

Properties and characterization of bone repair materials.

In Pawelec KM and Planell JA: Bone Repair Biomaterials Duxford, Woodhead Publishing 2019

Payr E

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

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

Payr E

Zur Verwendung des Magnesiums für resorbierbare Darmknöpfe und andere chirurgisch-technische Zwecke.

Centralblatt Chir. 1901; 28(20): 513-515

Payr E, Martina A

Experimentelle und klinische Beiträge zur Lebernaht und Leberresection (Magnesiumplattennaht).

Arch Klin Chir. 1905; 77(4): 962-998

Penk A, Förster Y, Scheidt HA, Nimptsch A, Hacker MC, Schulz-Siegmund M, Ahnert P, Schiller J, Rammelt S, Huster D

The pore size of PLGA bone implants determines the de novo formation of bone tissue in tibial head defects in rats.

Magnetic Resonance in Medicine. 2013; 70(4): 925-935

Perez RA, Mestres G

Role of pore size and morphology in musculo-skeletal tissue regeneration.

Materials Science and Engineering: C. 2016; 61: 922-939

Perez RA, Seo S-J, Won J-E, Lee E-J, Jang J-H, Knowles JC, Kim H-W

Therapeutically relevant aspects in bone repair and regeneration.

Materials Today. 2015; 18(10): 573-589

Pérez RA, Won J-E, Knowles JC, Kim H-W

Naturally and synthetic smart composite biomaterials for tissue regeneration.

Advanced Drug Delivery Reviews. 2013; 65(4): 471-496

Peroglio M, Gremillard L, Chevalier J, Chazeau L, Gauthier C, Hamaide T
Toughening of bio-ceramics scaffolds by polymer coating.
Journal of the European Ceramic Society. 2007; 27(7): 2679-2685

Piconi C, Maccauro G
Zirconia as a ceramic biomaterial.
Biomaterials. 1999; 20(1): 1-25

Pietak A, Mahoney P, Dias GJ, Staiger MP
Bone-like matrix formation on magnesium and magnesium alloys.
Journal of Materials Science: Materials in Medicine. 2008; 19(1): 407-415

Pilliar RM
Overview of surface variability of metallic endosseous dental implants: textured and porous surface-structured designs.
Implant dentistry. 1998; 7(4): 305-314

Poinern GEJ, Brundavanam S, Fawcett D
Biomedical magnesium alloys: a review of material properties, surface modifications and potential as a biodegradable orthopaedic implant.
American Journal of Biomedical Engineering. 2012; 2(6): 218-240

Polmear IJ
Grades and Alloys.
In Avedesian MM and Baker H: ASM Specialty Handbook on Magnesium and Magnesium Alloys, Materials Park Ohio, ASM International, 1999

Raiha JE
Biodegradable implants as intramedullary nails. A survey of recent studies and an introduction to their use.
Clinical Materials. 1992; 10(1-2): 35-39

Raina V
Normal osteoid tissue.
Journal of Clinical Pathology. 1972; 25(3): 229-232

Rana D, Ratheesh G, Ramakrishna S, Ramalingam M
Nanofiber composites in cartilage tissue engineering.
In Ramakrishna S and Ramalingam M: Nanofiber Composites for Biomedical Applications, Duxford, United Kingdom, Elsevier, 2017

Recker RR
Bone histomorphometry.
Boca Raton, CRC Press, 1983

Reddi AH
Cell Biology and Biochemistry of Endochondral Bone Development.
Collagen and Related Research. 1981; 1(2): 209-226

Reddi AH
Bone and cartilage differentiation.
Current Opinion in Genetics & Development. 1994; 4(5): 737-744

Reddy SV
Regulatory mechanisms operative in osteoclasts.
Crit Rev Eukaryot Gene Expr. 2004; 14(4): 255-270

Rehm KE, Helling HJ, Gatzka C
Neue Entwicklungen beim Einsatz resorbierbarer Implantate.
Der Orthopäde. 1997; 26(5): 489-497

