

Aus der Klinik für Orthopädie und Unfallchirurgie,

Klinik der Universität München

Vorstand: Prof. Dr. Wolfgang Böcker

Resorptionsverhalten und Biokompatibilität eines neuen
degradierbaren eisenbasierten Biomaterials
als Knochenersatz

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Anton Maximilian Sichler

aus Rosenheim

2022

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Bernd Wegener

Mitberichterstatter: PD Dr. Florian Haasters
Prof. Dr. Franz-Xaver Reichl

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter:

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 19.05.2022

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	5
1.1. Einführung in das Thema	5
1.2. Resorbierbare Knochenersatzmaterialien	7
1.3. Zielsetzung/Fragestellung	13
2. Material und Methodik	14
2.1. Tierversuch	14
2.1.1. Tiermodell	14
2.1.2. Tierhaltung	14
2.1.3. Gruppeneinteilung und statistische Begutachtung	15
2.1.4. Implantatmaterial	16
2.1.5. Narkoseverfahren	18
2.1.6. Operationstechnik	18
2.1.7. Blutentnahme und Röntgen	20
2.1.8. Polychrome Fluoreszenzmarkierung	21
2.1.9. Euthanasie und Probeentnahme	21
2.1.10. Histologische Aufarbeitung der Präparate	22
2.1.11. Qualitativ deskriptive Durchlicht- u. Epifluoreszenzmikroskopie	24
2.1.12. Quantitative Analyse der Kontaktradiographien	25
2.1.13. Statistische Aufarbeitung	28
3. Ergebnisse	28
3.1. Röntgenbefunde	29
3.2. Histologische Auswertung	30
3.2.1 Durchlicht-Mikroskopie	30
3.2.2 Fluoreszenzmarkierung	51

3.3. Quantitative Analyse der Kontaktradiographien	52
3.3.1 Analytische Betrachtung des neugebildeten Knochens	56
3.3.2 Analytische Betrachtung des Implantats der jeweiligen Region of Interest (ROI)	81
4. Diskussion	92
4.1. Material und Methodik	92
4.1.1. Implantatkonfiguration	92
4.1.2. Tiermodell	93
4.2. Ergebnisse	95
4.2.1. Qualitativ-histologische Auswertung	95
4.2.2. Quantitative Analyse der Kontaktradiographien	96
5. Zusammenfassung	101
6. Literatur	103
7. Anhang	108
8. Danksagung	113

1. Einleitung

1.1. Einführung in das Thema

Seit langem befasst sich die wissenschaftliche Forschung auf dem Gebiet der Orthopädie und Unfallchirurgie mit der Problematik des Ersatzes von großen Knochendefekten. Die Lösung dieser Frage hat für die klinischen Fächer der Orthopädie und Unfallchirurgie eine elementare Bedeutung.

Größere Knochendefekte können verschiedenen Ursprungs sein. Hier sei die operative Versorgung von Weichteil- und Knochtumoren sowie von komplexen Frakturen nach Traumata genannt. Eine weitere große Herausforderung stellt die immer größer werdende Anzahl von Revisionsendoprothesen dar, insbesondere wenn man sich die jährlich ansteigende Zahl von Erstimplantationen bei stetig zunehmender Lebenserwartung vor Augen führt. Auch bei Behandlung von infektionsbedingten Knochenverlusten oder der Versorgung von Pseudarthrosen kommt es zu größeren knöchernen Defektzonen [1].

Das Regenerationsverhalten von Knochen wurde in zahlreichen wissenschaftlichen Arbeiten bearbeitet. Ein hohes Potential des Knochens zur autogenen Heilung ist dabei unstrittig. Es gibt verschiedene Ansätze, die Herausforderung der Therapie großer Knochendefektzonen im lasttragenden Bereich zu meistern. Eine alles umfassende und zufriedenstellende, klinisch praktikable Lösung konnte bisher noch nicht gefunden werden [2, 3].

Die verwendeten Knochenersatzmaterialien, welche bereits in den klinischen Alltag Einzug gehalten haben, müssen verschiedene wichtige Merkmale besitzen. So sollten sie in physikalischen Aspekten Knochen ähnlich sein, d.h. Charakteristika wie mechanisches Verhalten und gegebene Achsenstabilität sind unabdingbar. Weiterhin müssen sie eine hohe Biokompatibilität aufweisen, wobei verschiedene Grade unterschieden werden können [1, 4]. Dabei werden Implantatmaterialien, die zu toxischen Reaktionen und Entzündungen, Nekrosebildungen, Abstoßungsreaktionen oder auch zu allergenen Wirkungen führen, als *inkompatibel* beschrieben. Daneben wird ein Werkstoff als *biokompatibel* bezeichnet, wenn die freigegebene Substanz im nicht-

toxischen Maße wirkt, es aber dennoch zu Bindegewebs- und Fremdkörperreaktionen kommt. Als drittes seien *bioinerte* Materialien genannt, welche zu keinerlei Freisetzung von toxischen Substanzen führen. Die Gruppen der eben genannten Stoffeigenschaften weisen jedoch alle keine positive Interaktion mit dem umgebenden Organismus auf. Im Gegensatz dazu steht die Gruppe der *bioaktiven* Werkstoffe. Diese führen zu einer gezielten Gewebedifferenzierung zwischen Implantatmaterial sowie umgebendem Organismus im Bereich der Grenzfläche, so dass es hier zu neu entstandenen Bindungen und Adhäsionen kommt. Mit dem Begriff der *Osteoinduktivität* bezeichnet man das Charakteristikum eines Implantatmaterials, wenn es die Neubildung von Knochen induziert bzw. anregt und unterstützt. *Osteokonduktive* Eigenschaften hat ein Werkstoff, wenn sein Aufbau so gestaltet ist, dass er sozusagen „vorgefertigte Wege“ für ein gerichtetes / geleitetes Einwachsen des Knochens zur Verfügung stellt [5, 6].

Zielsetzung der medizinischen Forschung ist die Entwicklung und Erprobung eines Werkstoffes mit genau diesen beiden Eigenschaften, Hand in Hand gehend mit einer möglichst hohen Biokompatibilität. Immunologische, metabolische und karzinogene Effekte sollten nicht auftreten [7]. Weitere relevante Eigenschaften wie eine gute klinische Handhabung durch den Operateur, die gegebene Sterilisierbarkeit ohne verändernde Auswirkungen auf das Implantat sowie eine vertretbare Kosten-Nutzen-Rechnung sind zu beachten [1, 4].

Neben den eben aufgeführten Materialeigenschaften gibt es für degradierbare und resorbierbare Knochenersatzwerkstoffe eine weitere entscheidende Komponente. Die notwendige Stabilität muss zunächst seitens des Implantates gewährleistet werden. Im zeitlichen Verlauf kommt es durch die osteoinduktiven und osteokonduktiven Effekte zu einem geleiteten Einwachsen des neugebildeten Knochens in die Implantatstrukturen, wodurch die tragende Last mehr und mehr durch den Neoknochen übernommen wird. Die ablaufende Degradation des Implantates findet im optimalen Fall invers dazu statt. In optimaler Weise laufen die beiden Prozesse, Osteointegration und Implantatdegradation, konstant zueinander in der gerichteten Weise ab, dass zu jeder Zeit die notwendige Stabilität des Implantat-Knochen-Verbundes gegeben ist. Es wird deutlich, dass gerade die Implantatbeschaffenheit eine wichtige Grundvoraussetzung

dafür ist, damit Osteointegration erst möglich wird [8, 9]. Das Kriterium der Offenporigkeit eines Implantates ist hierbei in der Implantatentwicklung zu berücksichtigen, um ein Einwachsen der Osteoblasten zu ermöglichen.

Zwei große Gruppen der synthetischen Ersatzmaterialien für Knochen lassen sich neben der autologen Knochentransplantation unterscheiden [4]. Dabei handelt es sich zum einen um **permanente** Implantate, die durch ihren massiven Aufbau und Zusammensetzung nicht an physiologischen Prozessen des Organismus teilnehmen. Diese werden meist nach erfolgter knöcherner Konsolidierung wieder nahezu unverändert operativ entfernt oder verbleiben lebenslang. Ein zweiter operativer Eingriff mit den damit verbundenen Risiken ist also eventuell nötig [1]. Dies trifft nicht für die zweite Gruppe zu, die Gegenstand dieser Arbeit ist. Es handelt sich um **degradierbare** und / oder **resorbierbare** Werkstoffe, die an den Ab- und Umbauprozessen des Körpers teilnehmen [10]. In optimaler Weise gewährleistet das Implantat genau so lange die erforderliche Stabilität des Knochens, bis dieser regeneriert und wieder selbst in der Lage ist, diese Aufgabe zu übernehmen [8, 9].

1.2. Resorbierbare Knochenersatzmaterialien

Das Charakteristikum von resorbierbaren synthetischen Werkstoffen ist die verträgliche aktive Verstoffwechsellung in ablaufenden physiologischen Prozessen des Körpers [10]. In der derzeitigen klinischen Anwendung kommt eine Vielzahl von Knochenersatzmaterialien vor, die je nach spezifischer Fragestellung ausgewählt werden. Es lassen sich dabei *organische* von *anorganischen* Materialien differenzieren. Im Folgenden werden die wichtigsten Vertreter der jeweiligen Gruppe erläutert.

Anorganische Knochenersatzmaterialien

- Keramische Werkstoffe

Keramiken können einerseits biologischer Herkunft sein, wie die durchgeführte Gewinnung aus Korallen oder bovinen Materialien zeigt. Bei dieser Form bleiben die vorbestehenden Porensysteme und damit die Morphologie erhalten, sodass nach der Verwendung ein positiver interkonnektierender Effekt entsteht. Andererseits lassen sich die Werkstoffe auch synthetisch herstellen. Um dabei eine Interkonnektion zu erzielen, müssen entsprechende Schritte in der Herstellung beachtet werden [10].

Die gängigsten Vertreter sind Hydroxylapatit und Tricalciumphosphat. Da sie als natürlicher Bestandteil im Knochen vorkommen, lässt sich ihre hohe Biokompatibilität ohne immununverträgliche oder gar toxische Reaktionen erklären. Diese Stoffe finden daher in der Klinik Anwendung als Beschichtungsmaterial, beispielsweise für Endoprothesen [11, 12]. Für weitere Einsatzgebiete, wie für die Verwendung als Trägermaterial, sei es für Antibiotika oder für Wachstumsfaktoren, bieten sich die Keramiken ebenso an [10, 11, 13]. Der häufig limitierende Faktor ist die verminderte mechanische Belastbarkeit. Die Verwendung zur Auffüllung größerer Defektzonen gelingt häufig nur in Kombination mit anderen Materialien.

- Biogläser

Ein weiterer Vertreter der anorganischen Materialien sind die Biogläser. Die synthetische Herstellung erfolgt im Rahmen eines Schmelzvorganges, bei dem je nach Verwendungszweck das Maß der Porosität und damit entsprechend das Potential zur Interkonnektivität kreiert werden kann. Die Ausgangsstoffe sind dafür sehr häufig saure wie basische Oxide. Als Beispiele seien Phosphorpentoxid, Siliciumdioxid, Calciumoxid, Kaliumoxid angeführt [14].

Im klinischen Alltag treten sie als applizierbare Pasten, Pulver oder Granulate in Erscheinung, die sich unterstützend auf das Zusammen- oder Anwachsen von Geweben auswirken [10, 11, 13].

- Calciumphosphatzemente

Calciumphosphatzemente werden in der Gruppe der anorganischen resorbierbaren Knochenersatzmaterialien zur knöchernen Defektauffüllung verwendet. Die Herstellung erfolgt aus einem Pulver und einem wässrigen Anteil, welcher nach Zusammenführung durch Anrühren zu einer formbaren Paste wird. Nach der Einbringung in den Knochendefekt härtet diese aus. Die Zusammensetzung des Zementes ist entscheidend für dessen Eigenschaften bzgl. Mechanik und Resorptionsfähigkeit. Je mehr Porosität das Implantat aufweist, desto höher ist die ablaufende Degradationsgeschwindigkeit wie auch die Osteointegration, desto geringer ist jedoch auch die temporär zu erzielende Stabilität [10, 15].

Organische Knochenersatzmaterialien

- Polymere

Die Anwendungsmöglichkeiten der Polymere sowohl im wissenschaftlichen als auch klinischen Bereich sind vielfältig. Neben ihrer Verwendung als Osteosynthese- und Implantatmaterial, beispielsweise als Schrauben- oder Plattenosteosynthesen aber auch filigraner als Pins oder Ankersysteme, kommen sie auch in der Therapie von Knorpeldefekten sowie zum Einsatz. Es handelt sich der Entstehung nach um Makromoleküle, deren Ausgangspunkt Monomere darstellen. Je nach Verwendungszweck lässt sich im Rahmen der Herstellung die Form und Größe des Polymers, ebenso die Geschwindigkeit des Degradationsprozesses variieren. Im Organismus werden Polymere durch hydrolytische Spaltung abgebaut. Bei der Depolymerisation kommt es zu nachteiligen Eigenschaften wie inflammatorischen Wirkungen durch frei werdende Energie mit der Folge von Osteolysen. Weiterhin ist

auch ein vermehrter Platzbedarf durch Quellung der Abbaustoffe nötig. Schließlich muss in der klinischen Verwendung zusätzlich die reduzierte Belastbarkeit und Stabilität der Materialien, insbesondere bei der operativen Versorgung von größeren Frakturen oder Defekten berücksichtigt werden. Mit Poly-L-Lactid, Poly-D-L-Lactid oder Polyglycolid sind die Hauptvertreter aufgeführt [16 - 19].

- Kompositwerkstoffe

Komposit- oder Verbundwerkstoffe beschreiben eine Zusammensetzung aus zwei oder mehr Materialien. Dabei versucht man, die Einzelkomponenten nach den jeweiligen Vorteilen auszuwählen. In der klinischen Anwendung werden daher häufig Polymere untereinander oder Polymere mit keramischen Materialien kombiniert. Dabei nutzt man die steuerbare Degradationsgeschwindigkeit über den Polymeranteil, die keramische Komponente soll einen verbesserten osteoinduktiven Effekt beisteuern [10, 12, 20].

Degradierbare Metallverbindungen

Die bisherig aufgeführten Knochenersatzmaterialien finden die Grenze ihrer Einsetzbarkeit bei größeren Knochendefekten. Die Implantate für die hier erforderliche Therapie müssen zu vorderst die notwendige Stabilität und v.a. ein deutlich höheres lasttragendes Potential aufweisen. So zielte die bisherige Forschung im Bereich der Metalllegierungen auf eine möglichst hohe Korrosionsfestigkeit, um diesen Anforderungen für permanente Implantate gerecht zu werden [21]. Seit einigen Jahren wird ein neuer Aspekt untersucht. Das Hauptaugenmerk der Entwicklung im Bereich der degradierbaren metallischen Legierungen wurde zuletzt auf Verbindungen basierend auf Magnesium gelegt. Neue Ansätze verfolgen auch Verbindungen, deren Legierung auf Eisen basiert ist. Ziel der Studien ist, die Korrosion der Metalle zeitlich so zu gestalten, dass der neugebildete Knochen sukzessive die lasttragende Funktion des sich abbauenden Implantates übernimmt, ohne dass zu einem Zeitpunkt die zu gewährleistende Stabilität gefährdet wird. Dabei ist insbesondere in der Legierungs- und Implantatherstellung auf die nötige Offenporigkeit des Werkstoffes zu achten, welcher

die Voraussetzung für eine mögliche Osteointegration ist [22, 23]. Bisherige Studien belegen, dass diesbezüglich Porenweiten von 100-500µm zu einer verbesserten Vaskularisation beitragen und sich das Elastizitätsmodul jenem des nativen spongiösen Knochens annähert [24-26]. Dies zu erreichen, stellt insbesondere auf einem derart kleinen Raum sehr hohe Anforderungen an die Werkstoffherstellung.

- Magnesium

Legierungen basierend auf Magnesium wurden bisher als degradierbare Implantate in der wissenschaftlichen Forschung verwendet und beginnend in der klinischen Anwendung eingesetzt. Dabei liegen die Schwerpunkte in vaskulären, insbesondere kardiovaskulären Bereichen sowie auf dem Gebiet der Orthopädie und Unfallchirurgie [27, 28]. Im Rahmen der Korrosion des Werkstoffes in physiologischer Umgebung werden Magnesiumionen wie auch Ionen der einzelnen Legierungsbestandteile freigesetzt. Dabei entsteht v.a. bei gesteigerter Abbaugeschwindigkeit eine nicht unrelevante Menge an Gasvolumen. Dies kann sich nachteilig auf das umliegende Gewebe auswirken und insbesondere die intraossäre Anwendbarkeit limitieren. Um der vermehrten Gasentwicklung entgegenzuwirken, versucht man die Korrosionsgeschwindigkeit durch Modifizierung der Legierung zu verringern [21]. Ein allergisches Potential ist bisher nicht beschrieben worden [29]. Dabei konnten Witte et al. in einem Tierversuch an Mehrschweinchenfemora mit diversen Magnesiumlegierungen nicht nur ein Ansteigen der Knochenmasse um den eingebrachten Werkstoff zeigen, sondern auch eine Anhäufung von Calciumphosphat verglichen mit dem degradierbaren Polymerimplantat der Kontrollgruppe. Als Konsequenz ergab sich daraus ein Hinweis für eine gesteigerte osteoblastische Aktivität möglicherweise verursacht durch Abbauprodukte des Implantatmaterials. Legierungen auf Magnesiumbasis könnten daher grundsätzlich für den Einsatz als bioresorbierbare Implantatmaterialien eingesetzt werden [30]. Klinisch etabliert sind gegenwärtig nur kleine Schrauben.

- Eisen

Stellt man die lasttragende Eigenschaft des Knochenersatzmaterials in den Vordergrund, so darf der Abbau- und Korrosionsvorgang des Implantates nicht zu schnell ablaufen. Der neugebildete Knochen sollte die Aufgabe der Stabilitätsgewährleistung sukzessive vom Implantat übernehmen. Aus diesem Grund erscheinen gerade eisenbasierte Legierungen sehr interessant [30]. Eisen kommt als Element unseres Organismus eine gewichtige Rolle im Ablauf des menschlichen Stoffwechsels zu [31]. So hat sich der Werkstoff in durchgeführten Untersuchungen mit eisenbasierten Gefäß-Stents am Tiermodell bereits bewährt [32 – 34].

Auch hat Eisen gegenüber Magnesium den Vorteil, dass die zu erwartende Degradationsgeschwindigkeit deutlich langsamer ist und es auf Grund der verminderten Oxidation zu nahezu keiner Gasentwicklung mit den entsprechenden negativen Auswirkungen kommt. Gerade dieser Aspekt rückt dieses Metall in den Fokus hinsichtlich der ossären Anwendung [30].

1.3. Zielsetzung / Fragestellung

Zielsetzung dieser Arbeit als Teilprojekt des Forschungsvorhabens „DegraMag“ ist die Entwicklung und Testung eines degradierbaren offenporigen Knochenersatzmaterials auf der Basis eines Metalls. Das Implantat sollte möglichst osteokonduktive und osteoinduktive Eigenschaften bei insgesamt guter Biokompatibilität aufweisen. Dabei handelt es sich im Rahmen des Projektes um eine interdisziplinäre Zusammenarbeit verschiedener Einrichtungen, insbesondere dem Fraunhofer-Institut für Fertigungstechnik und Angewandte Materialforschung IFAM (Dresden), Fraunhofer-Institut für Keramische Technologien und Systeme IKTS (Dresden), InnoTERE GmbH (Radebeul) und der Ludwig-Maximilians-Universität München, Orthopädische Klinik und Poliklinik in Kooperation mit der Anatomischen Anstalt, Lehrstuhl II sowie aus der Tierärztlichen Fakultät die Chirurgische und Gynäkologische Kleintierklinik, das Institut für Tierpathologie und der Klinik für Wiederkäuer mit dem Lehr- und Versuchsgut in Oberschleißheim.

Für das Gesamtvorhaben namensgebend war es das Ziel, auf der Basis einer Legierung mit Magnesium als Hauptbestandteil ein Implantat zu fertigen, welches als Prüfkörper für ein degradierbares Knochenersatzmaterial klinisch erprobt werden kann. Im Rahmen der Entwicklung beim Projektpartner Fraunhofer IFAM und IKTS zeigte sich jedoch, dass Magnesium nicht die erwünschten Werkstoffparameter erfüllen konnte. Es wurden dann gemeinsam von allen Projektpartnern Alternativen erarbeitet. Dabei zeigten sich Legierungen auf der Basis von Eisen einerseits metallurgisch den Anforderungen gewachsen. Andererseits zeigten sich bei zytotoxikologischen Untersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe die geringsten negativen Effekte auf das Wachstum von Fibroblasten bei einer Eisen-Phosphor-Legierung [35]. Deshalb wurde eine Eisen-Phosphor-Legierung für die klinische Erprobung im Tierversuch ausgewählt.

Die vorliegende Dissertation untersucht das Einwachsverhalten eines neuen degradierbaren eisenbasierten Knochenersatzmaterials im Tierversuch.

2. Material und Methodik

2.1. Tierversuch

2.1.1. Tiermodell

Die Durchführung der Studie wurde durch die Regierung von Oberbayern mit dem Aktenzeichen 55.2-1-54-2531-130-07 nach gültigem Tierschutzgesetz in der Fassung vom 25.05.1998 genehmigt.