Reifenrath J

Vergleich des Knorpelregenerates über degradablen Magnesiumschwämmen mit einer osteocartilaginären Umkehrplastik sowie einer Leerbohrung im Kaninchenmodell.
Hannover, tierärztl. Hochsch., Diss., 2008

Reifenrath J, Gottschalk D, Angrisani N, Besdo S, Meyer-Lindenberg A

Axial forces and bending moments in the loaded rabbit tibia in vivo.
Acta Veterinaria Scandinavica. 2012; 54(1): 21

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

Revell PA, Damien E, Zhang XS, Evans P, Howlett CR

The Effect of Magnesium Ions on Bone Bonding to Hydroxyapatite Coating on Titanium Alloy Implants.
Key Engineering Materials. 2004; 254-256: 447-450

Rezwan K, Chen QZ, Blaker JJ, Boccaccini AR

Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering.
Biomaterials. 2006; 27(18): 3413-3431

Richany SF, Sprinz H, Kraner K, Ashby J, Merrill TG

The Role of the Diaphyseal Medulla in the Repair and Regeneration of the Femoral Shaft in the Adult Cat.
The Journal of Bone and Joint Surgery. 1965; 47(8): 1565-1584

Ritman EL

Micro-Computed Tomography-Current Status and Developments.
Annual Review of Biomedical Engineering. 2004; 6(1): 185-208

Robertson JA, Felsenfeld AJ, Haygood CC, Wilson P, Clarke C, Llach F

Animal model of aluminum-induced osteomalacia: Role of chronic renal failure.
Kidney International. 1983; 23(2): 327-335

Robling AG, Castillo AB, Turner CH

Biomechanical and molecular regulation of bone remodeling.
Annual Review of Biomedical Engineering. 2006; 8: 455-498

Röher U

Optimierung der Mikro-CT-Darstellung des Mittel- und Innenohrs der Katze. Hannover, tierärztl. Hochsch., Diss., 2011

Romeis B

Mikroskopische Technik 17. Aufl.
München, Wien, Urban und Schwarzenberg, , 1989

Roodman GD

Cell biology of the osteoclast.
Experimental Hematology. 1999; 27(8): 1229-1241

Roosa SMM, Kemppainen JM, Moffitt EN, Krebsbach PH, Hollister SJ

The pore size of polycaprolactone scaffolds has limited influence on bone regeneration in an in vivo model.
Journal of Biomedical Materials Research Part A. 2010; 92A(1): 359-368

Rössig 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 Biomaterialia. 2015; 25: 369-383

Rostock P

Ist das Magnesium als Naht- und Schienungsmaterial für Knochenoperationen geeignet? Archiv für orthopädische und Unfall-Chirurgie, mit besonderer Berücksichtigung der Frakturenlehre und der orthopädisch-chirurgischen Technik. 1937; 38(3): 486-492

Rubin CT, Lanyon LE

Osteoregulatory nature of mechanical stimuli: Function as a determinant for adaptive remodeling in bone.

Journal of Orthopaedic Research. 1987; 5(2): 300-310

Rüegsegger P, Koller B, Müller R

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

Rüter A, Mayr E

Pseudarthrosen.

Der Chirurg. 1999; 70(11): 1239-1245

Ryan G, Pandit A, Apatsidis DP

Fabrication methods of porous metals for use in orthopaedic applications.

Biomaterials. 2006; 27(13): 2651-2670

Salomon F-V, Geyer H, Gille U

Anatomie für die Tiermedizin.

Stuttgart, Enke Verlag, 2015

Schebitz H, Brass W, Winzer HJ

Allgemeine Chirurgie für Tierärzte und Studierende (2. Aufl.).

Berlin/Hamburg, Paul Parey, 1993

Schmidt PF

Praxis der Rasterelektronenmikroskopie und Mikrobereichsanalyse, Bd. 444. Expert Verlag Renningen, 2000

Schmitz JP, Hollinger JO

The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions.

Clinical Orthopaedics and Related Research. 1986(205): 299-308

Serre CM, Papillard M, Chavassieux P, Voegel JC, Boivin G

Influence of magnesium substitution on a collagen-apatite biomaterial on the production of a calcifying matrix by human osteoblasts.