Die Tierversuche wurden an ausgewachsenen weiblichen Merinoschafen durchgeführt. Die Tiere wurden in der Versuchstierhaltung der Chirurgischen Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität Campus Innenstadt operiert.

Es wurden 60 gesunde Schafe mit einem Gewicht zwischen 50 bis 75 kg und einem Alter zwischen 1,5 – 3 Jahren in die Studie eingeschlossen.

2.1.2. Tierhaltung

Die Haltung der Tiere erfolgte prä- und postoperativ in Gruppenhaltung bis zu zehn Schafen auf Stroh im aufzuchtendem Schafbetrieb Schleich/Brunnthal. Drei Tage vor der Operation wurden die Tiere in die Chirurgische Klinik Innenstadt gebracht und dort jeweils zu zweit in 6qm großen Laufboxen aufgestellt. Die Versorgung erfolgte ausgewogen mit Getreidepellets, Heu und Wasser zur freien Aufnahme. Zur Prävention von intra- und perioperativen Komplikationen wurde 24 Stunden präoperativ Nahrungskarenz bei weiterhin Wasser ad libitum durchgeführt.

Nach erfolgtem Eingriff wurden die Tiere für weitere zwei Tage in den Laufboxen zur weiteren Beobachtung und Nachsorge gehalten. Der Rücktransport zum Schafbetrieb wurde am dritten postoperativen Tag vorgenommen.

Während des Klinikaufenthaltes wurden die Tiere stets von einer ausgebildeten Tierpflegerin visitiert und betreut, weiterhin mindestens einmal pro Tag durch einen Veterinärmediziner und den Versuchsleiter betreut. Die weitere Betreuung im

Schafbetrieb erfolgte täglich durch den Schäfer sowie in regelmäßigen Abständen durch den Versuchsleiter und den Doktoranden.

2.1.3. Gruppeneinteilung und statistische Begutachtung

In der Phase der Antragsstellung des Tierversuches erfolgte die statistische Planung gemeinsam mit dem Institut für Medizinische Informationsverarbeitung, Biometrie und Epidemiologie an der medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität. Für die Studie wurde eine experimentdefinierte Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha=0,05$ sowie eine Power von 0,8 pro Versuchseinheit festgelegt.

Die Tierversuche konnten in einem Zeitraum von Mai 2008 bis Oktober 2010 durchgeführt werden. Dabei wurden insgesamt 60 Versuchstiere für die Randomisierung der fünf Versuchsgruppen herangezogen. Der Einschluss von Ersatztieren erfolgte entsprechend den Kriterien des Tierversuchantrages dann, wenn bei einem Tier gravierende Erkrankungen diagnostiziert wurden, wenn eine fragliche Implantatverankerung im Rahmen der OP vorlag sowie bei anderweitigen unvorhersehbaren, die Gesundheit der Tiere maßgeblich beeinträchtigenden Komplikationen. Die Tiere konnten durch einen vierstelligen imprägnierten Zahlencode im linken Ohr jederzeit eindeutig identifiziert werden.

Die erste operierte Schafgruppe besteht aus elf Tieren und einem Ersatzschaf. Sie fungiert als Kontrollgruppe und wird im Weiteren auch Leerlochgruppe genannt. Nach der Setzung des Bohrdefektes im Knochen folgte die randständige Markierung mittels Kirschner-Draht. Um die Testung unterschiedlich dichter Metalllegierungen durchzuführen, erfolgt die Zuteilung vier weiterer Gruppen. Zwei der Tiergruppen wurde mit einem Implantat der Dichte $1,0 \text{ g/cm}^3$ versorgt, der Beobachtungszeitraum belief sich auf sechs Monate ($n=11$) und zwölf Monate bis zur Euthanasie ($n=11+$ Ersatztier). Die Bezeichnung dieser beiden Versuchsgruppen lautet im folgenden *Kurzzeitgruppe Implantat 1.0* für sechs Monate und *Langzeitgruppe Implantat 1.0* für zwölf Monate Beobachtungszeitraum.

In gleicher Weise verhielt sich die Zuteilung zwei weiterer Gruppen mit der Implantatdichte $1,4 \text{ g/cm}^3$. Dabei besteht die *Kurzzeitgruppe Implantat 1.4* (sechs Monate) aus elf Versuchstieren. Der *Langzeitgruppe Implantat 1.4* (zwölf Monate) wurden ebenfalls elf Tiere und drei Ersatztiere zugeteilt.

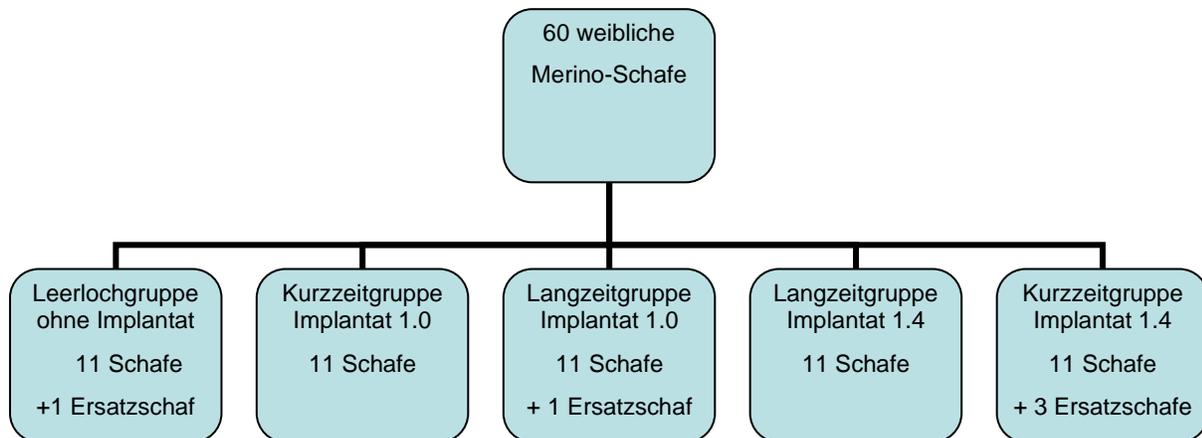


Abbildung 1: Übersicht der Gruppeneinteilung sowie der Zahl der randomisierten Versuchstiere

2.1.4. Implantatmaterial

Die Entwicklung des degradierbaren Metallimplantates oblag der Arbeitsgruppe im Rahmen der Vorversuche. Dabei wurden mehrere verschiedene Metalllegierungen hinsichtlich ihrer Toxizität und der zu erwartenden Abbaugeschwindigkeit in der *in vitro* Testung verglichen.

Die Herstellung und Fertigung der Implantate wurde im Fraunhofer Institut für Fertigungstechnik und Angewandte Materialforschung, Institutsteil Dresden (IFAM), durchgeführt. Im Rahmen des gewählten pulvermetallurgischen Verfahrens konnte auf der Basis eines offenzelligen Metallschaumes die Voraussetzung für die Offenporigkeit des Implantates gelegt werden, um schließlich im *in vivo* Versuch die Osteointegration des neu gebildeten Knochens zu ermöglichen. Zuvor wurden die Metallschäume aus

Polyurethan mit einer Zellenweite von 500 μm gefertigt, nachdem diese selbst zuvor in mehreren vorangeschalteten Schritten bearbeitet wurden. Es erfolgten mehrere Vorgänge der Pulverbeschichtung. Nach der mehrschrittigen Entfernung des Polyurethan-Schaumes durch Erhitzung auf bis zu 650°C wurde der Festkörper erneut auf Temperaturen bis zu 1080°C in einem Sinterofen erhitzt. Dadurch wurde dem Werkstoff die notwendige Materialeigenschaft der Festigkeit verliehen. Durch die anschließende Zuschneidung des Körpers durch einen Wasserstrahl unter der Zugabe abrasiver Partikel entsteht die endgültige Form des Körpers.

Die Legierungszusammensetzung besteht aus reinem Eisen mit einem Phosphoranteil von 1,6 m-% sowie einem Kohlenstoffgehalt von 0,2-0,5 m-%. Der Implantatkörper ist zylindrisch und weist bei einer Höhe von 15 mm einen Durchmesser von 10 mm auf.

Hergestellt wurden zwei differente Implantatdichten von 1,0 g/cm^3 und 1,4 g/cm^3 . Die jeweilige Druckfestigkeit beträgt bei der Dichte 1,0 g/cm^3 9,4 \pm 2,7 MPa sowie bei der Dichte 1,4 g/cm^3 10,9 \pm 5,5 MPa. Für beide Dichten wurde der Wert des Elastizitätsmoduls von 2,25 GPa errechnet.

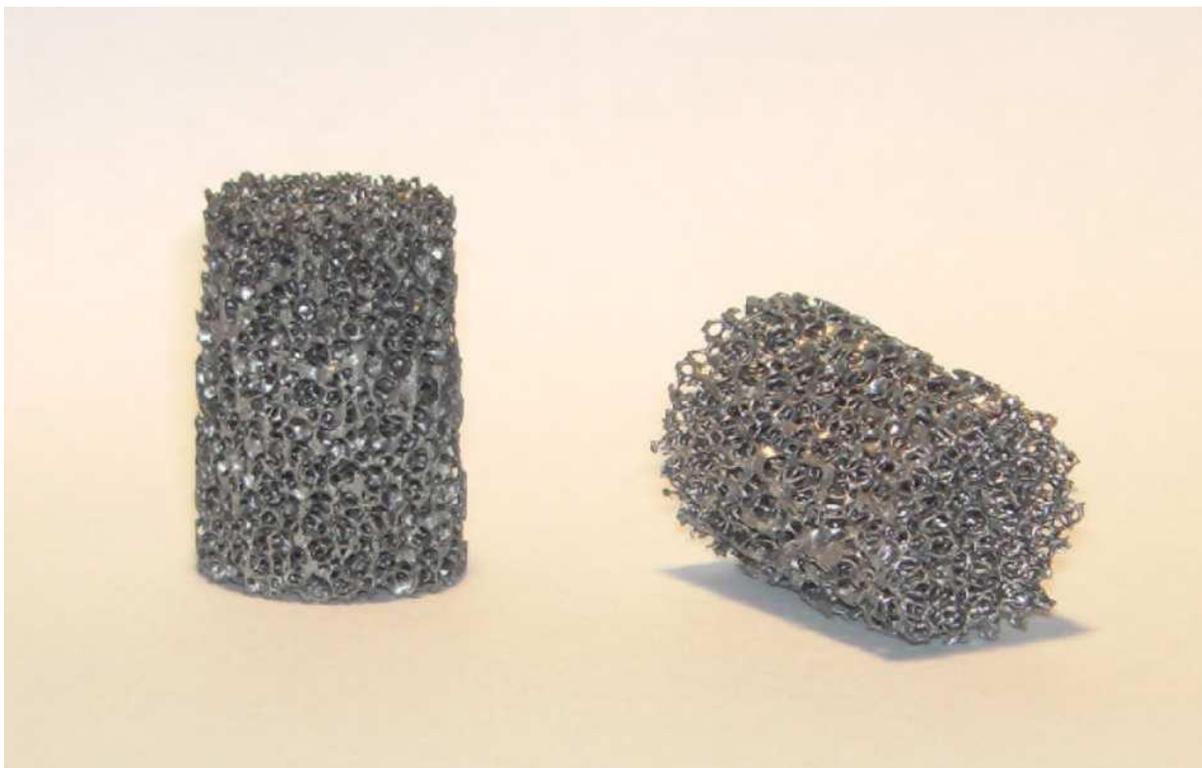


Abbildung 2: offenporiges zelluläres Implantat in konisch/zylindrischer Form, Größe 15x10mm

2.1.5. Narkoseverfahren

Alle Tiere wurden präoperativ über 24 Stunden bei freiem Wasserzugang in Nahrungskarenz gehalten. Als Präventivanalgetikum fand aus der Stoffgruppe der nichtsteroidalen Antirheumatika Meloxicam s.c. mit einer Dosierung von 0,5 mg/ kg Körpergewicht (Metacam, Boehringer Ingelheim, Schweiz) Verwendung.

Danach wurde bei den Tieren eines der beiden Vorderbeine rasiert und eine Venenverweilkanüle gelegt. Darüber erfolgte anschließend die Narkoseeinleitung durch eine Kombinations-Injektion von Diazepam (20 mg/ 100 kg Körpergewicht; Diazepam Desitin Injektionslösung, Desitin Arzneimittel, Deutschland), Xylazin (10-20 mg/ 100 kg Körpergewicht; Narcoxyl Injektionslösung, Veterinaria AG, Schweiz) und Ketaminhydrochlorid (1500 mg/ 100 kg Körpergewicht; Ketavet, Pharmacia & Upjohn GmbH, Deutschland).

Bis zum Ende der Operation wurde die intravenöse Narkose mittels Xylazin und Ketaminhydrochlorid fortgeführt. Zur Kreislaufstabilisierung wurde den Tieren intraoperativ 500 ml NaCl 0,9% als Dauertropfinfusion verabreicht. Unmittelbar postoperativ erfolgte zur Analgesie die Gabe von 0,324 mg Buprenorphin als Analgesie (Temgesic, Essex Pharma GmbH, München, Deutschland).

Die Durchführung des gesamten Narkoseverfahrens oblag einer approbierten Veterinärmedizinerin, die auch über die komplette Dauer der Narkose die Vitalparameter der Tiere überprüfte. Um eine Aspiration von Speichel und regurgitiertem Pansensaft zu verhindern, wurde auf eine korrekte Lagerung geachtet.

2.1.6. Operationstechnik

Nachdem die Tiere narkotisiert waren, wurde die Rasur des linken Hinterbeines vorgenommen. Danach erfolgte die Lagerung in Rechtsseitenlage und eine mehrmalige Desinfektion des Operationsgebietes mit Kodan Tinktur forte (Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt, Deutschland). Ein steril gekleideter Operateur und ein Assistent deckten

das Operationsgebiet mit sterilen Einmalabdeckartikeln ab. Nun erfolgte eine gerade ca. 5 cm lange Inzision über dem medialen Tibiakopf, im Anschluss eine vorsichtige Präparation unter Schonung der Weichteile bis zum Knochen. Im medio-dorsalen Tibiakopf wurde ein kortikales Fenster geschaffen und mit einem Bohrer der Stärke 10mm der Defekt erzeugt. Im Anschluss erfolgte die Implantation des Metallzylinders in press-fit Technik.

Bei der Leerlochgruppe wurde auf das Einbringen des Implantates verzichtet, der gesetzte Knochendefekt jedoch zur Wiederfindung mittels Kirschnerdraht einer Dicke von 1,2 mm randständig an drei Punkten markiert. Im Übrigen wurde das Operationsverfahren analog durchgeführt.

Das darüber liegende Periost wurde mit 3,0 Vicryl-Einzelknopfnähten (Ethicon, Norderstedt, Deutschland) rekonstruiert, die Operationswunde nach schichtweisem Vernähen entlang des Zugangsweges mit einem desinfizierenden Pflasterspray (Nobecutan Spray, Astra GmbH, Wedel, Deutschland) versorgt. Die Operationsdauer betrug ca. 30-45 min. Den Tieren wurde intraoperativ 2,2 g Augmentan i.v. zur Infektionsprophylaxe verabreicht. Regelrecht wurde den Tieren zur weiteren postoperativen Analgesie im zeitlichen Abstand von sechs und zwölf Stunden Buprenorphin und Xylazin appliziert. Diese Schmerzmittel konnten additiv bei erkennbarem Schmerzzustand der Tiere mehrmals verabreicht werden. Weiteren Operationen wurden die Versuchstiere nicht unterzogen. Im Anschluss konnten sie sich zunächst in den Laufboxen und später auf dem Schafhof in artgerechter Gruppenhaltung frei bewegen. Einschränkungen bzgl. der Wasser- und Nahrungsaufnahme gab es nicht.

Abbruchkriterien bzw. Ausschlusskriterien von Versuchstieren im Rahmen der Durchführung wurden als therapieresistente Infektion oder sehr schlechtem Allgemeinzustand des Individuums festgelegt.

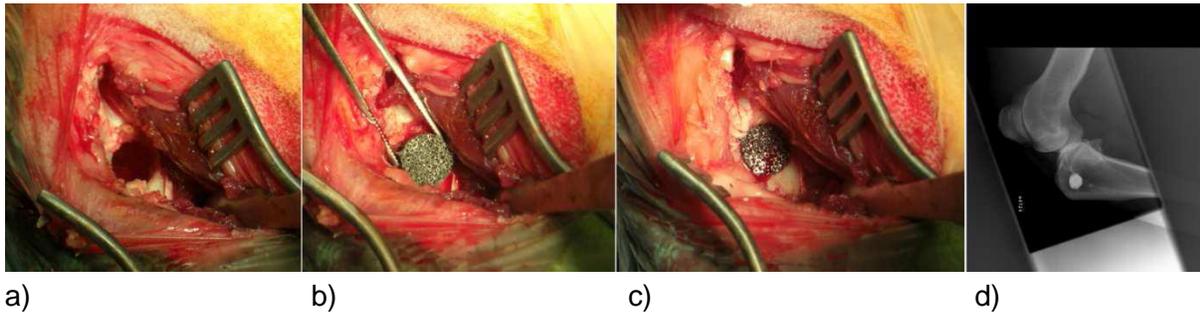


Abbildung 3: a – c: Intraoperativer Situs mit Implantat; d: postoperative Röntgenkontrolle

2.1.7. Blutentnahme und Röntgen

Blutentnahme

Die erste Blutentnahme wurde bei den Tieren unmittelbar präoperativ durchgeführt. Dazu wurde den Tieren aus dem frisch gelegten Venenverweilkatheter jeweils zwei Serum-Blutröhrchen (Serum-Monovette, Sarstedt REF 05.1104 - 4,5 ml) und zwei EDTA-Blutröhrchen (EDTA-Monovette, Sarstedt REF 05.1167 – 2,7 ml) entnommen.

Weitere Abnahmen schlossen sich eine Woche postoperativ (p.o.), nach zwei Wochen, nach sechs Wochen sowie nach der 10., 16., 22., 28., 42. und 52. Woche an. Hierbei wurde die Blutentnahme an der V. jugularis am Hals der Schafe durchgeführt. Dazu wurde das Gefäß getastet, ein kleines Fenster frei rasiert, desinfiziert und schließlich mit einer Safety-Kanüle (0,9x38 mm) der Firma Sarstedt die Entnahme vorgenommen. Im Anschluss wurde durch ausreichende Kompression auf die kleine Einstichstelle einem Nachbluten vorgebeugt. Nach der Kennzeichnung der Proben wurden diese zur Auswertung in das Labor der Klinik für Wiederkäuer nach Oberschleißheim gebracht. Dabei ließen sich die Serumparameter Eisen, Ferritin, Haptoglobin, alkalische Phosphatase, Phosphor, Erythrozyten, Thrombozyten, Leukozyten, Hämoglobin, Hämatokrit und das Differentialblutbild bestimmen.

Röntgen

Es wurden jeweils seitliche Röntgenaufnahmen des linken Knies der Tiere angefertigt. Konventionelle Aufnahmen des Operationsgebietes sind unmittelbar postoperativ gemacht worden und darauffolgend im Abstand von jeweils drei Monaten vom Operationstag bis zum Zeitpunkt der Euthanasie. Die Untersuchung erfolgte in der Tierklinik für Wiederkäuer der Universität München in Oberschleißheim.

2.1.8. Polychrome Fluoreszenzmarkierung

Die polychrome Fluoreszenzmarkierung dient der morphometrischen Erfassung von neugebildetem Knochen. Die intravital verabreichten Fluoreszenzfarbstoffe werden beim Hartgewebeumbau eingebaut und erlauben somit die Identifikation und Analyse des ständigen knöchernen An- und Abbaus. In der vorliegenden Studie wurde hierzu allen Tieren die Substanzen Calceingrün 0,5 %, 1 ml/kg Körpergewicht 8 Wochen vor Euthanasietermin und Xylenolorange 9% 1 ml/kg Körpergewicht 4 Wochen vor Euthanasietermin subkutan injiziert. Mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie lassen sich dadurch Aussagen über das Regenerationsverhalten des Knochens treffen.

2.1.9. Euthanasie und Probeentnahme

Nach Ablauf der Versuchszeiträume, d.h. sechs bzw. zwölf Monate nach Studienbeginn, wurden die Tiere durch eine intravenöse Gabe von 40 ml Pentobarbital (16 g/100 ml) euthanasiert. Nach Todesfeststellung durch einen Veterinärmediziner erfolgte die komplette Sektion der gesamten Versuchstiere in den Räumen des Instituts für Tierpathologie der Veterinärmedizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München (Direktor: Prof. Dr. vet. med. W. Hermanns) durch einen Tierpathologen.

Die Gewinnung des Implantationspräparats wurde durch den Projektleiter Prof. Dr. med. Wegener vorgenommen. Dabei wurde der Weichteilmantel abpräpariert, der Tibiakopf mit dem Defekt bzw. dem Implantat entnommen und in Plastikgefäßen mit 96% Ethanol fixiert. Nach entsprechender Photodokumentation wurden die angrenzenden

Lymphknoten iliofemoral und popliteal von beiden Hinterbeinen des Schafes entnommen. Aus den mesenchymalen Organen der Tiere, Leber, Milz, Niere und dem Gehirn wurden jeweils Stichproben zur Untersuchung gewonnen, weitere Proben wurden in Plastikgefäßen kryokonserviert. Zu jedem Versuchstier erstellte der Tierpathologe einen makroskopisch anatomischen Befund.