Journal of Biomedical Materials Research. 1998; 42(4): 626-633

Sharrard WJ

A double-blind trial of pulsed electromagnetic fields for delayed union of tibial fractures.

The Journal of Bone and Joint Surgery. British volume. 1990; 72-B(3): 347-355

Silver IA, Murrills RJ, Etherington DJ

Microelectrode studies on the acid microenvironment beneath adherent macrophages and osteoclasts.

Experimental Cell Research. 1988; 175(2): 266-276

Singh I

The architecture of cancellous bone.

Journal of anatomy. 1978; 127(2): 305-310

Sinowatz F, Hees H

Histologie Kurzlehrbuch der Zytologie und mikroskopischen Anatomie.
München, Deutscher Ärzte-Verlag, 2006

Sommerfeldt D, Rubin C

Biology of bone and how it orchestrates the form and function of the skeleton.
European Spine Journal. 2001; 10(2): 86-95

Song G, Song S

A Possible Biodegradable Magnesium Implant Material.
Advanced Engineering Materials. 2007; 9(4): 298-302

Song GL, Atrens A

Corrosion Mechanisms of Magnesium Alloys.
Advanced Engineering Materials. 1999; 1(1): 11-33

Staiger MP, Pietak AM, Huadmai J, Dias G

Magnesium and its alloys as orthopedic biomaterials: a review.
Biomaterials. 2006; 27(9): 1728-1734

Stoppie N, Wevers M, Naert I

Feasibility of detecting trabecular bone around percutaneous titanium implants in rabbits by in vivo microfocus computed tomography.
Journal of Microscopy. 2007; 228(1): 55-61

Story BJ, Wagner WR, Gaisser DM, Cook SD, Rust-Dawicki AM

In vivo performance of a modified CSTi dental implant coating.
Int J Oral Maxillofac Implants. 1998; 13(6): 749-757

Sun H, Luo CF, Zhong B, Shi HP, Zhang CQ, Zeng BF

A prospective, randomised trial comparing the use of absorbable and metallic screws in the fixation of distal tibiofibular syndesmosis injuries.
The Bone & Joint Journal. 2014; 96-B(4): 548-554

Susheela AK, Jha M

Cellular and histochemical characteristics of osteoid formed in experimental fluoride poisoning.
Toxicology Letters. 1983; 16(1): 35-40

Switzer EN

Resorbierbares metallisches Osteosynthesematerial (RemOs)- Untersuchungen zum Resorptionsverhalten im Meerschweinchenmodell. Hannover, tierärztl. Hochsch., Diss., 2005

Taichman RS

Blood and bone: two tissues whose fates are intertwined to create the hematopoietic stem-cell niche.
Blood. 2005; 105(7): 2631-2639

TenHuisen KS, Brown PW

Effects of magnesium on the formation of calcium-deficient hydroxyapatite from $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ and $\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}$.
Journal of Biomedical Materials Research. 1997; 36(3): 306-314

Theiss F, Apelt D, Brand B, Kutter A, Zlinszky K, Böhner M, Matter S, Frei C, Auer JA, von Rechenberg B

Biocompatibility and resorption of a brushite calcium phosphate cement.
Biomaterials. 2005; 26(21): 4383-4394

Thomann M

Untersuchungen zur Degradation und Biokompatibilität von intramedullären Implantaten auf Magnesiumbasis im Kaninchenmodell: Prüfung der Degradation im Langzeitversuch und Untersuchung des Einflusses einer Fluoridbeschichtung. Hannover, tierärztl. Hochsch., Diss., 2008

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.
Journal of Biomedical Materials Research Part 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

Thomsen JS, Laib A, Koller B, Prohaska S, Mosekilde L, Gowin W

Stereological measures of trabecular bone structure: comparison of 3D micro computed tomography with 2D histological sections in human proximal tibial bone biopsies.
Journal of Microscopy. 2005; 218(2): 171-179

Tsuruga E, Takita H, Itoh H, Wakisaka Y, Kuboki Y

Pore size of porous hydroxyapatite as the cell-substratum controls BMP-induced osteogenesis.
The Journal of Biochemistry. 1997; 121(2): 317-324