Die Präparate wurden in das AO Research Institute Davos/Schweiz gebracht. Dort wurde die weitere Bearbeitung der Präparate sowie Ergebnisauswertung durch den Doktoranden durchgeführt.

2.1.10. Histologische Aufarbeitung der Präparate

Es erfolgte die schrittweise Entwässerung der Präparate, die in einer in der Alkoholkonzentration aufsteigenden Reihe an Ethanol (80%, 96%, 100%) für jeweils ein bis drei Tage eingelegt wurden.

Anschließend wurden die Präparate in Methylmethacrylat eingebettet und konnten nach ca. 3-4 Wochen geschnitten werden. Nach dem Schneiden auf eine Dicke von ca. 300 µm (LEITZ 1600 Saw microtome) wurden die Schnitte bezüglich ihrer Beschaffenheit beurteilt.

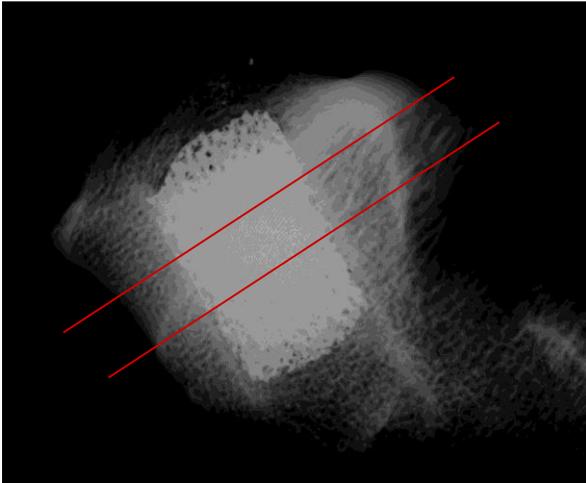


Abbildung 4: Schnitt Ebenen für die Auswahl histologischer Schnitte

Dazu wurden von den erstellten Schnitten der einzelnen Präparate Kontakt-Radiographien angefertigt (Faxitron 804). Anschließend wurden die entstandenen Bildsequenzen mit einer Pixelgröße von 5,0658 μm digitalisiert und erfasst (Zeiss AxioCam HRC, Zeiss Axiovision Version 4.6, Kaiser Leuchtfeldplatte, Leica Macrofluor).

Mit Hilfe der Kontakt-Radiographien konnten nun repräsentative Schnitte nach den Kriterien einer ausreichenden Darstellung von Implantat und umgebenden Knochenmaterial, auf Höhe des halben Implantatzylinders ausgewählt werden. Die Auswahl erfolgte in innerhalb einer Tiergruppe und zwischen den einzelnen Tiergruppen vergleichbarer Weise. Jeweils zwei Schnitte pro Präparat wurden selektiert.

Die Schnitte wurden weiterhin mit einem Mikrometer vermessen und auf einen Plastikobjektträger geklebt. Mit der EXAKT-Schleifmaschine wurden diese auf ca. 100 μm Dicke geschliffen, gefolgt von einer ca. fünfminütigen Polierzeit.

Einer der so entstandenen Schnitte wurde zur Fluoreszenzmikroskopie herangezogen, der andere für die Färbung mit Giemsa-Eosin verwendet. Um ein Ausbleichen der Fluoreszenzfarbstoffe zu verhindern, wurden die Präparate lichtgeschützt aufbewahrt.

2.1.11. Qualitativ deskriptive Durchlicht- und Epifluoreszenzmikroskopie

Es wurden sowohl die Giemsa-Eosin gefärbten Schnitte, als auch die fluoreszenzmarkierten Schnitte in der Durchlichtmikroskopie (Zeiss Axioplan-2-imaging, Zeiss AxioCam HRc, Zeiss Axiovision V 3.1) durch den Doktoranden unter der Supervision des Histologen Prof. Dr. med. Stefan Milz bewertet. Die Bildaufnahmen wurden mit der Digitalkamera AxioCamR HRc (Carl Zeiss, Göttingen) durchgeführt und gespeichert.

Fünf Kriterien wurden untersucht:

- 1) sichtbare Reaktion des umgebenden Lagerknochens
- 2) vorhandenes Osteoid, nicht oder bereits beginnend mineralisiert
- 3) bräunlicher Niederschlag im Implantatbereich als mögliches Kriterium für Siderophagen/Abbauprodukte des Implantates
- 4) Vorhandensein von phagozytierenden Riesenzellen
- 5) gegebene Porigkeit des Implantates

Die Ergebnisqualität wurde in drei Kategorien festgehalten: positiv (vorhanden/sichtbar), negativ (nicht vorhanden/nicht sichtbar) und schwach positiv (beginnend vorhanden/teilweise sichtbar)

Die Ergebnisse wurden in entsprechenden tabellarischen Auflistungen festgehalten.

2.1.12. Quantitative Analyse der Kontaktradiographien

In die digital erfassten Kontaktradiographien wurden fünf standardisierte, in ihren Radien differierende Kreis- bzw. Ringkonturen eingezeichnet, Region of Interest (ROI), welche ihren Mittelpunkt jeweils im Zentrum des Implantats bzw. des Defekts haben.

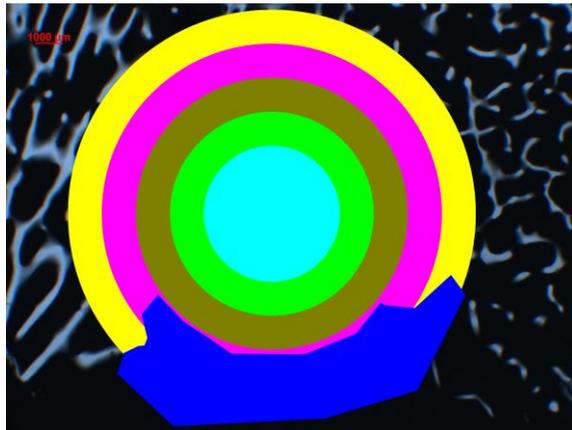
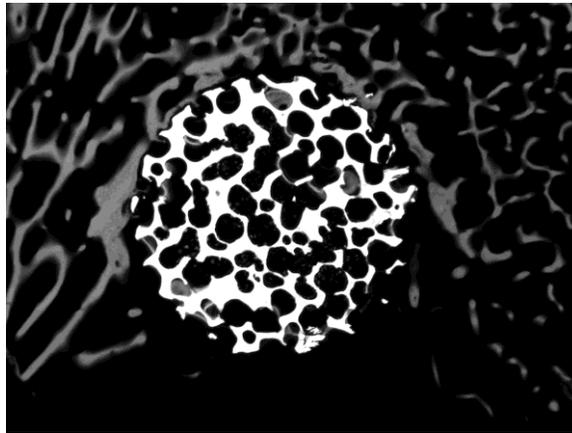


Abbildung 5: zuerst dargestellt eine repräsentative Kontaktradiographie, darunter der gleiche Querschnitt unter Einblendung der ROI

- **Definition der „Region of Interest“ (ROI) mit Hilfe von Ringkonturen:**
 - ⇒ 1.ROI: *hellblau (Aqua)* = Kreiskontur mit Durchmesser 5 mm
 - ⇒ 2.ROI: *grün (Limette)* = Ringkontur mit Durchmesser 7,5 mm
 - ⇒ 3.ROI: *hellbraun (Olive)* = Ringkontur mit Durchmesser 10 mm
 - ⇒ 4.ROI: *pink (Fuchsin)* = Ringkontur mit Durchmesser 12,5 mm
 - ⇒ 5.ROI: *gelb (Yellow)* = Ringkontur mit Durchmesser 15 mm
 - ⇒ Dunkelblaue Kontur = Korrekturfläche auf Grund von Ausnahmekriterien
(z.B. Implantat / Leerloch im Markraum, nicht von Spongiosa umgeben)

Die Messung der Knochen- und der Implantatfläche in den einzelnen Regionen basierte auf der Erkennung von Grauwerten. So erschien vorliegendes Metall als weiß (sehr dichte Struktur) und Knochen als grau (nicht derart dicht); als schwarz wurde weder Implantat noch Knochen erkannt (Programm Macro KS 400). Die Schwell- bzw. Grenzwerte dieser genannten Bereiche wurden von jeweils derselben Person nach gleichen Maßstäben gesetzt. So konnte für jede ROI der jeweilige Knochen- bzw. Implantatanteil an seiner Gesamtfläche ermittelt werden.

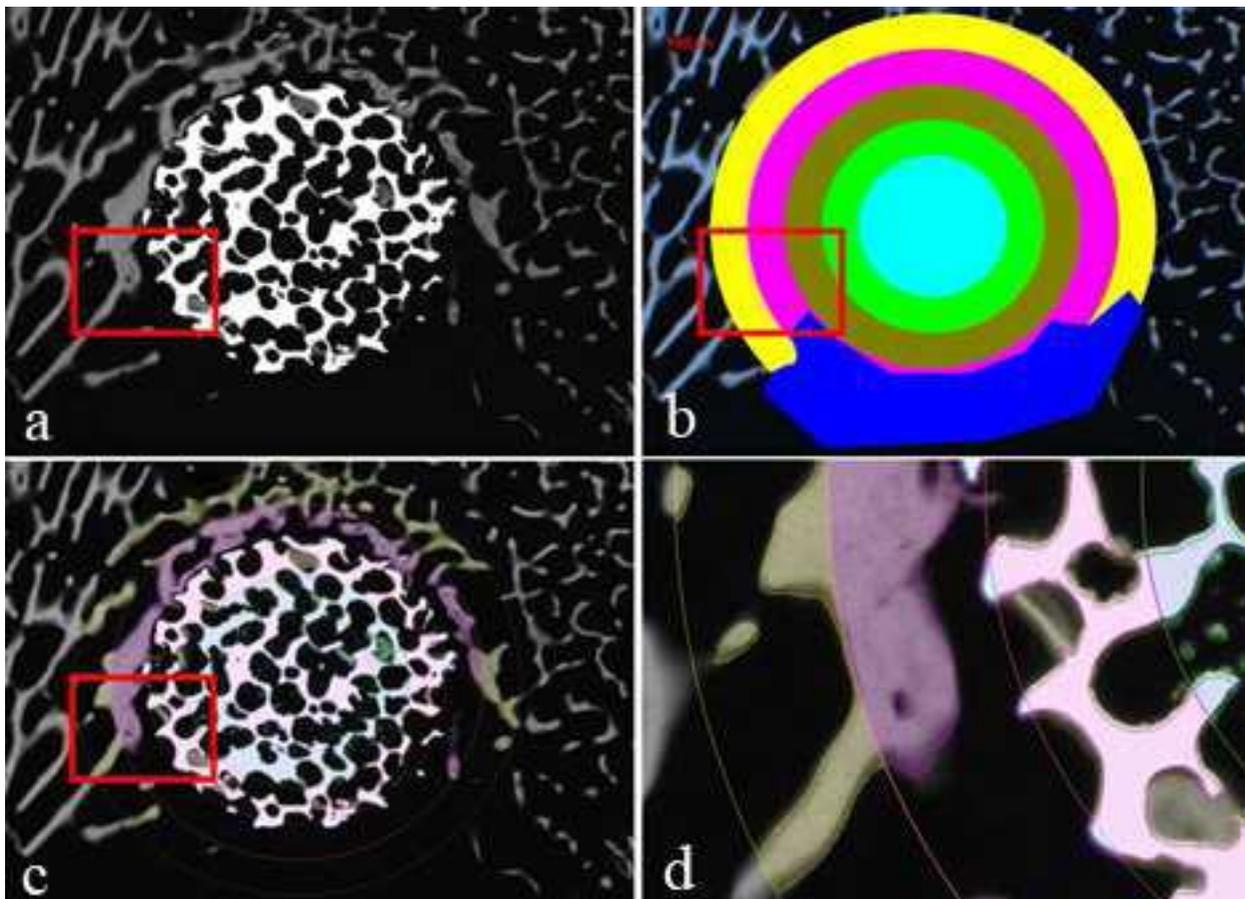


Abbildung 6: Repräsentative Kontaktradiographie eines MMA eingebetteten, nicht entkalkifizierten Schnittes 6 Monate nach Implantation. Das rote Rechteck kennzeichnet stets die gleiche Region:

(a) transversaler Schnitt durch das Implantat und den umgebenden spongiösen Knochen (b) Region of Interest (ROI) für die Bildanalyse auf die gleiche Abbildung wie in (a) projiziert. Die Bildanalyse wurde in konzentrischen Ringen durchgeführt, wobei die drei inneren Ringe das Implantat darstellen und die äußeren beiden Ringe den umgebenden Knochen erfassen. Die blaue Region beschreibt einen Teil des Bildes, der von der Auswertung ausgeschlossen wurde, da er primär nicht von spongiösem Knochen umgeben war und an den Markraum grenzte.

(c) Gleiche Abbildung wie in (b) aber mit transparenten Ringen, um die darin liegenden Strukturen darzustellen. (d) In größerer Auflösung sind Knochen- und Implantatstruktur besser beurteilbar. Das Schraffurmuster des Overlays zeigt Regionen, die nach ihrer Dichte für die Analyse ausgewählt wurden.

2.1.13. Statistische Aufarbeitung

Die statistische Auswertung wurde mit dem Statistikprogramm SPSS Statistics Version 20 (IBM Deutschland GmbH, Ehningen, Deutschland) durchgeführt. Dabei erfolgte eine unterstützende Beratung durch das Institut für Medizinische Informationsverarbeitung, Biometrie und Epidemiologie der Medizinischen Fakultät an der Ludwig-Maximilians-Universität München.

3. Ergebnisse

Im Verlauf des Projektes wurden drei verstorbene Tiere aus dem Auswertungsverfahren ausgeschlossen. Unter Einbezug der Reservetiere ergab sich schließlich folgende Gruppeneinteilung:

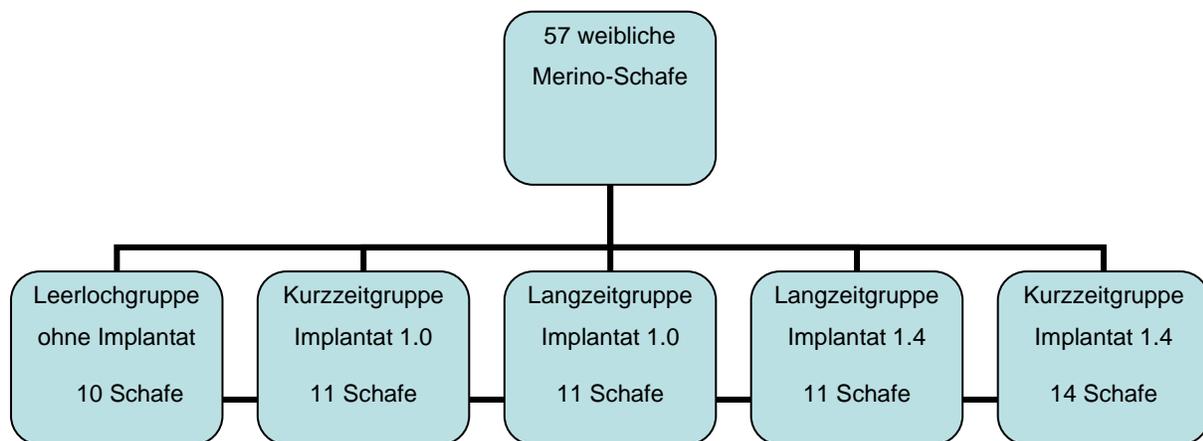


Abbildung 7: Übersicht der Gruppeneinteilung nach Ablauf der Versuchszeiträume

Die ungleiche Anzahl an Versuchstieren in den Gruppen entstand im Verlauf des Projektes. Dabei verstarben insgesamt drei Schafe, wobei zwei der Leerlochgruppe und eines der Kurzzeitgruppe 1,0 zuzuordnen waren. Das erste Tier der Leerlochgruppe verstarb während der Narkose bei eingetretenen Komplikationen. Die beiden weiteren nach einem Zeitraum von einem bzw. drei Monaten postoperativ. Als wahrscheinlichste Todesursache ist von einer Pneumonie auszugehen. Insbesondere bei der Kurzzeitgruppe 1.4 kam es postoperativ gehäuft zu Lungenentzündungen, sodass frühzeitig Antibiotika auch erfolgreich eingesetzt wurde. Wegen der aufgetretenen Erkrankung von Tieren an Pneumonien, die bei Schafen trotz Therapie sehr oft nicht überlebt wird, wurden frühzeitig Ersatztiere eingeschlossen. Dadurch ist die Gruppenstärke von 14 Tieren argumentiert.

3.1. Röntgenbefunde

Jeweils drei konventionelle Röntgenuntersuchungen der Implantatgruppen wurden durchgeführt. Die erste Untersuchung erfolgte unmittelbar postoperativ, die weiteren folgten jeweils im Abstand von drei bis vier Monaten.

Dabei konnte bei einem Schaf der Kurzzeitgruppe 1.4, Histonummer 22928, ein disloziertes Implantat festgestellt werden. Die weiteren Röntgenkontrollen ergaben einen regelrechten Befund



Abbildung 8: disloziertes Implantatmaterial Verlaufskontrolle nach 3 Monaten (Schaf Histonummer 22928, Kurzzeitgruppe 1.4)

3.2. Histologische Auswertung

3.2.1. Durchlicht-Mikroskopie

Reaktion Lagerknochen

Leerlochgruppe

In der Leerlochgruppe lässt sich auf Grund des fehlenden Implantats kein Knochenring finden. Die neu gebildete Spongiosa in den Defektbereichen weist eine dem umliegenden Lagerknochen vergleichbare Struktur auf.

Histonummer	Existenz eines Knochenrings um das Implantat (Grenzregion um das Implantat)
22777	0
22778	0
22779	0
22780	0
22781	0
22782	0
22783	0
22784	0
22785	0
22786	0 - (+) (Knochen)

Tabelle1: Reaktion des Lagerknochens um das Implantat in der Leerlochgruppe

Kurzzeitgruppe Implantat 1.0

Bei allen elf Präparaten dieser Gruppe lässt sich um das Implantatbereich eine verstärkte Knochenbildung nachweisen. Dabei kam es in vier Fällen zu einer inkompletten Ausbildung des Knochenrings, bei den restlichen sieben Tieren war dieser als ´komplett` und durchgehend zu bewerten. Dabei konnte ein Präparat mit einer sehr massiven Knochenbildung in der Grenzregion um das Implantat detektiert werden.

Histonummer	Existenz eines Knochenrings um das Implantat (Grenzregion um das Implantat)
22787	+
22788	inkomplett (30%) (+)
22789	+
22790	+
22791	inkomplett (+)
22792	inkomplett (+)
22793	+
22794	inkomplett (+)
22795	++
22796	+ (Osteolyse)
22917	+

Tabelle2: Reaktion des Lagerknochens um das Implantat in der Kurzzeitgruppe 1.0

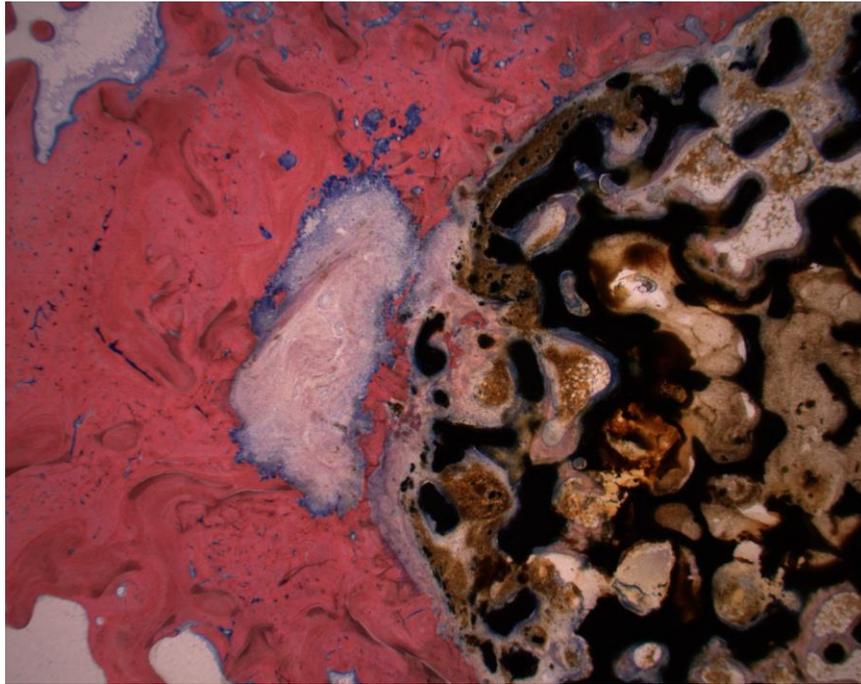


Abbildung 9 (Histonummer 22795, GE): links deutlich verdichteter mineralisierter Knochenring (rot), der in Kontakt mit dem spongiösen Implantatzylinder (schwarz, rechts) eine beginnende knöcherne Verankerung aufweist.

Kurzzeitgruppe 1.4

Das Präparat mit der Histonummer 22928 konnte nicht unter dem angegebenen Kriterium bewertet werden, da bei diesem Tier das Implantat disloziert ist.

In den verbliebenen 13 Fällen liegt ein Knochenring vor, wobei sich acht inkomplette und fünf komplette Ausprägungen unterscheiden lassen.

Histonummer	Existenz eines Knochenrings um das Implantat Grenzregion um das Implantat
22918	+
22919	inkomplett (+)
22920	inkomplett (+)
22921	+
22922	inkomplett (+)
22923	+
22924	+
22925	inkomplett (+)
22926	inkomplett (+)
22927	inkomplett (+)
22928	0
22929	inkomplett (+)
22930	+
22931	inkomplett (+)

Tabelle 3: Reaktion des Lagerknochens um das Implantat in der Kurzzeitgruppe 1.4

Langzeitgruppe 1.0

Bei allen Tieren dieser Gruppe ist die Existenz eines Knochenrings gegeben, in neun von elf Fällen ist eine komplette, das Implantat gänzlich umgreifende Ausprägung zu verzeichnen.

Histonummer	Existenz eines Knochenrings um das Implantat Grenzregion um das Implantat
23066	inkomplett (+)
23067	+
23068	+
23069	+
23070	+
23071	+
23072	inkomplett (+)
23073	+
23074	+
23075	+
23076	+

Tabelle 4: Reaktion des Lagerknochens um das Implantat in der Langzeitgruppe 1.0

Langzeitgruppe 1.4

Das bewertete Kriterium zeigt sich in dieser Gruppe in zehn von elf Präparaten als komplett vorhanden, bei einem Fall lässt sich ein inkompletter Status erheben.

Histonummer	Existenz eines Knochenrings um das Implantat Grenzregion um das Implantat
23171	inkomplett (+)
23172	+
23173	+
23174	+
23175	+
23176	+
23177	+
23178	+
23179	+
23180	+
23181	+

Tabelle 5: Reaktion des Lagerknochens um das Implantat in der Langzeitgruppe 1.4

Osteoidbildung (Lagerknochen/Implantat J/N)

Leerlochgruppe

Wegen fehlendem Implantat lässt sich in dieser bewerteten Kategorie kein Osteoid nachweisen. Im den Defekt umgebenden Lagerknochen können in zwei von elf Präparaten marginale, nicht mineralisierte Osteoidbildung konstatiert werden.

Histonummer	Osteoid (nicht mineralisiert)	
	Im Implantat	Lagerknochen
22777	0	0 - (+)
22778	0	0 - (+)
22779	0	0
22780	0	0
22781	0	0
22782	0	0
22783	0	0
22784	0	0
22785	0	0
22786	0	0

Tabelle 6: Osteoidbildung in der Leerlochgruppe

Kurzzeitgruppe 1.0

Das Präparat mit der Histonummer 22788 konnte nicht unter den hier beschriebenen Kriterien bewertet werden, da das Implantat in den Markraum disloziert ist. Bei den restlichen zehn Fällen lässt sich Osteoid im Implantatbereich nachweisen, darunter bei drei Tieren in ausgeprägter Form. In einem Präparat ist bereits eine beginnende Mineralisierung des neu gebildeten Osteoids zu erkennen.

Bezüglich der Bewertung des Lagerknochens konnte hier in insgesamt fünf von zehn Fällen eine Knochenneubildung festgehalten werden, in vier weiteren Präparaten lässt sich diese nur marginal erheben, bei einem Schnitt fehlt sie gänzlich.

Histonummer	Osteoid (nicht mineralisiert)	
	Im Implantat	Lagerknochen
22787	++	0 - (+)
22788	0	0
22789	++	+
22790	+ (außen)	+
22791	+ (außen)	0 - (+)
22792	+	0 - (+)
22793	+	0 - (+)
22794	+	0
22795	++ (teils mineralisiert)	+
22796	+	+
22917	+	+

Tabelle 7: Osteoidbildung in der Kurzzeitgruppe 1.0

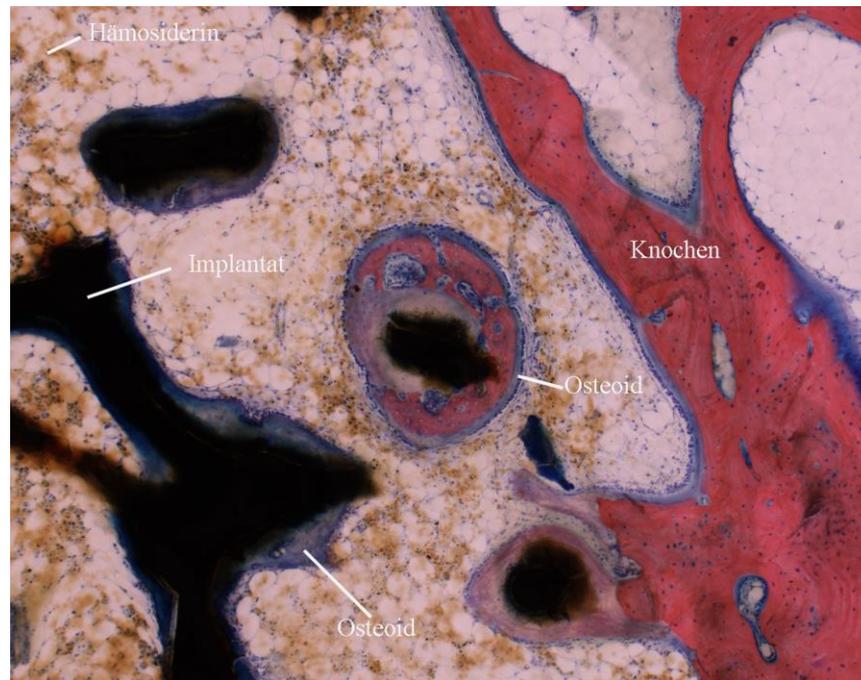


Abbildung 10 (Histonummer 22795, GE): Randbereich eines Implantats mit angrenzendem Implantatlager: sowohl um das Implantat wie auch um den angrenzenden Lagerknochen findet sich (blau angefärbtes) Osteoid, welches von deutlich erkennbaren Osteoblastensäumen (perlschnurartig angeordnete Zellen) angelagert wird.

Kurzzeitgruppe 1.4

Das Präparat Histonummer 22928 muss unter den genannten Kriterien von einer Bewertung auf Grund des dislozierten Implantats ausgeschlossen werden.

Bei den restlichen 13 Tieren lassen sich im Implantatbereich ausnahmslos nicht mineralisierte Osteoidanteile nachweisen, bei zwei Präparaten nur sehr marginal.

Im Lagerknochen besteht eine ebenfalls noch nicht mineralisierte Knochenneubildung bei zwölf von 13 Tieren in einer untereinander vergleichbaren Ausprägung.

Histonummer	Osteoid (nicht mineralisiert)	
	Im Implantat	Lagerknochen
22918	+	+
22919	0 - (+)	+
22920	+	+
22921	0 - (+)	+
22922	+	+
22923	+	+
22924	+	+
22925	+	+
22926	+	+
22927	+	+
22928	0	0
22929	+	0
22930	+	+
22931	+	+

Tabelle 8: Osteoidbildung in der Kurzzeitgruppe 1.4

Langzeitgruppe 1.0

In dieser Gruppe findet sich in allen Präparaten im Implantatbereich eine noch nicht mineralisierte Osteoidbildung, in zwei der 11 Fälle ist diese im Vergleich zum Gruppendurchschnitt etwas geringer ausgeprägt.

Im Lagerknochen ist bei sieben Tieren eine Knochenneubildung zu verzeichnen, bei den restlichen vier Proben muss dieses Kriterium negativ bewertet werden.

Histonummer	Osteoid (nicht mineralisiert)		
	Im Implantat		Lagerknochen
23066	0- (+)		+
23067	+		0
23068	0 - (+)		0
23069	+		0
23070	+		+
23071	+		+
23072	+		0
23073	+		+
23074	+		+
23075	+		+
23076	+		+

Tabelle 9: Osteoidbildung in der Langzeitgruppe 1.0

Langzeitgruppe 1.4

Bei zehn von elf Tieren kann in dieser Gruppe im spongiösen Implantat eine Osteoibildung registriert werden, in vier Fällen sind die neugebildeten Knochenstrukturen bereits mineralisiert.

Betrachtet man den Lagerknochen, so lässt sich hier in allen Proben Osteoid finden, wenn auch in drei Fällen sehr marginal.

Histonummer	Osteoid (nicht mineralisiert)		
	Im Implantat	Im Implantat mineralisiert	Lagerknochen
23171	+		+
23172	++		+
23173	+	(mineralisiert)	+
23174	+	(mineralisiert)	+
23175	+		+
23176	+	(mineralisiert)	+
23177	+	(mineralisiert)	+
23178	0 - (+)		0 - (+)
23179	+		+
23180	(+)		0 - (+)
23181	0		0 - (+)

Tabelle 10: Osteoidbildung in der Langzeitgruppe 1.4

Bräunlicher Niederschlag / Nachweis Degradationspartikel

Leerlochgruppe

Auf Grund des fehlenden Implantates lassen sich keine Degradationspartikel finden.

Histonummer	Bräunlicher Niederschlag (intra- wie extrazellulär)	
	Im Implantat	Lagerknochen
22777	0	0
22778	0	0
22779	0	0
22780	0	0
22781	0	0
22782	0	0
22783	0	0
22784	0	0
22785	0	0
22786	0	0

Tabelle 11: Bräunlicher Niederschlag in der Leerlochgruppe

Kurzzeitgruppe Implantat 1.0

Bei zehn von elf Präparaten lässt sich ein bräunlicher Niederschlag im Implantatbereich nachweisen.

Im Lagerknochen konnten in einem Präparat Degradationspartikel gefunden werden. Jenes weist alleinig in dieser Gruppe keine Ablagerung im Implantatbereich auf.

Histonummer	Bräunlicher Niederschlag (intra- wie extrazellulär)	
	Im Implantat	Lagerknochen
22787	+	0
22788	+(außen)	0
22789	+(innen)	0
22790	+(außen)	0
22791	+(außen)	0
22792	+(außen)	0
22793	0	+
22794	+(außen)	0
22795	+	0
22796	+	0
22917	+	0

Tabelle 12: Bräunlicher Niederschlag in der Kurzzeitgruppe 1.0

Kurzzeitgruppe Implantat 1.4

Das Präparat (Histonummer 22928) muss wie beschrieben wegen Dislokation von der Auswertung ausgeschlossen werden.

Bei den verbleibenden 13 Tieren lässt sich bei zwölf im Implantatbereich ein bräunlicher Niederschlag finden. In der Betrachtung des Lagerknochens gelingt ein Nachweis bei keinem Präparat.

Histonummer	Bräunlicher Niederschlag (intra- wie extrazellulär)	
	Im Implantat	Lagerknochen
22918	+	0
22919	+	0
22920	0	0
22921	+	0
22922	+	0
22923	+	0
22924	+	0
22925	+	0
22926	+	0
22927	+	0
22928	0	0
22929	+	0
22930	+	0
22931	+	0

Tabelle 13: Bräunlicher Niederschlag in der Kurzzeitgruppe 1.4

Langzeitgruppe Implantat 1.0

Bei allen elf Präparaten lässt sich im Implantatbereich ein bräunlicher Niederschlag feststellen. Im Lagerknochen findet sich dieses Kriterium bei keinem Präparat.

Histonummer	Bräunlicher Niederschlag (intra- wie extrazellulär)	
	Im Implantat	Lagerknochen
23066	+	0
23067	+	0
23068	+	0
23069	+	0
23070	+	0
23071	+	0
23072	+	0
23073	+	0
23074	+	0
23075	+	0
23076	+	0

Tabelle 14: Bräunlicher Niederschlag in der Langzeitgruppe 1.0

Langzeitgruppe 1,4

Im Implantatbereich ist bei acht Präparaten ein bräunlicher Niederschlag festzustellen, bei drei Proben muss dieses Kriterium als negativ bewertet werden. Bei allen Präparaten findet sich im Lagerknochen ein Nachweis für Degradationspartikel.

Histonummer	Bräunlicher Niederschlag (intra- wie extrazellulär)	
	Im Implantat	Lagerknochen
23171	+	+
23172	+	+
23173	+	+
23174	+	+
23175	+	+
23176	+	+
23177	+	+
23178	0	+
23179	+	+
23180	0	+
23181	0	+

Tabelle 15: Bräunlicher Niederschlag in der Langzeitgruppe 1.4

Phagozytierende Riesenzellen

Leerlochgruppe

Bei keinem Präparat dieser Gruppe konnten in der markierten Defektzone multinukleäre Riesenzellen gefunden werden.

Kurzzeitgruppe 1.0

In allen elf Präparaten dieser Gruppe lassen sich phagozytierende Riesenzellen finden. In vier Fällen liegt eine starke Ausprägung dieses Kriteriums vor (Histonummer 22787, 22793, 22794, 22796).

Kurzzeitgruppe 1.4

Erneut muss das Präparat Histonummer 22928 wegen Dislokation von der Bewertung ausgeschlossen werden. Bei den restlichen 13 Tieren lässt sich das Kriterium in vergleichbarer Ausprägung positiv bewerten.

Langzeitgruppe 1.0

Bei allen Präparaten finden sich phagozytierende Riesenzellen vergleichbarer Anzahl.

Langzeitgruppe 1.4

In allen Fällen gelingt der Nachweis des Kriteriums, wobei in einem Präparat eine geringe Ausprägung festzuhalten ist (Histonummer 23181).

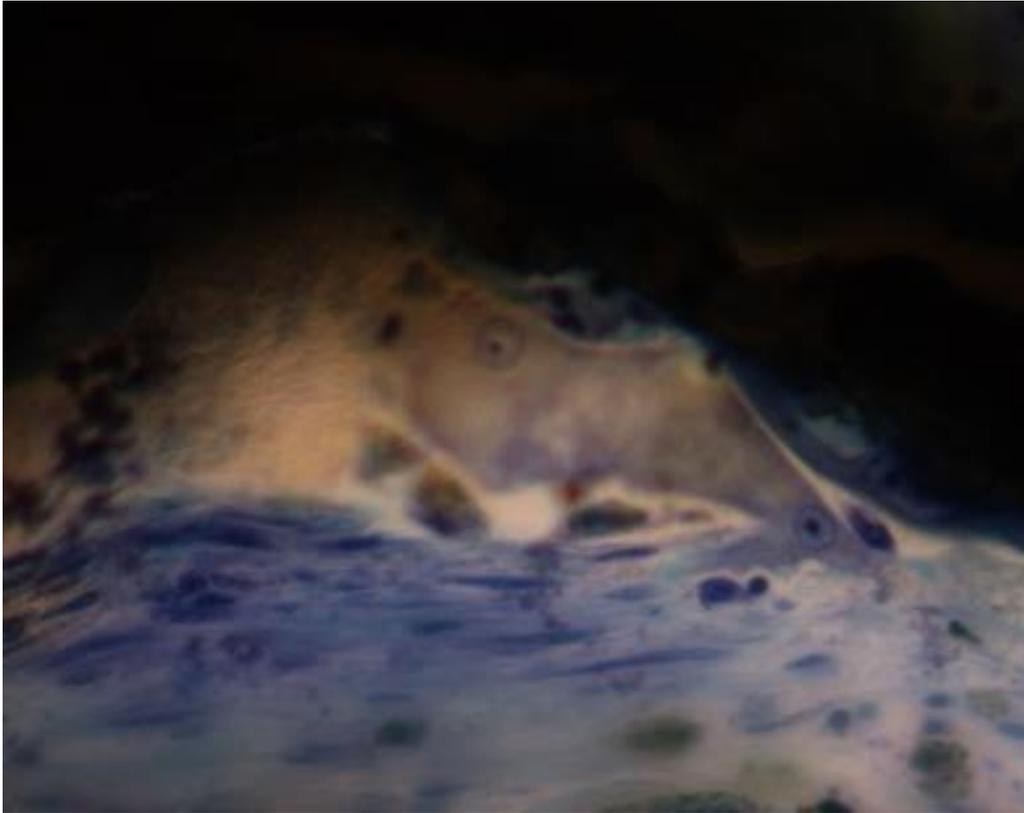


Abbildung 11: Mehrkernige Riesenfresszelle im Übergang Bindegewebe-Implantat im Maßstab 50 $\mu\text{m}/\text{cm}$ (Zellkerne stark gefärbt)

Offenporigkeit des Implantates

Leerlochgruppe

In dieser Gruppe entfällt der Parameter, da kein Implantat vorhanden ist.

Kurzzeitgruppe 1.0

Bei vier der elf Präparate war eine Offenporigkeit gegeben. Die verbleibenden sieben Fälle wiesen in den Schnitten nicht offenporige Bereiche auf. Bei einem Präparat war dies nur marginal im Zentrum des Implantates festzustellen.

Kurzzeitgruppe 1.4

Nicht in die Auswertung konnte wiederum das Präparat mit der Dislokation aufgenommen werden (Histonummer 22928). Die restlichen elf Proben wiesen alle einen Bereich einer nicht gegebenen Offenporigkeit auf. Dabei hob sich ein Präparat bei nahezu erreichter Offenporigkeit von dem Durchschnitt der Gruppe ab (Histonummer 22926).

Langzeitgruppe 1.0

Bei allen Präparaten (n=11) findet sich eine vergleichbar eingeschränkte Offenporigkeit mit stärkster Ausprägung im zentralen Implantatbereich.

Langzeitgruppe 1.4

Alle elf Präparate weisen in gegebener Homogenität eine defizitäre Offenporigkeit auf. Die Offenporigkeit nimmt wiederum in der Implantatperipherie/Randbereichen zu.

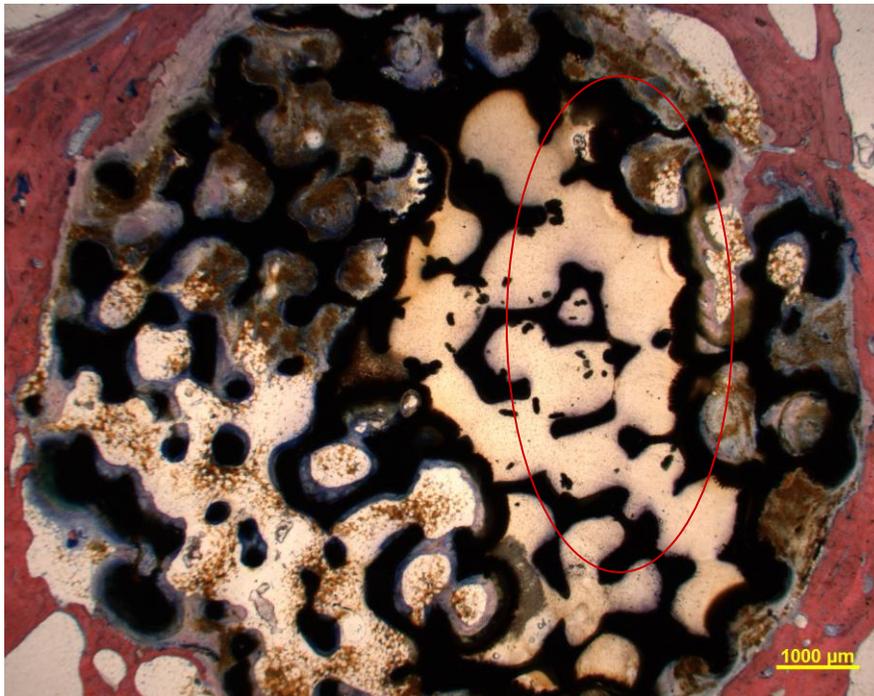


Abbildung 12 (Histonummer 22924, GE): nicht offenporiger Bereich eines Implantates (rot umrandet) als in sich abgeschlossener Raum

3.2.2. Fluoreszenzmarkierung

Bei den Versuchsgruppen wurden die Fluoreszenzmarkierungen mit Calceigrün 0,5% (1 ml/kg Körpergewicht) acht Wochen vor Euthanasie und Xylenolorange 9% vier Wochen vor Euthanasie (1 ml/kg Körpergewicht) zeitgerecht durchgeführt. Im Rahmen der Auswertung gelang bei nur wenigen Bildern ein beispielhafter Nachweis von fluoreszierenden Knochenbanden. Die Grundlage für eine statistisch fundierte Auswertung war daher nicht gegeben.