Uebersax L, Apfel T, Nuss KM, Vogt R, Kim HY, Meinel L, Kaplan DL, Auer JA, Merkle HP, von Rechenberg B

Biocompatibility and osteoconduction of macroporous silk fibroin implants in cortical defects in sheep.
European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. 2013; 85(1): 107-118

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

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

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

Influence of the grain size on the in vivo degradation behaviour of the magnesium alloy LAE442.
Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part H: Journal of Engineering in Medicine. 2013; 227(3): 317-326

Vallet-Regí M, Ragel CV, Salinas Antonio J

Glasses with Medical Applications.
European Journal of Inorganic Chemistry. 2003; 2003(6): 1029-1042

Vallet-Regí M, Salinas AJ

Ceramics as bone repair materials In: Bone Repair Biomaterials: Regeneration and Clinical Applications, Duxford, Woodhead Publishing, 2019

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

Resorbierbare Implantate für Frakturfixierungen, aktueller Stand.
Der Unfallchirurg. 2000; 103(3): 178-182

Van Oosterwyck H, Duyck J, Sloten JV, Perre GV, Jansen J, Wevers M, Naert I

The Use of Microfocus Computerized Tomography as a New Technique for Characterizing Bone Tissue Around Oral Implants.
Journal of Oral Implantology. 2000; 26(1): 5-12

Verbrugge J

La tolérance du tissu osseux vis-à-vis du magnésium métallique.

Presse méd. 1933; 55: 1112-1114

Verbrugge J

Le Matériel métallique résorbable en chirurgie osseuse, par Jean Verbrugge. Masson, 1934

Verbrugge J

L'utilisation du magnésium dans le traitement chirurgical des fractures.

Bull Mém Soc Nat Cir. 1937; 59(59): 813-823

Voggenreiter G, Leiting S, Brauer H, Leiting P, Majetschak M, Bardenheuer M, Obertacke U

Immuno-inflammatory tissue reaction to stainless-steel and titanium plates used for internal fixation of long bones.

Biomaterials. 2003; 24(2): 247-254

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.

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

Von der Höh N, Krause A, Hackenbroich C, Bormann D, Lucas A, Meyer-Lindenberg A

[Influence of different surface machining treatments of resorbable implants made from different magnesium-calcium alloys on their degradation--a pilot study in rabbit models].

Dtsch Tierarztl Wochenschr. 2006; 113(12): 439-446

von Doernberg M-C, von Rechenberg B, Bohner M, Grünenfelder S, van Lenthe GH, Müller 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 Stechow D, Zurakowski D, Pettit AR, Müller R, Gronowicz G, Chorev M, Otu H, Libermann T, Alexander JM

Differential transcriptional effects of PTH and estrogen during anabolic bone formation.

Journal of Cellular Biochemistry. 2004; 93(3): 476-490

Waarsing JH, Day JS, van der Linden JC, Ederveen AG, Spanjers C, De Clerck N, Sasov A, Verhaar JAN, Weinans H

Detecting and tracking local changes in the tibiae of individual rats: a novel method to analyse longitudinal in vivo micro-CT data.

Bone. 2004; 34(1): 163-169

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

Prediction of cortical bone porosity in Vitro by microcomputed tomography.

Calcified Tissue International. 2001; 68(1): 38-42

Waizy H, Weizbauer A, Maibaum M, Witte F, Windhagen H, Lucas A, Denkena B, Meyer-Lindenberg A, Thorey F

Biomechanical characterisation of a degradable magnesium-based (MgCa0.8) screw.

Journal of Materials Science: Materials in Medicine. 2012; 23(3): 649-655

Wan Y, Xiong G, Luo H, He F, Huang Y, Zhou X

Preparation and characterization of a new biomedical magnesium-calcium alloy.

Materials & Design. 2008; 29(10): 2034-2037

Wang X, Masse DB, Leng H, Hess KP, Ross RD, Roeder RK, Niebur GL
Detection of trabecular bone microdamage by micro-computed tomography.
Journal of Biomechanics. 2007; 40(15): 3397-3403

Wang YQ, Zheng MY, Wu K
Microarc oxidation coating formed on SiCw/AZ91 magnesium matrix composite and its corrosion resistance.
Materials Letters. 2005; 59(14): 1727-1731

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 Biomaterialia. 2015; 11: 554-562

Willbold E, Kalla K, Bartsch I, Bobe K, Brauneis M, Remennik S, Shechtman D, Nellesen J, Tillmann W, Vogt C, Witte F
Biocompatibility of rapidly solidified magnesium alloy RS66 as a temporary biodegradable metal.
Acta Biomaterialia. 2013; 9(10): 8509-8517

Willbold E, Weizbauer A, Loos A, Seitz JM, Angrisani N, Windhagen H, Reifenrath J
Magnesium alloys: A stony pathway from intensive research to clinical reality. Different test methods and approval-related considerations.
Journal of Biomedical Materials Research Part A. 2017; 105(1): 329-347

Wilson J, Douek E, Rust K
Bioglass middle ear devices: Ten year clinical results.
Bioceramics. 1995; 8: 239-245

Wilson J, Yli-Urpo A, Happonen R-P
Bioactive glasses: clinical applications.
In Hench LL and Wilson J: An introduction to bioceramics, Singapore, World Scientific, 1993

Wintermantel E, Ha S-W
Keramische Werkstoffe.
In Wintermantel E and Ha S-W: Medizintechnik Life Science Engineering, Berlin, Springer Verlag, 2008

Witte F
Reprint of: The history of biodegradable magnesium implants: A review.
Acta Biomaterialia. 2015; 23: 28-40

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 a; 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 Biomaterialia. 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): 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, Reifenrath J, Müller PP, Crostack HA, Nellesen J, Bach FW, Bormann D, Rudert M

Cartilage repair on magnesium scaffolds used as a subchondral bone replacement.
Mat.-wiss. u. Werkstofftech. 2006 b; 37(6): 504-508

Witte F, Ulrich H, Palm C, Willbold E

Biodegradable magnesium scaffolds: Part II: Peri-implant bone remodeling.
Journal of Biomedical Materials Research Part A. 2007; 81A(3): 757-765

Witte MB, Barbul A

General principles of wound healing.
Surgical Clinics of North America. 1997; 77(3): 509-528

Witting LM, Waselau AC, Feichtner F, Wurm L, Julmi S, Klose C, Gartzke AK, Maier HJ, Wriggers P, Meyer-Lindenberg A

Influence of coatings on degradation and osseointegration of open porous Mg scaffolds in vivo.
Materialia. 2020; 14: 100949

Wolff J

Das Gesetz der Transformation der Knochen.
Berlin, Hirschwald Verlag 1892

Wong HM, Wu S, Chu PK, Cheng SH, Luk KD, Cheung KM, Yeung KW

Low-modulus Mg/PCL hybrid bone substitute for osteoporotic fracture fixation.
Biomaterials. 2013; 34(29): 7016-7032

Wu G, Fan Y, Gao H, Zhai C, Zhu YP

The effect of Ca and rare earth elements on the microstructure, mechanical properties and corrosion behavior of AZ91D.
Materials Science and Engineering: A. 2005; 408(1-2): 255-263

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

In vitro and in vivo evaluation of the surface bioactivity of a calcium phosphate coated magnesium alloy.
Biomaterials. 2009; 30(8): 1512-1523

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

In vivo corrosion behavior of Mg-Mn-Zn alloy for bone implant application.
Journal of Biomedical Materials Research Part A. 2007; 83A(3): 703-711

Yamagishi M, Yoshimura Y

The biomechanics of fracture healing.
The Journal of Bone and Joint Surgery. American volume. 1955; 37A(5): 1035-1068

Yamasaki Y, Yoshida Y, Okazaki M, Shimazu A, Uchida T, Kubo T, Akagawa Y, Hamada Y, Takahashi J, Matsuura N