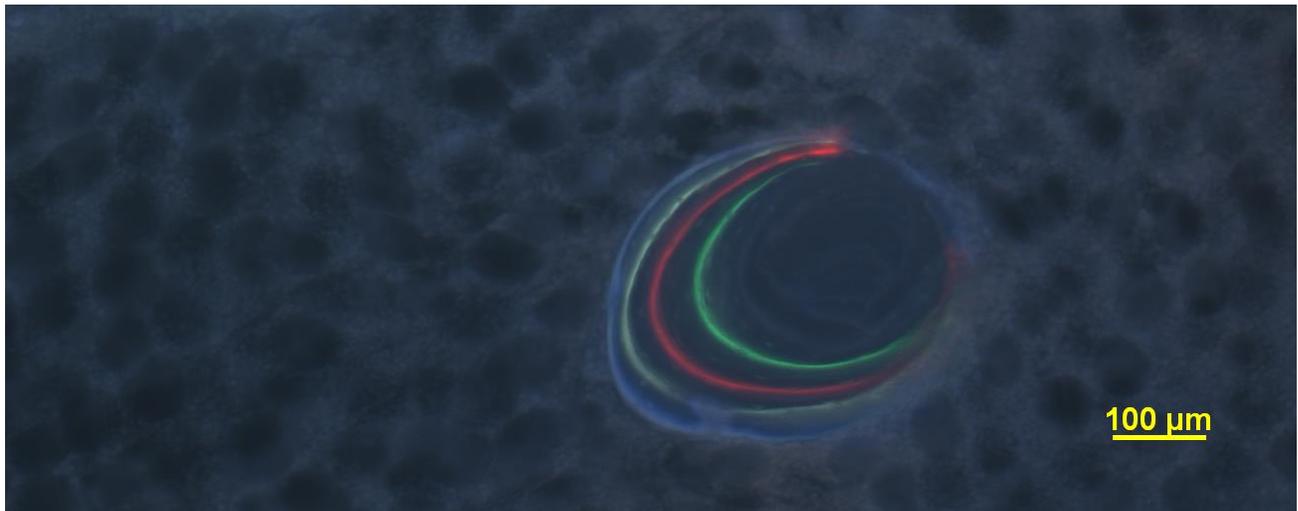


Abbildung 13: histologische Darstellung der Fluoreszenzbanden von Calceingrün und Xylenolorange in einem Tier der Langzeit-Gruppe Implantat 1.0 (Histonummer 23059)

3.3. Quantitative Analyse der Kontaktradiographien

Gesamtbetrachtung

Die folgenden Graphiken stellen den Verlauf des als Knochen identifizierten Gewebes der Kurz- und Langzeitgruppe 1.0 sowie 1.4 dar.

Die Farben „Olive“, „Lime“ und „Aqua“ kennzeichnen die entsprechen ROI im Implantatbereich. „Yellow“ und „Fuchsia“ stellen Ringe im spongiösen Knochen dar, welcher die Implantatzone unmittelbar umgibt (periimplantär). Letztere Kurven beginnen erst bei sechs Monate, da kein Wert für spongiösen Schafsknochen im Op-Gebiet zum Zeitpunkt Null ermittelt werden kann.

Die drei Implantatkurven beginnen zu Anfang der Studie nicht beim Nullpunkt, sondern bei einem detektierten prozentualen Knochenanteil von etwa 5,7%. Für die Erhebung diese Wertes wurde je ein Rohling der Dichten $1,0 \text{ g/cm}^3$ und $1,4 \text{ g/cm}^3$ dem gleichen

Auswertungsprocedere unterworfen, welches zum späteren Zeitpunkt bei den Präparaten zur Anwendung gekommen ist (vgl. Material und Methode II.1.9). Das automatisierte Auswertungsverfahren erkennt Gewebe dann als Knochen, wenn das entsprechende Gewebe einem definierten Graubereich entspricht.

Bei der automatisierten radiologischen Auswertung der Rohlinge entstehen systemimmanent an den Grenzen des porigen Implantats, beim Übergang von dichtem zu undichtem Milieu, auflösungsbedingt genau solche Graubereichszonen im Sinne von technisch unvermeidbaren Artefakten, die das Auswertungsverfahren fälschlicherweise als Knochen identifiziert. Man spricht von einem *Partial Volume-Effekt*. Dieser entspricht im durchgeführten Projekt bei beiden Implantatdichten in etwa 5,7%

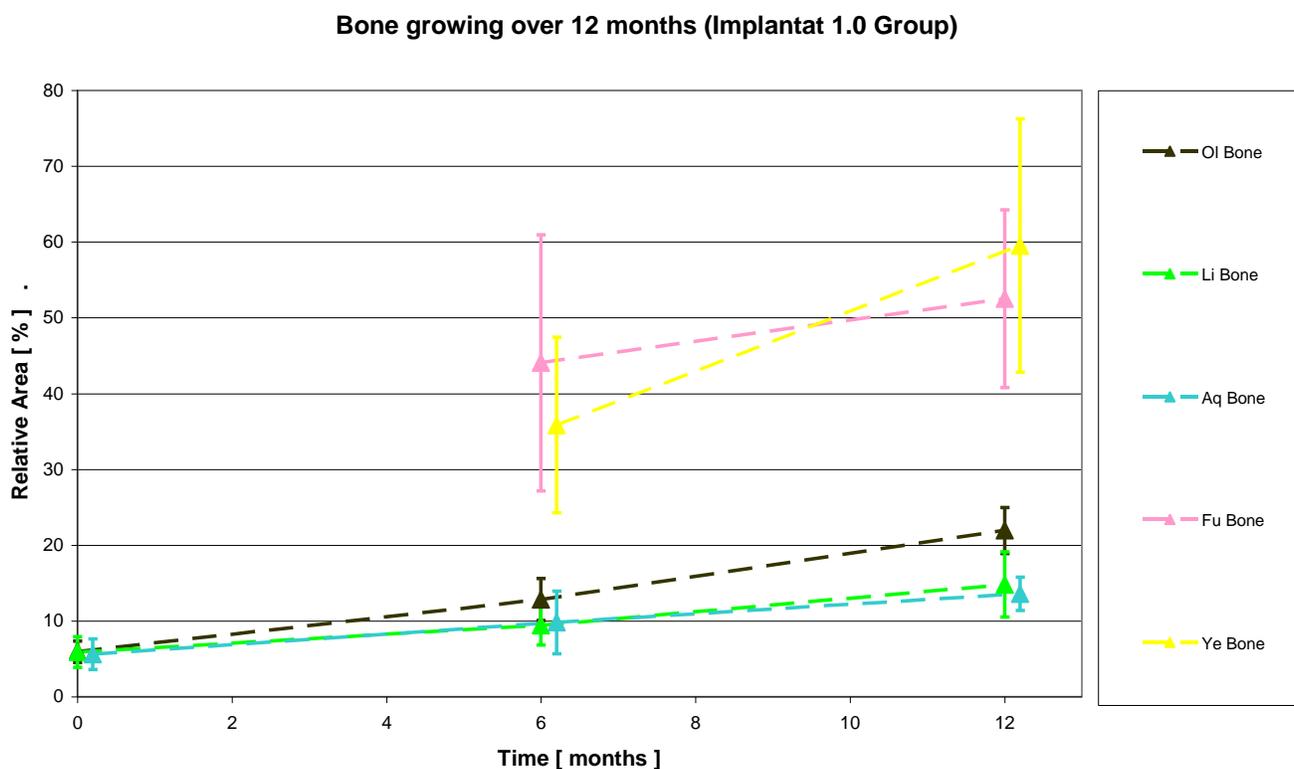


Abbildung 14: Graphische Darstellung der Knochenneubildung der Implantatgruppe 1.0 über den Maximalzeitraum von 12 Monaten. Farblich entsprechen die fünf Kurven den jeweilig definierten ROI.

Bone growing over 12 months (Implantat 1.4 Group)

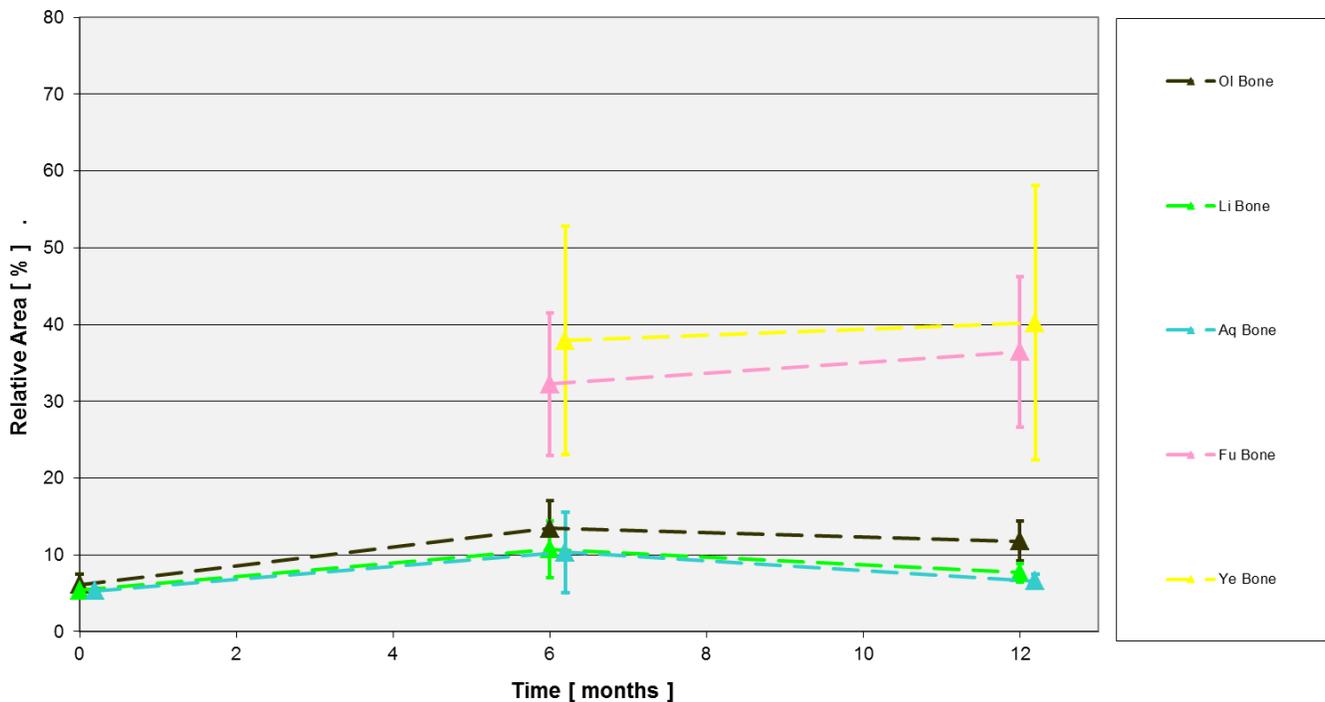


Abbildung 15: Graphische Darstellung der Knochenneubildung der Implantatgruppe 1.4 über den Maximalzeitraum von 12 Monaten. Farblich entsprechen die fünf Kurven den jeweilig definierten ROI.

Zur Beantwortung der Frage, ob sich signifikant mehr Knochen in den einzelnen ROI unter Berücksichtigung des *Partial Volume-Effekts* von 5.7% Knochenanteil in allen Implantatgruppen gebildet hat, wurde der Wilcoxon-Test durchgeführt. Dieser ergibt für die Mediane aller Gruppen im Bereich der einzelnen ROI einen signifikanten Unterschied. Es hat sich signifikant mehr Knochen in den einzelnen ROI gebildet, als durch das Auswertungsverfahren fälschlicherweise als Knochen identifiziert worden ist.

Hypothesis Test Summary

	Null Hypothesis	Test	Sig.	Decision
1	The median of Ye_B equals 5,70	One-Sample Wilcoxon Signed Rank Test	,000	Reject the null hypothesis.
2	The median of Fu_B equals 5,70	One-Sample Wilcoxon Signed Rank Test	,000	Reject the null hypothesis.
3	The median of OI_B equals 5,70	One-Sample Wilcoxon Signed Rank Test	,000	Reject the null hypothesis.
4	The median of Li_B equals 5,70	One-Sample Wilcoxon Signed Rank Test	,000	Reject the null hypothesis.
5	The median of Aq_B equals 5,70	One-Sample Wilcoxon Signed Rank Test	,000	Reject the null hypothesis.

Asymptotic significances are displayed. The significance level is ,05.

Abbildung 16: Wilcoxon-Test über die Mediane der einzelnen ROI aller Gruppen mit Darstellung der signifikanten Unterschiede der Knochenanteile gegenüber dem „Partial Volume“-Effekt

3.3.1. Analytische Betrachtung des neugebildeten Knochens

Yellow

Gibt es einen Zusammenhang zwischen dem prozentualen Knochenanteil im Ring **Yellow** zwischen der Gruppe 1.0 zum Zeitpunkt 6 und 12 Monate?

Ränge

	Gruppe	N	Mittlerer Rang	Rangsumme
Yellow Bone Density	6 Monate Implantat 1.0	11	7,36	81,00
	12 Monate Implantat 1.0	11	15,64	172,00
	Gesamt	22		

Statistik für Test

	Yellow Bone Density
Mann-Whitney-U	15,000
Wilcoxon-W	81,000
Z	-2,988
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,003
Exakte Signifikanz [2*(1- seitig Sig.)]	,002

Im gewählten Mann-Whitney-U Test wird bei einem Testwert von 15,0 und einem p-Wert 0,003 das festgelegte Signifikanzniveau unterschritten. Somit besteht eine signifikante Erhöhung des prozentualen Knochenanteils der ROI Yellow in der Gruppe 1,0 zum Zeitpunkt 12 Monate verglichen mit der 6-Monatsgruppe.

Gibt es einen Zusammenhang zwischen dem prozentualen Knochenanteil im Ring **Yellow** zwischen der Gruppe 1.4 zum Zeitpunkt 6 und 12 Monate?

Ränge

	Gruppe	N	Mittlerer Rang	Rangsumme
Yellow Bone Density	6 Monate Implantat 1.4	14	13,57	190,00
	12 Monate Implantat 1.4	12	13,42	161,00
	Gesamt	26		

Statistik für Test

	Yellow Bone Density
Mann-Whitney-U	83,000
Wilcoxon-W	161,000
Z	-,051
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,959
Exakte Signifikanz [2*(1-seitig Sig.)]	,980

Bei einem Wert von 83 im Mann-Whitney-U Test und einem p-Wert von 0,959 ist das vorgegebene Signifikanzniveau nicht erreicht. Es liegt somit kein signifikanter Unterschied im prozentualen Knochenanteil im ROI Yellow in der Kurz- und Langzeitgruppe 1,4 vor.

Um eine möglichst übersichtliche Darstellung und Vergleichbarkeit der Daten in den einzelnen Gruppen zu erreichen, kommt das Boxplot-Diagramm zur Anwendung.

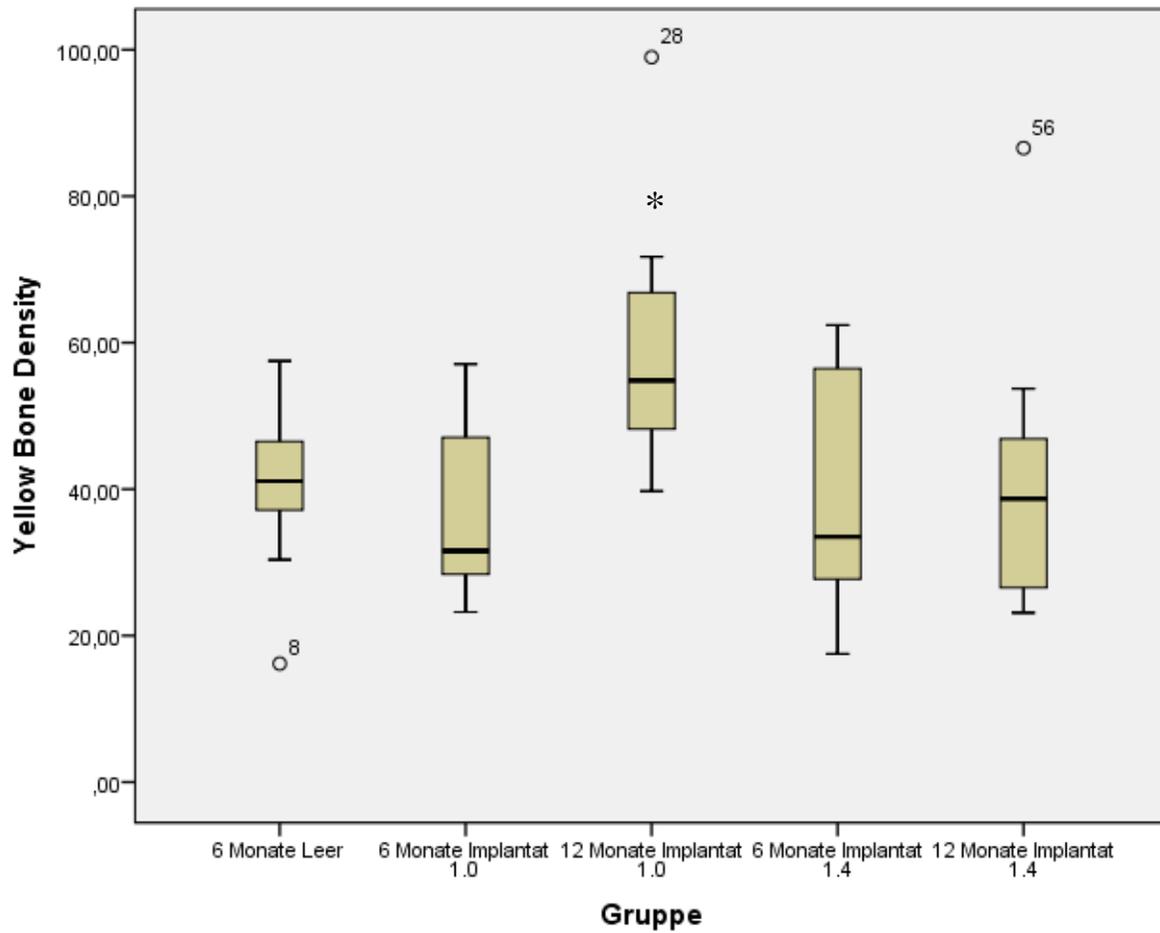


Abbildung 17: Boxplot-Diagramm mit Veranschaulichung des signifikanten Unterschiedes des prozentualen Knochenanteils im ROI Yellow der Kurz- und Langzeitgruppe 1.0

Fuchsia

Gibt es einen Zusammenhang zwischen dem prozentualen Knochenanteil im Ring **Fuchsia** zwischen der Gruppe 1.0 zum Zeitpunkt 6 und 12 Monate?

Ränge

	Gruppe	N	Mittlerer Rang	Rangsumme
Fuchsia Bone Density	6 Monate Implantat 1.0	11	9,64	106,00
	12 Monate Implantat 1.0	11	13,36	147,00
	Gesamt	22		

Statistik für Test

	Fuchsia Bone Density
Mann-Whitney-U	40,000
Wilcoxon-W	106,000
Z	-1,346
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,178
Exakte Signifikanz [2*(1- seitig Sig.)]	,193

Der errechnete p-Wert liegt bei 0,178, der Mann-Whitney-U Test ergibt einen Messwert von 40. Es liegt somit kein signifikanter Unterschied im prozentualen Knochenanteil der ROI Fuchsia zwischen der Kurz- und Langzeitgruppe vor.

Gibt es einen Zusammenhang zwischen dem prozentualen Knochenanteil im Ring **Fuchsia** zwischen der Gruppe 1.4 zum Zeitpunkt 6 und 12 Monate?

Ränge

	Gruppe	N	Mittlerer Rang	Rangsumme
Fuchsia Bone Density	6 Monate Implantat 1.4	14	11,93	167,00
	12 Monate Implantat 1.4	12	15,33	184,00
	Gesamt	26		

Statistik für Test

	Fuchsia Bone Density
Mann-Whitney-U	62,000
Wilcoxon-W	167,000
Z	-1,132
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,258
Exakte Signifikanz [2*(1- seitig Sig.)]	,274

Der Mann-Whitney-U Test zeigt im Vergleich der Kurz- und Langzeitgruppe 1,4 des ROI Fuchsia den Messwert 62, der p-Wert liegt bei 0,258. Es besteht somit in den zwei verglichenen Gruppen kein signifikanter Zusammenhang Bezug nehmend auf den prozentualen Knochenanteil der betrachteten Zone.

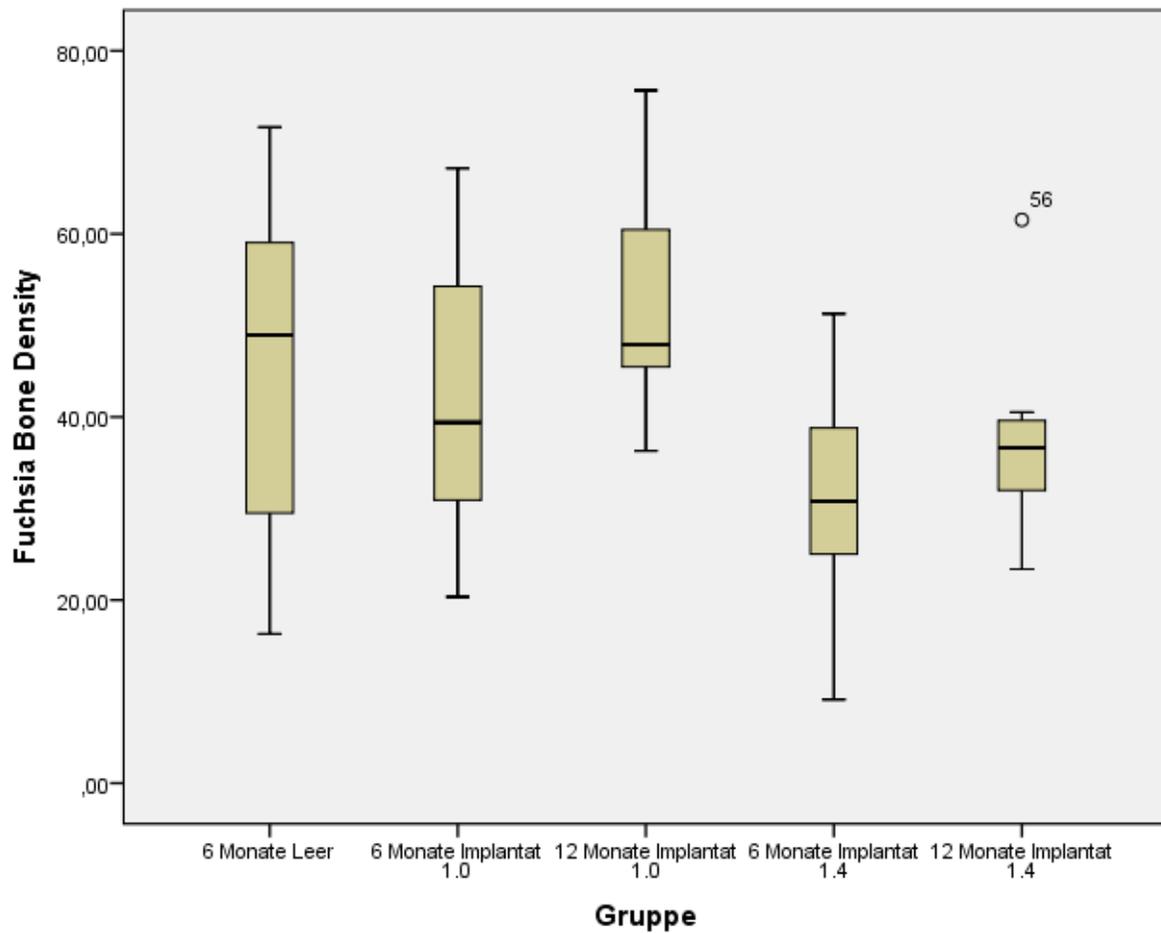


Abbildung 18: Boxplot-Diagramm mit Darstellung der jeweilig nicht bestehenden Signifikanz im prozentualen Knochenanteil des ROI Fuchsia in den miteinander verglichenen Gruppen.

Olive

Gibt es einen Zusammenhang zwischen dem prozentualen Knochenanteil im Ring **Olive** zwischen der Gruppe 1.0 zum Zeitpunkt 6 und 12 Monate?

Ränge

	Gruppe	N	Mittlerer Rang	Rangsumme
	6 Monate Implantat 1.0	11	6,00	66,00
Olive Bone Density	12 Monate Implantat 1.0	11	17,00	187,00
	Gesamt	22		

Statistik für Test

	Olive Bone Density
Mann-Whitney-U	,000
Wilcoxon-W	66,000
Z	-3,973
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,000
Exakte Signifikanz [2*(1-seitig Sig.)]	,000

In der ROI Olive ergibt der Mann-Whitney-U einen p-Wert von 0,000071. Es besteht ein signifikanter Unterschied im prozentualen Knochenanteil der betrachteten Zone. In der Langzeitgruppe 1,0 ist somit in der ROI Olive (äußerster Implantatring mit Kontakt zu umgebendem spongösem Knochen) signifikant mehr Knochen vorhanden als in der Kurzzeitgruppe 1,0.

Gibt es einen Zusammenhang zwischen dem prozentualen Knochenanteil im Ring **Olive** zwischen der Gruppe 1.4 zum Zeitpunkt 6 und 12 Monate?

Ränge

	Gruppe	N	Mittlerer Rang	Rangsumme
	6 Monate Implantat 1.4	14	15,07	211,00
Olive Bone Density	12 Monate Implantat 1.4	12	11,67	140,00
	Gesamt	26		

Statistik für Test

	Olive Bone Density
Mann-Whitney-U	62,000
Wilcoxon-W	140,000
Z	-1,132
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,258
Exakte Signifikanz [2*(1- seitig Sig.)]	,274

Auf Grund des errechneten Messwterergebnisses von 62 und dem sich ergebenden p-Wert von 0,258 im Mann-Whitney-U Test besteht kein signifikanter Unterschied des prozentualen Knochenanteils in der ROI Olive im Vergleich der Kurz- und Langzeitgruppe 1.4.

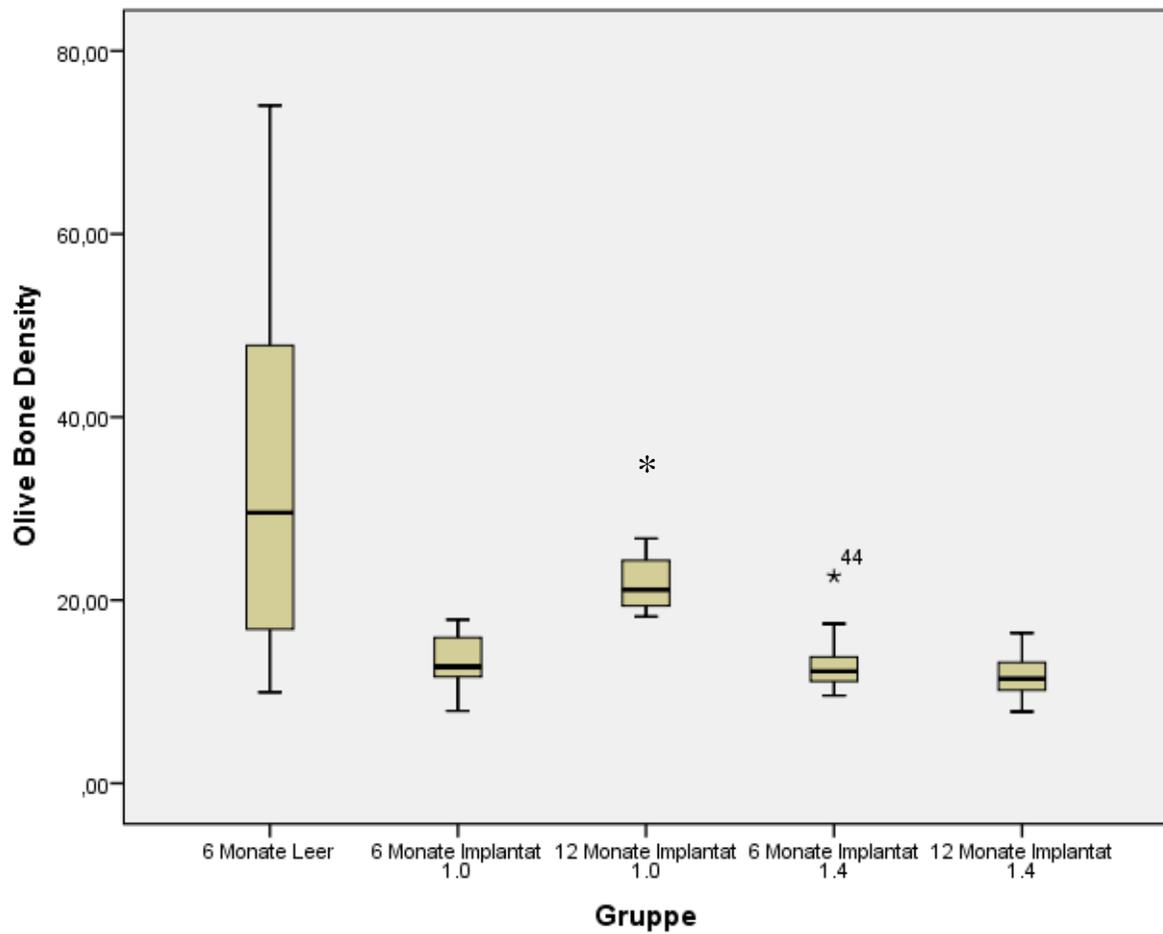


Abbildung 19: Boxplot-Diagramm mit Darstellung des signifikanten Unterschieds im prozentualen Knochenanteil in der ROI Olive zugunsten der Langzeitgruppe 1.0 im Vergleich zur Kurzzeitgruppe 1.0.

Lime

Gibt es einen Zusammenhang zwischen dem prozentualen Knochenanteil im Ring **Lime** zwischen der Gruppe 1.0 zum Zeitpunkt 6 und 12 Monate?

Ränge

	Gruppe	N	Mittlerer Rang	Rangsumme
	6 Monate Implantat 1.0	11	8,00	88,00
Lime Bone Density	12 Monate Implantat 1.0	11	15,00	165,00
	Gesamt	22		

Statistik für Test

	Lime Bone Density
Mann-Whitney-U	22,000
Wilcoxon-W	88,000
Z	-2,528
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,011
Exakte Signifikanz [2*(1- seitig Sig.)]	,010

Der Mann Whitney-U Test zeigt bei einem Messwert von 22 einen p-Wert von 0,011. Es besteht ein signifikanter Unterschied im prozentualen Knochenanteil des ROI Lime in den beiden miteinander verglichenen Gruppen. In der Langzeitgruppe 1.0 ist somit signifikant mehr Knochen zu finden als in der Kurzzeitgruppe 1,0.

Gibt es einen Zusammenhang zwischen dem prozentualen Knochenanteil im Ring **Lime** zwischen der Gruppe 1.4 zum Zeitpunkt 6 und 12 Monate?

Ränge

	Gruppe	N	Mittlerer Rang	Rangsumme
	6 Monate Implantat 1.4	14	17,57	246,00
Lime Bone Density	12 Monate Implantat 1.4	12	8,75	105,00
	Gesamt	26		

Statistik für Test

	Lime Bone Density
Mann-Whitney-U	27,000
Wilcoxon-W	105,000
Z	-2,932
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,003
Exakte Signifikanz [2*(1-seitig Sig.)]	,003

Im Vergleich der Kurz- mit der Langzeitgruppe 1.4 ergibt sich im Mann-Whitney-U Test ein Messwert von 27, der p-Wert beträgt 0,003. Es besteht daher ein signifikanter Zusammenhang im Vergleich des prozentualen Knochenanteils des ROI Lime der beiden Gruppen. In der Kurzzeitgruppe ist der prozentuale Knochenanteil in der betrachteten Zone signifikant höher.

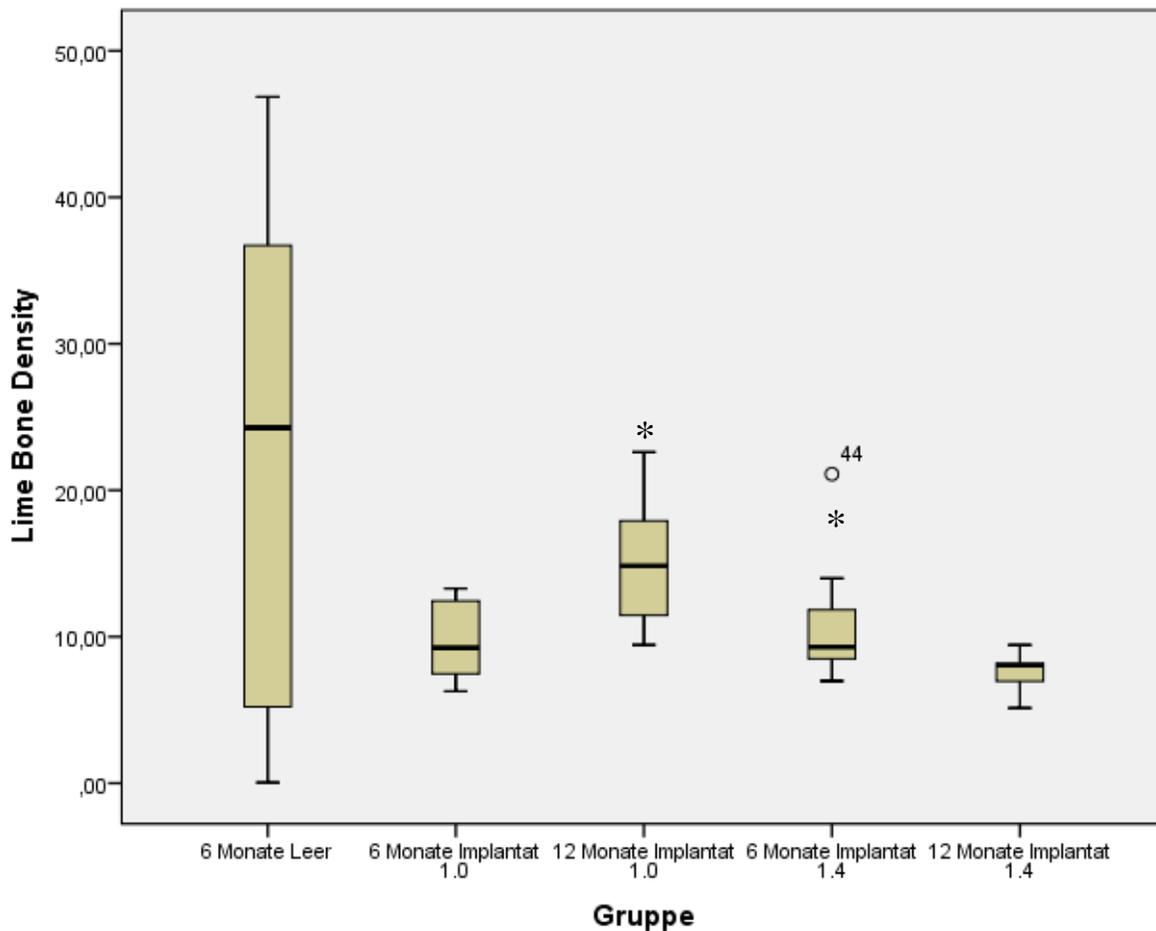


Abbildung 20: Zwei signifikante Zusammenhänge im Boxplot-Diagramm der ROI Lime:

In der Langzeitgruppe 1.0 besteht ein signifikant höherer prozentualer Knochenanteil verglichen mit der Kurzzeitgruppe 1.0, in der Langzeitgruppe 1.4 ein signifikant niedrigerer Knochenanteil verglichen mit der Kurzzeitgruppe 1.4.

Aqua

Gibt es einen Zusammenhang zwischen dem prozentualen Knochenanteil im Ring **Aqua** zwischen der Gruppe 1.0 zum Zeitpunkt 6 und 12 Monate?

Ränge

	Gruppe	N	Mittlerer Rang	Rangsumme
Aqua Bone Density	6 Monate Implantat 1.0	11	7,91	87,00
	12 Monate Implantat 1.0	11	15,09	166,00
	Gesamt	22		

Statistik für Test

	Aqua Bone Density
Mann-Whitney-U	21,000
Wilcoxon-W	87,000
Z	-2,594
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,009
Exakte Signifikanz [2*(1- seitig Sig.)]	,008

Im innersten Implantatkreis, der ROI Aqua, lässt sich im Mann-Whitney-U Test ein Messwert von 21 und ein p-Wert von 0,009 erheben. Somit besteht ein signifikanter Unterschied des prozentualen Knochenanteils in den beiden Gruppen 1.0. In der Langzeitgruppe 1.0 ist der vorhandene Knochenanteil signifikant höher als in der Kurzzeitgruppe 1.0.

Gibt es einen Zusammenhang zwischen dem prozentualen Knochenanteil im Ring **Aqua** zwischen der Gruppe 1.4 zum Zeitpunkt 6 und 12 Monate

Ränge

	Gruppe	N	Mittlerer Rang	Rangsumme
	6 Monate Implantat 1.4	14	18,21	255,00
Aqua Bone Density	12 Monate Implantat 1.4	12	8,00	96,00
	Gesamt	26		

Statistik für Test

	Aqua Bone Density
Mann-Whitney-U	18,000
Wilcoxon-W	96,000
Z	-3,395
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,001
Exakte Signifikanz [2*(1-seitig Sig.)]	,000 ^b

Im Vergleich der Kurz- mit der Langzeitgruppe 1.4 ergibt sich im Mann-Whitney-U Test ein Messwert von 18, der p-Wert beträgt 0,001. Es besteht daher ein signifikanter Zusammenhang im Vergleich des prozentualen Knochenanteils der ROI Aqua der beiden Gruppen. In der Kurzzeitgruppe ist der prozentuale Knochenanteil in der betrachteten Zone signifikant höher.

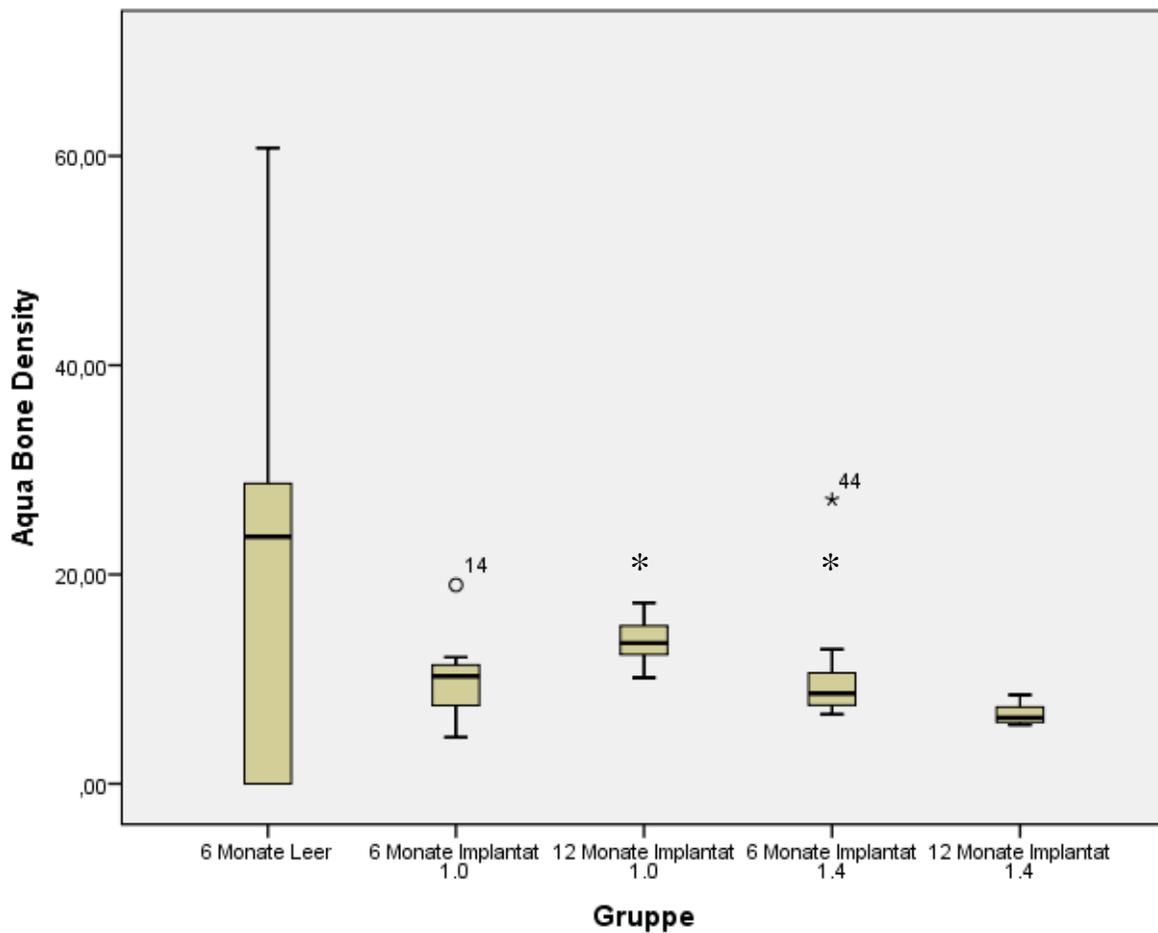


Abbildung 21: Zwei signifikante Zusammenhänge im Boxplot-Diagramm der ROI Aqua:

In der Langzeitgruppe 1.0 besteht ein signifikant höherer prozentualer Knochenanteil verglichen mit der Kurzzeitgruppe 1.0, in der Langzeitgruppe 1.4 ein signifikant niedrigerer Knochenanteil verglichen mit der Kurzzeitgruppe 1.4.

Analytischer Vergleich mit der Kontrollgruppe

Yellow

Gibt es einen Unterschied im prozentualen Knochenanteil im Ring/ROI **Yellow** der Kurzzeitgruppe 1,0, der Kurzzeitgruppe 1,4 sowie der Leerlochgruppe?

Für die statistische Testung mehrerer unabhängiger Gruppen wurde der nichtparametrische Kruskal-Wallis Test ausgewählt. Sollte dieser einen p-Wert ergeben, der sich unter dem festgelegten Signifikanzniveau von $p = 0,05$ befindet, so besteht zwischen mindestens zwei Gruppen ein signifikanter Unterschied im Bezug auf das getestete Kriterium. Um diese beiden zu detektieren und den p-Wert zu bestimmen, wird wieder der Mann-Whitney-U Test verwendet.

Ränge

	Gruppe	N	Mittlerer Rang
Yellow Bone Density	6 Monate Leer	11	21,09
	6 Monate Implantat 1.0	11	16,36
	6 Monate Implantat 1.4	14	18,14
	Gesamt	36	

Statistik für Test

	Yellow Bone Density
Chi-Quadrat	1,134
Df	2
Asymptotische Signifikanz	,567

Der Kruskal-Wallis Test ergibt einen p-Wert von 0,567 bezüglich des prozentualen Knochenanteils in der ROI Yellow im Vergleich der drei Kurzzeitgruppen. Es besteht daher kein signifikanter Unterschied für das getestete Kriterium innerhalb dieser drei Gruppen, die weitere Testung mittels Mann-Whitney-U ist daher nicht notwendig.