Synthesis of functionally graded MgCO₃ apatite accelerating osteoblast adhesion.
Journal of Biomedical Materials Research. 2002; 62(1): 99-105

Yang K, Tan L

Control of biodegradation of magnesium (Mg) alloys for medical applications.
In Song G-L: Corrosion Prevention of Magnesium Alloys, Oxford, Woodhead Publishing Limited, 2013

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

Porous magnesium-based scaffolds for tissue engineering.
Materials Science and Engineering: 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 and Surfaces B: Biointerfaces. 2017; 149: 330-340

Yusop AH, Bakir AA, Shaharom NA, Abdul Kadir MR, Hermawan H

Porous Biodegradable Metals for Hard Tissue Scaffolds: A Review.
International Journal of Biomaterials. 2012; 2012: 641430

Zeng R, Dietzel W, Witte F, Hort N, Blawert C

Progress and Challenge for Magnesium Alloys as Biomaterials.
Advanced Engineering Materials. 2008; 10(8): B3-B14

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.

Journal of Biomedical Materials Research Part A. 2009; 90(3): 882-893

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

Research on an Mg–Zn alloy as a degradable biomaterial.
Acta Biomaterialia. 2010; 6(2): 626-640

Zierold AA

Reaction of bone to various metals.
Arch Surg. 1924; 9(2): 365-412

Zreiqat H, Howlett CR, Zannettino A, Evans P, Schulze-Tanzil G, Knabe C, Shakibaei M

Mechanisms of magnesium-stimulated adhesion of osteoblastic cells to commonly used orthopaedic implants.

Journal of Biomedical Materials Research. 2002; 62(2): 175-184

VIII. DANKSAGUNG

Ich möchte mich bei Frau Prof. Dr. Meyer-Lindenberg für die Möglichkeit der Promotion an der Chirurgischen und Gynäkologischen Kleintierklinik der LMU München bedanken. Mein besonderer Dank gilt auch für die vielen und langen Gespräche in Verbindung mit Projekttreffen und Veröffentlichungen sowie Ihre rege Förderung an Kongressteilnahmen!

Ein großer Dank gilt meiner Arbeitsgruppe rund um Frau Dr. Waselau. Mit Ihrer Ausdauer bei der langfristigen Planung, Durchführung sowie mit Ihrem kommunikativ-organisatorischem Talent hat Sie sehr dazu beigetragen, dass meine Dissertation einen Abschluss finden konnte. Frau Dr. Feichtner möchte ich für Ihre unermüdliche Bereitschaft danken, mehrstündige Korrekturdiskussionen mit mir zu führen sowie Ihr Beisein auf Kongressen. Frau Wurm gilt neben den Korrekturen auch ein besonderer Dank für die umfassende technische Unterstützung bei der Etablierung der μ CT-Auswertung. Ebenso möchte ich Frau Limmer danken, die mich intensiv und mit viel Sorgfalt bei der Anfertigung der histologischen Präparate und bei weiteren Analysen unterstützt hat. Herrn Dr. Kilchling möchte ich für die vielen OP-Vorbereitungen und seinen wunderbaren Humor danken. Frau Dr. Kleer-Reiter möchte ich besonders für die gemeinsame Zeit und Zusammenarbeit danken! Dies verbindet alle genannten Personen und unser Band bleibt hoffentlich über diese Arbeit hinaus bestehen!

Ich danke auch Herrn Prof. Dr.-Ing. Maier und Herrn Julmi vom Institut für Werkstoffkunde in Hannover für die gute und stets zuverlässige Zusammenarbeit. Frau Prof. Dr. von Rechenberg von der Vetsuisse-Fakultät der Universität Zürich danke ich für Ihre Unterstützung bei histologischen und anderen fachlichen Fragen im Laufe der Veröffentlichungsprozesse!

Meinen Eltern Dieter und Sabine Augustin gilt der größte Dank, da sie mich stets daran erinnern, dass sich Engagement und Durchhaltevermögen auszahlt!

Meinem Partner Christian Ganter danke ich von großem Herzen, da er mich immer begleitet, zu mir gehalten sowie fest an mich geglaubt hat!