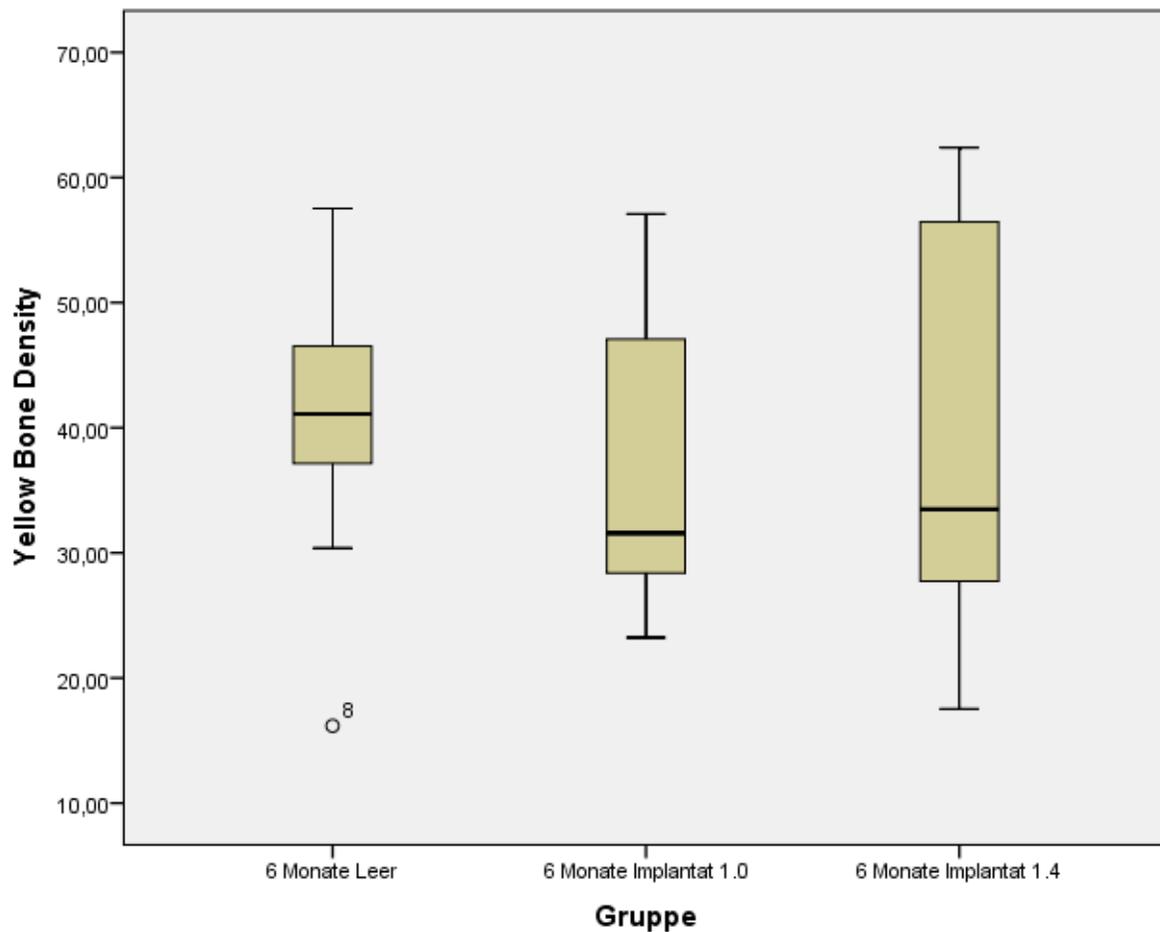


Abbildung 22: kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Kurzzeitgruppen im prozentualen Knochenanteil der ROI Yellow

Fuchsia

Gibt es einen Unterschied im prozentualen Knochenanteil im Ring/ROI **Fuchsia** der Kurzzeitgruppe 1.0, der Kurzzeitgruppe 1.4 sowie der Leerlochgruppe?

Ränge

	Gruppe	N	Mittlerer Rang
Fuchsia Bone Density	6 Monate Leer	11	21,82
	6 Monate Implantat 1.0	11	21,36
	6 Monate Implantat 1.4	14	13,64
	Gesamt	36	

Statistik für Test

	Fuchsia Bone Density
Chi-Quadrat	4,879
Df	2
Asymptotische Signifikanz	,087

Der Kruskal-Wallis Test ergibt einen p-Wert von 0,087 bezüglich des prozentualen Knochenanteils in der ROI Fuchsia im Vergleich der drei Kurzzeitgruppen. Es besteht daher kein signifikanter Unterschied für das getestete Kriterium innerhalb dieser drei Gruppen, die weitere Testung mittels Mann-Whitney-U ist daher nicht notwendig.

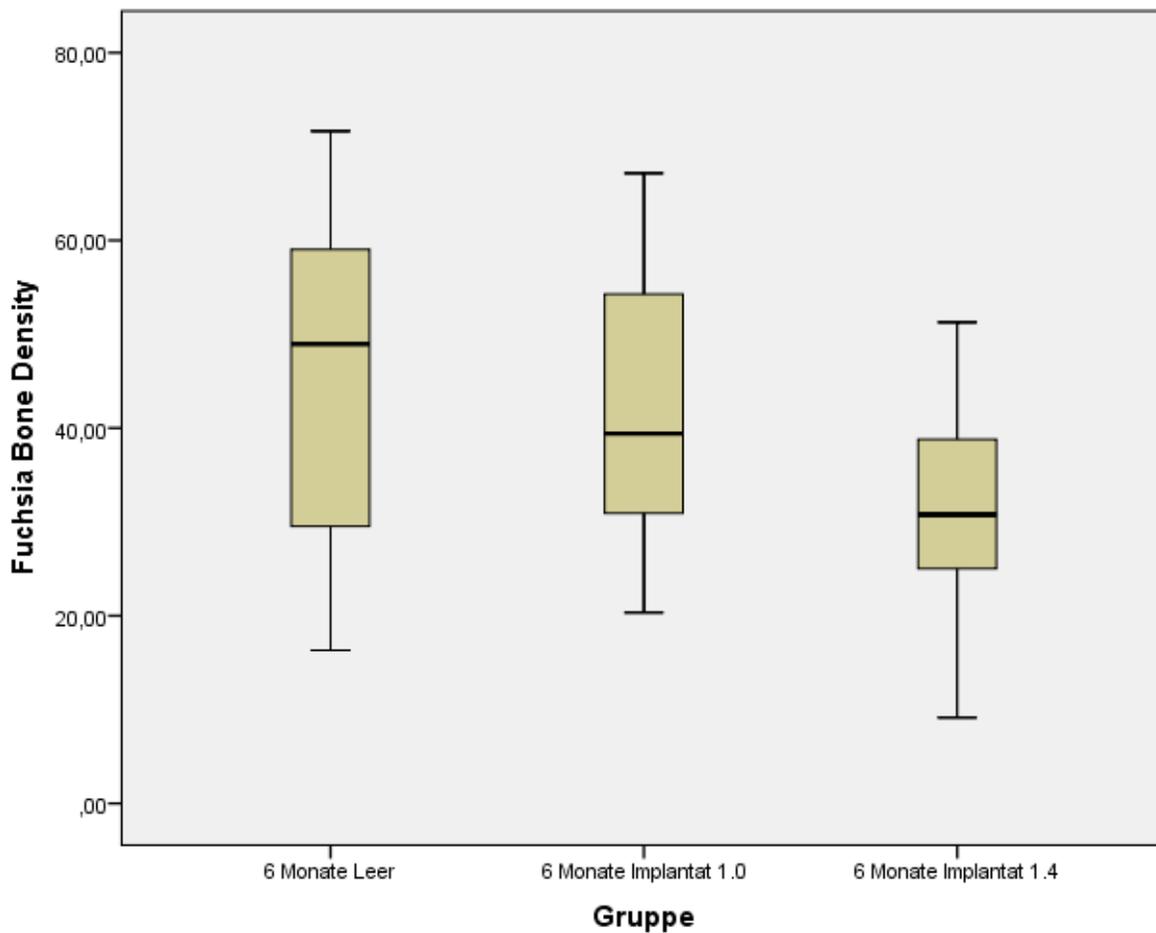


Abbildung 23: kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Kurzzeitgruppen im prozentualen Knochenanteil der ROI Fuchsia

Olive

Gibt es einen Unterschied im prozentualen Knochenanteil im Ring/ROI **Olive** der Kurzzeitgruppe 1,0, der Kurzzeitgruppe 1,4 sowie der Leerlochgruppe?

Ränge

	Gruppe	N	Mittlerer Rang
Olive Bone Density	6 Monate Leer	11	27,64
	6 Monate Implantat 1.0	11	15,18
	6 Monate Implantat 1.4	14	13,93
	Gesamt	36	

	Olive Bone Density
Chi-Quadrat	11,999
Df	2
Asymptotische Signifikanz	,002

Der Kruskal-Wallis Test ergibt einen p-Wert von 0,002 bezüglich des prozentualen Knochenanteils in der ROI Olive im Vergleich der drei Kurzzeitgruppen. Es besteht daher ein signifikanter Unterschied für das getestete Kriterium innerhalb dieser drei Gruppen. Mittels Mann-Whitney-U Test können nun die exakten Zusammenhänge analysiert werden, jeweils zwei Gruppen werden wechselseitig zueinander getestet.

<i>Olive Bone Density</i>	<i>Mann-Whitney-U / p-Wert</i>	<i>Signifikanz Knochenanteil</i>
Leerlochgruppe – Kurzzeitgruppe 1,0	0,004	+
Leerlochgruppe – Kurzzeitgruppe 1,4	0,002	+
Kurzzeitgruppe 1,0 – Kurzzeitgruppe 1,4	0,702	--

Tabelle 16: Mann-Whitney-U Test- Ergebnisse der Kurzzeitgruppen

Jeweils bezüglich der Leerlochgruppe ergeben sich in den Mann-Whitney-U Testungen mit beiden Implantatgruppen p-Werte von 0,004 bei 1.0 und 0,002 bei 1.4. Daraus lässt sich schließen, dass in der Leerlochgruppe der prozentuale Knochenanteil in der ROI Olive sowohl im Vergleich zur Kurzzeitgruppe 1.0 als auch zur Kurzzeitgruppe 1.4 signifikant höher ist. Zwischen den beiden Kurzzeitimplantatgruppen lässt sich bei einem p-Wert von 0,702 kein signifikanter Unterschied für das getestete Kriterium feststellen.

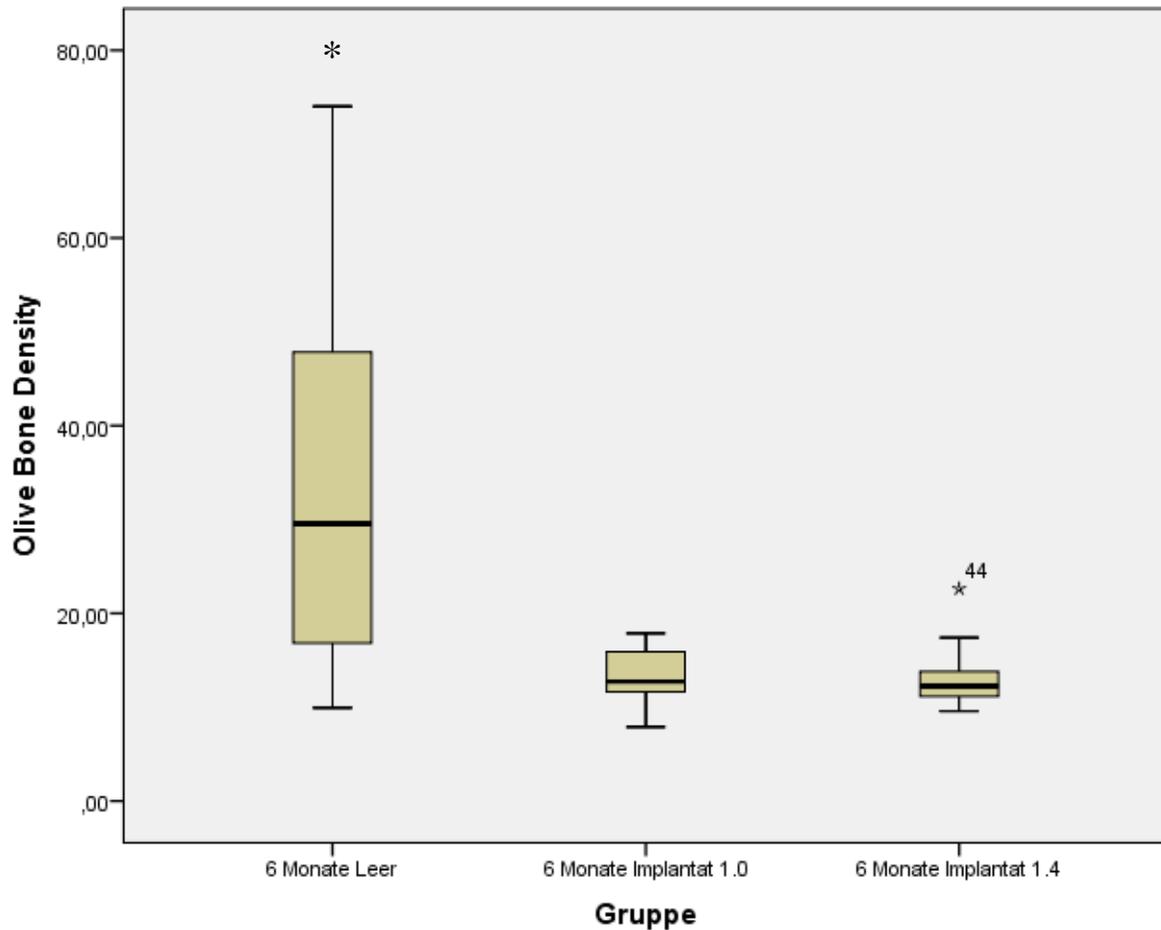


Abbildung 24: signifikanter Unterschied zwischen den jeweiligen Implantatkurzeitgruppen und der Leerlochgruppe im prozentualen Knochenanteil der ROI Olive

Lime

Gibt es einen Unterschied im prozentualen Knochenanteil im Ring/ROI **Lime** der Kurzzeitgruppe 1.0, der Kurzzeitgruppe 1.4 sowie der Leerlochgruppe?

Ränge

	Gruppe	N	Mittlerer Rang
Lime Bone Density	6 Monate Leer	11	22,18
	6 Monate Implantat 1.0	11	16,18
	6 Monate Implantat 1.4	14	17,43
	Gesamt	36	

Statistik für Test

	Lime Bone Density
Chi-Quadrat	2,021
Df	2
Asymptotische Signifikanz	,364

Der Kruskal-Wallis Test ergibt einen p-Wert von 0,364 bezüglich des prozentualen Knochenanteils in der ROI Lime im Vergleich der drei Kurzzeitgruppen. Es besteht daher kein signifikanter Unterschied für das getestete Kriterium innerhalb dieser drei Gruppen, die weitere Testung mittels Mann-Whitney-U ist daher nicht notwendig.

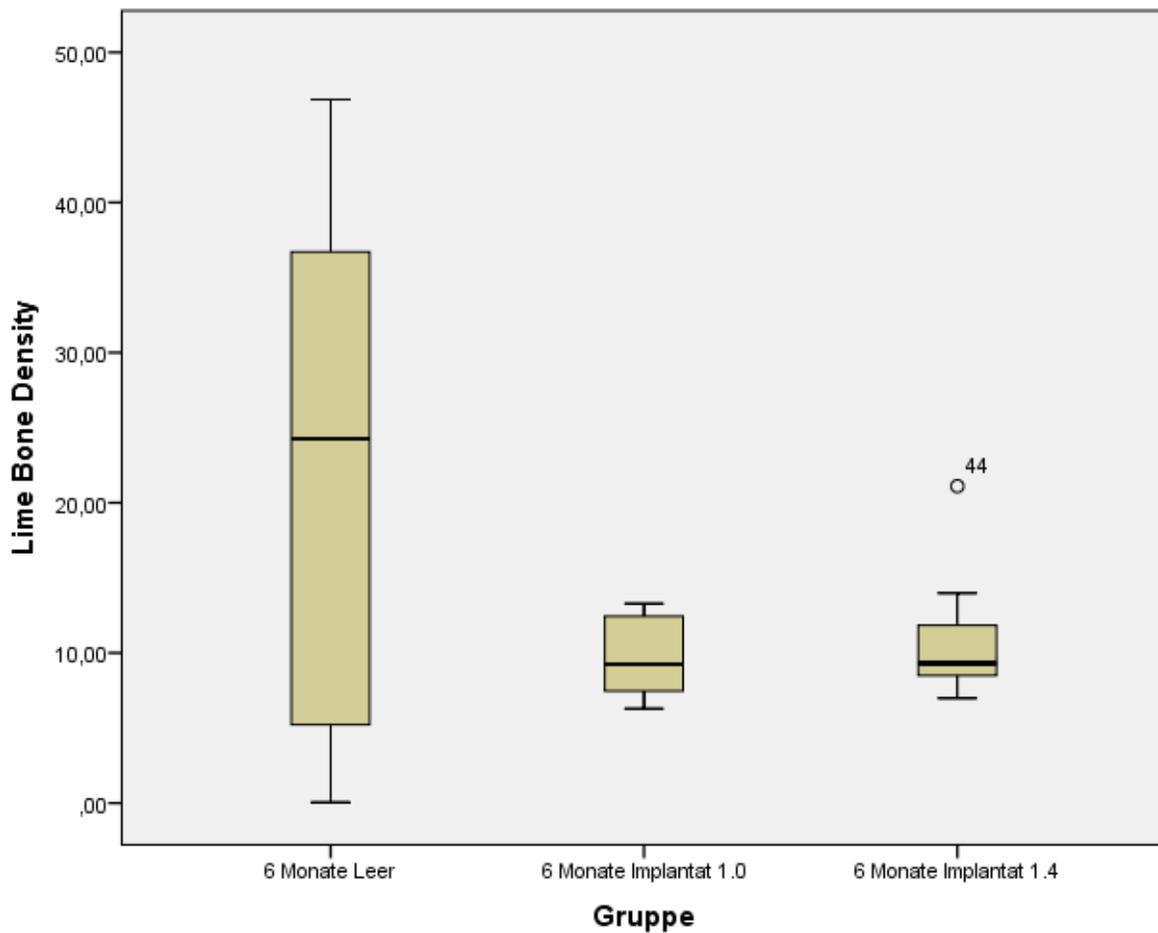


Abbildung 25: kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Kurzzeitgruppen im prozentualen Knochenanteil der ROI Lime

Aqua

Gibt es einen Unterschied im prozentualen Knochenanteil im Kreis/ROI **Aqua** der Kurzzeitgruppe 1.0, der Kurzzeitgruppe 1.4 sowie der Leerlochgruppe?

Ränge

	Gruppe	N	Mittlerer Rang
Aqua Bone Density	6 Monate Leer	11	19,45
	6 Monate Implantat 1.0	11	18,09
	6 Monate Implantat 1.4	14	18,07
	Gesamt	36	

Statistik für Test

	Aqua Bone Density
Chi-Quadrat	,130
Df	2
Asymptotische Signifikanz	,937

Der Kruskal-Wallis Test ergibt einen p-Wert von 0,937 bezüglich des prozentualen Knochenanteils in der ROI Aqua im Vergleich der drei Kurzzeitgruppen. Es besteht daher kein signifikanter Unterschied für das getestete Kriterium innerhalb dieser drei Gruppen, die weitere Testung mittels Mann-Whitney-U ist daher nicht notwendig.

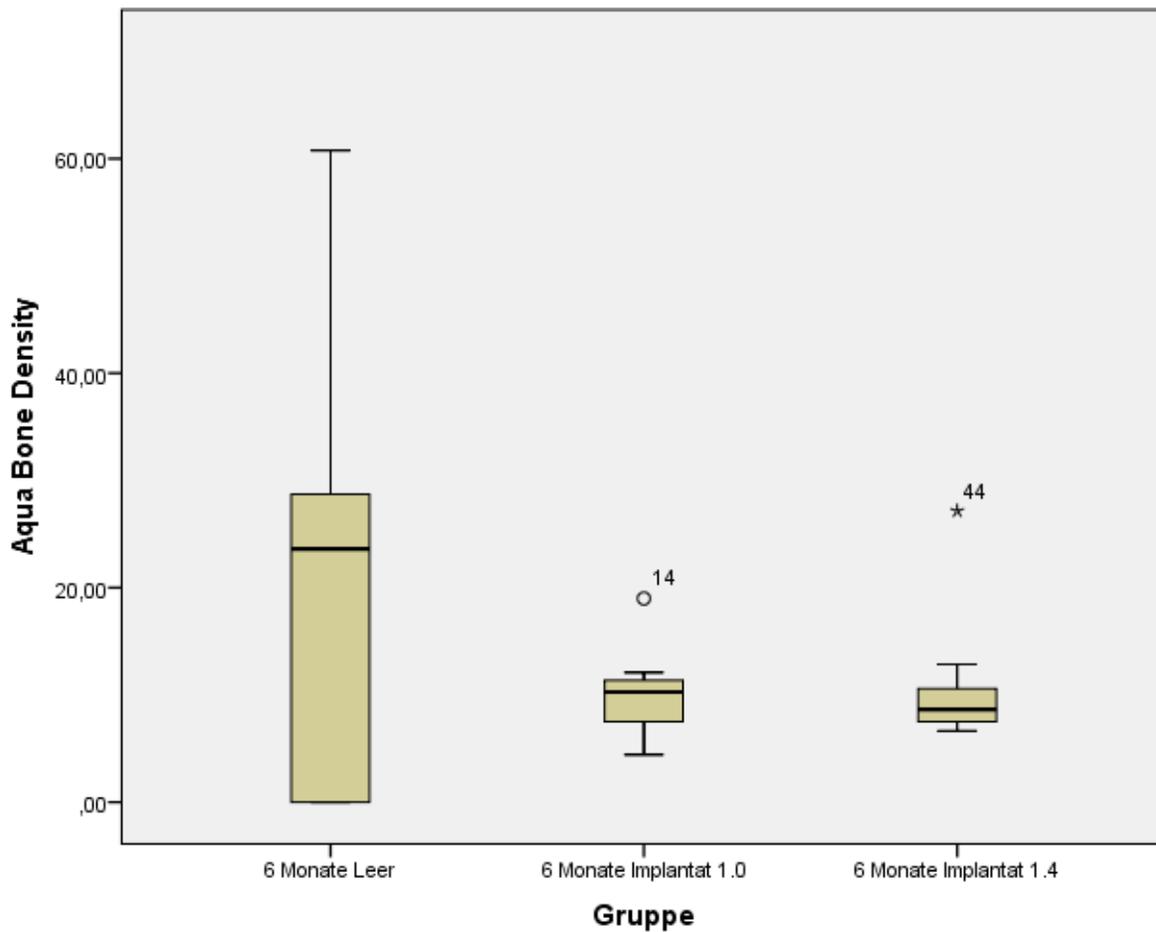


Abbildung 26: kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Kurzzeitgruppen im prozentualen Knochenanteil der ROI Aqua

3.3.2. Analytische Betrachtung des Implantats der jeweiligen Region of Interest (ROI)

Olive

Gibt es einen Unterschied im Implantat 1.0 zwischen 6 und 12 Monaten im Ring **Olive**?

Ränge

	Gruppe	N	Mittlerer Rang	Rangsumme
Olive Impl Density	6 Monate Implantat 1.0	11	11,00	121,00
	12 Monate Implantat 1.0	11	12,00	132,00
	Gesamt	22		

Statistik für Test

	Olive Impl Density
Mann-Whitney-U	55,000
Wilcoxon-W	121,000
Z	-,361
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,718
Exakte Signifikanz [2*(1- seitig Sig.)]	,748 ^b

Der Mann-Whitney-U Test ergibt einen Messwert von 55, der p-Wert beträgt 0,718. Es besteht daher kein signifikanter Unterschied im prozentualen Implantatanteil der ROI Olive im Vergleich der Kurz- und Langzeitgruppe 1.0 .

Gibt es einen Unterschied im Implantat 1.4 zwischen 6 und 12 Monaten im Ring **Olive**?

Ränge

	Gruppe	N	Mittlerer Rang	Rangsumme
	6 Monate Implantat 1.4	14	12,14	170,00
Olive Impl Density	12 Monate Implantat 1.4	12	15,08	181,00
	Gesamt	26		

Statistik für Test

	Olive Impl Density
Mann-Whitney-U	65,000
Wilcoxon-W	170,000
Z	-,977
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,328
Exakte Signifikanz [2*(1- seitig Sig.)]	,347

Im Vergleich des prozentualen Implantatanteils der ROI Olive der beiden Gruppen 1.4 besteht ein Messwert im Mann-Whitney-U Test von 65, ein p-Wert von 0,328. Ein signifikanter Unterschied der beiden Gruppen bezüglich des betrachteten Kriteriums besteht daher nicht.

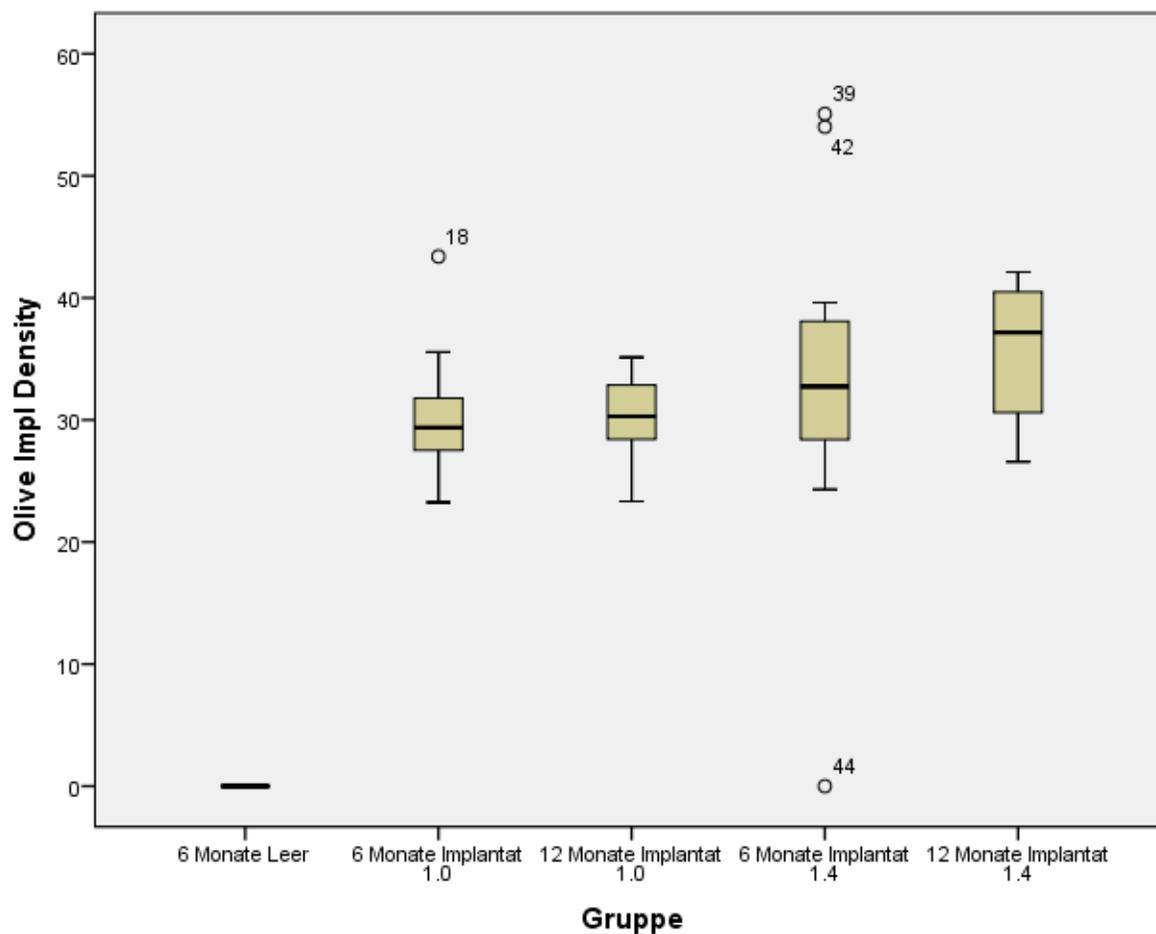


Abbildung 27: Keine signifikanten prozentualen Implantatveränderungen im Vergleich der einzelnen Gruppen 1.0 sowie 1.4 der ROI Olive.

Lime

Gibt es einen Unterschied im Implantat 1.0 zwischen 6 und 12 Monaten im Ring **Lime**?

Ränge

	Gruppe	N	Mittlerer Rang	Rangsumme
Lime Impl Density	6 Monate Implantat 1.0	11	12,91	142,00
	12 Monate Implantat 1.0	11	10,09	111,00
	Gesamt	22		

Statistik für Test

	Lime Impl Density
Mann-Whitney-U	45,000
Wilcoxon-W	111,000
Z	-1,018
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,309
Exakte Signifikanz [2*(1- seitig Sig.)]	,332

Der Mann-Whitney-U Test ergibt einen Messwert von 45, der p-Wert beträgt 0,309. Ein signifikanter Unterschied im prozentualen Implantatanteil der ROI Lime im Vergleich der Kurz- und Langzeitgruppe 1.0 besteht nicht.

Gibt es einen Unterschied im Implantat 1.4 zwischen 6 und 12 Monaten im Ring **Lime**?

Ränge

	Gruppe	N	Mittlerer Rang	Rangsumme
Lime Impl Density	6 Monate Implantat 1.4	14	13,57	190,00
	12 Monate Implantat 1.4	12	13,42	161,00
	Gesamt	26		

Statistik für Test

	Lime Impl Density
Mann-Whitney-U	83,000
Wilcoxon-W	161,000
Z	-,051
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,959
Exakte Signifikanz [2*(1- seitig Sig.)]	,980

Im Vergleich des prozentualen Implantatanteils der ROI Lime der beiden Gruppen 1.4 besteht ein Messwert im Mann-Whitney-U Test von 83, ein p-Wert von 0,959. Ein signifikanter Unterschied der beiden Gruppen bezüglich des betrachteten Kriteriums besteht daher nicht.

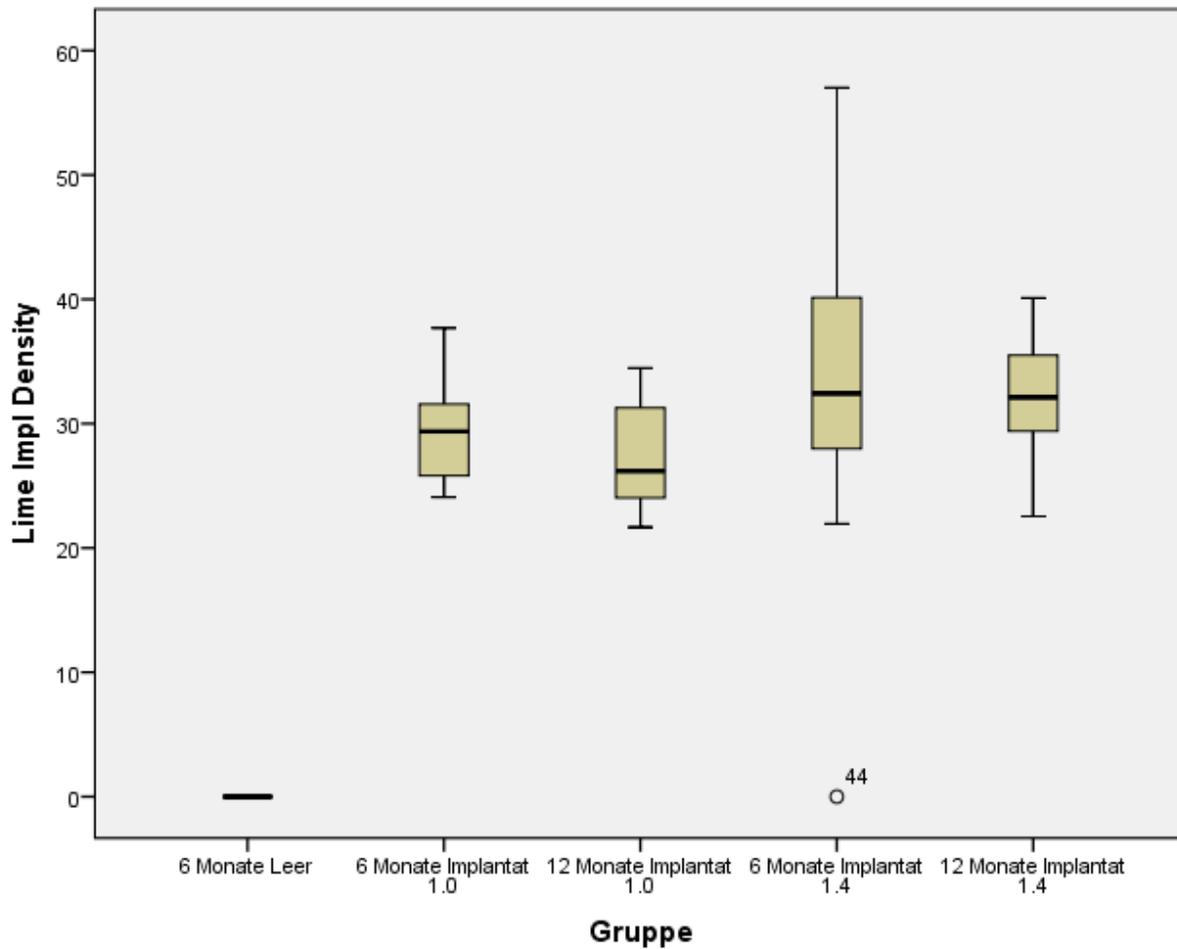


Abbildung 28 : Keine signifikanten prozentualen Implantatveränderungen im Vergleich der einzelnen Gruppen 1,0 sowie 1,4 der ROI Lime.

Aqua

Gibt es einen Unterschied im Implantat 1.0 zwischen 6 und 12 Monaten im Ring Aqua?

Ränge

	Gruppe	N	Mittlerer Rang	Rangsumme
Aqua Impl Density	6 Monate Implantat 1.0	11	11,64	128,00
	12 Monate Implantat 1.0	11	11,36	125,00
	Gesamt	22		

Statistik für Test

	Aqua Impl Density
Mann-Whitney-U	59,000
Wilcoxon-W	125,000
Z	-,098
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,922
Exakte Signifikanz [2*(1- seitig Sig.)]	,949

Der Mann-Whitney-U Test ergibt einen Messwert von 59, der p-Wert beträgt 0,922. Es besteht kein signifikanter Unterschied im prozentualen Implantatanteil der ROI Aqua im Vergleich der Kurz- und Langzeitgruppe 1.0.

Gibt es einen Unterschied im Implantat 1.4 zwischen 6 und 12 Monaten im Ring **Aqua**?

Ränge

	Gruppe	N	Mittlerer Rang	Rangsumme
	6 Monate Implantat 1.4	14	14,79	207,00
Aqua Impl Density	12 Monate Implantat 1.4	12	12,00	144,00
	Gesamt	26		

Statistik für Test

	Aqua Impl Density
Mann-Whitney-U	66,000
Wilcoxon-W	144,000
Z	-,926
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,355
Exakte Signifikanz [2*(1- seitig Sig.)]	,374

Im Vergleich des prozentualen Implantatanteils der ROI Aqua der beiden Gruppen 1.4 besteht ein Messwert im Mann-Whitney-U Test von 66, ein p-Wert von 0,355. Ein signifikanter Unterschied der beiden Gruppen bezüglich des betrachteten Kriteriums besteht daher nicht.

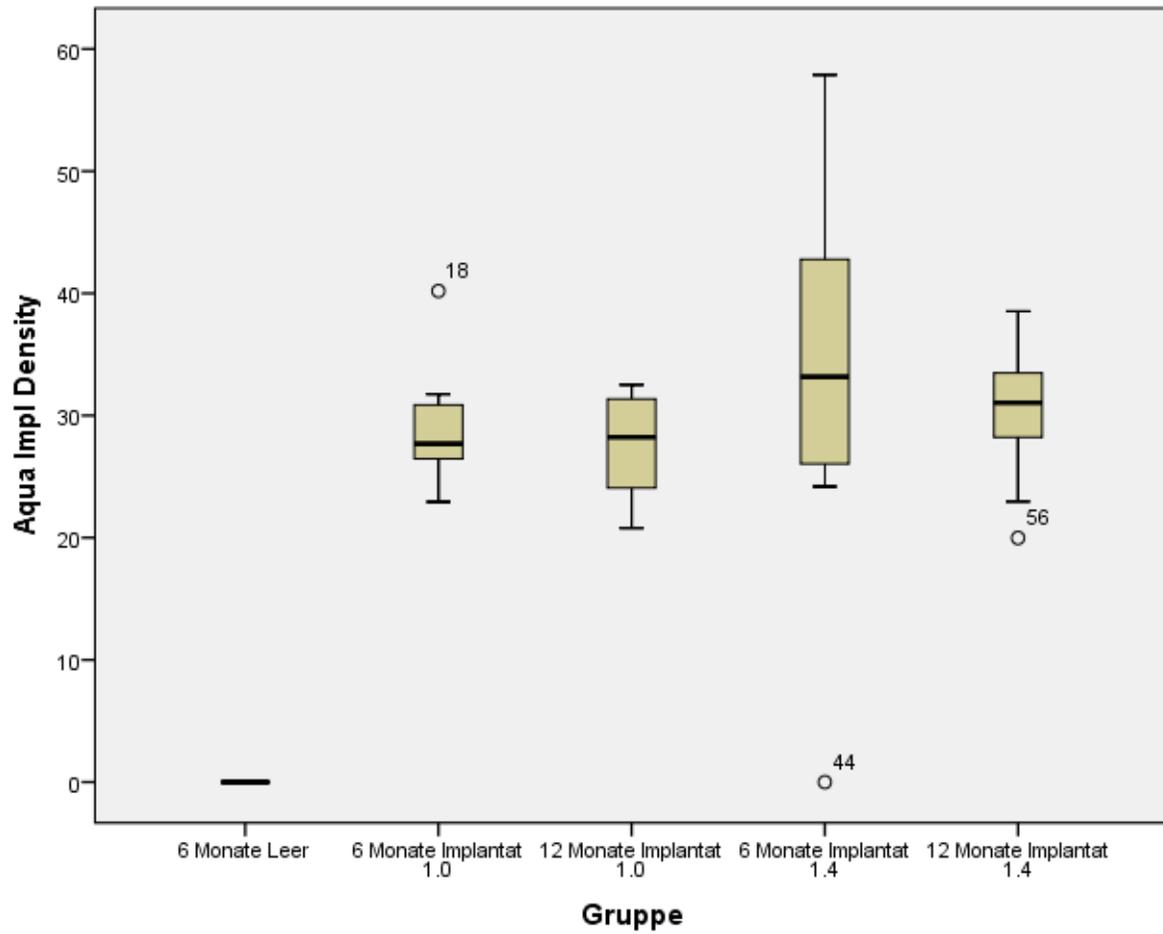


Abbildung 29: Keine signifikanten prozentualen Implantatveränderungen im Vergleich der einzelnen Gruppen 1.0 sowie 1.4 der ROI Aqua.

<u>ROI Knochen</u>	<u>Mann-Whitney-U Test</u>	<u>Kurz-/Langzeitgruppe</u>	<u>signifikant</u>	<u>Ja</u>	<u>Nein</u>
Yellow 1,0				X	
Yellow 1,4					X
Fuchsia 1,0					X
Fuchsia 1,4					X
Olive 1,0				X	
Olive 1,4					X
Lime 1,0				X	
Lime 1,4				X	
Aqua 1,0				X	
Aqua 1,4				X	
<u>Kruskall-Wallis Test</u>					
<u>Vergleich Kontrollgruppe</u>					
<u>Kurzzeitgruppe</u>					
Yellow 1,0 + 1,4					X
Fuchsia 1,0 + 1,4					X
Olive 1,0 + 1,4				X	
Lime 1,0 + 1,4					X
Aqua 1,0 + 1,4					X
<u>ROI Implantat</u>					
<u>Mann-Whitney-U Test</u>					
<u>Kurz-/Langzeitgruppe</u>					
<u>signifikant</u>					
Olive 1,0					X
Olive 1,4					X
Lime 1,0					X
Lime 1,4					X
Aqua 1,0					X
Aqua 1,4					X

Tabelle 17: Übersichtstabelle der angewendeten Testverfahren sowie der signifikanten Veränderung des erfassten Knochens (ROI Knochen) und des Implantates (ROI Implantat)

4. Diskussion

4.1. Material und Methodik

4.1.1. Implantatkonfiguration

Die Zielsetzung des Gesamtprojektes ist die Entwicklung und Erprobung eines metallbasierten degradierbaren zellulären Knochenersatzmaterials. Die Literatur beschreibt bisher Erfahrungen von Knochenersatzstoffen auf der Basis von Magnesiumlegierungen. Dabei konnte in Versuchen dargestellt werden, dass dieses Metall zielführende Materialeigenschaften aufweist. Neben einer guten Bioverträglichkeit zeigte Magnesium schnelles Einwachswachsverhalten mit osteokonduktiven Effekten sowie eine zügige Degradation der Implantate. Die schnelle Degradation der Magnesiumlegierungen führt zu einer verminderten Festigkeit. Dies macht sie nur bedingt einsetzbar als Ersatz für größere knöcherne Defekte, wohingegen der Einsatz als Osteosynthesematerial sinnvoll erscheint. Das körpereigene Element Eisen ist durch seine mechanischen Eigenschaften interessant. In Vorversuchen zeigten Legierungen auf Eisenbasis neben einer guten Bioverträglichkeit eine deutlich verminderte Degradationsgeschwindigkeit. Für die klinische Anwendung größerer Knochendefekte mit lasttragender Funktion erscheint es daher geeignet [23].

Bei optimaler Funktion übernimmt das degradierbare Knochenersatzmaterial genau so lange die stabilisierende Funktion des Knochens, bis dieser durch die fortschreitende Heilung und Regeneration wieder zunehmend selbst die Festigkeit aufweist, dies zu tun [36,37]. Ziel ist es deshalb, im Rahmen der Implantatentwicklung ein Elastizitätsmodul des Werkstoffes zu erreichen, welches vergleichbar mit dem des Knochens ist. In der Literatur lassen sich mehrere übereinstimmende Meinungen finden, die postulieren, dass sich im optimalen Fall die neugebildete Knochenmasse proportional zum abgebauten Implantatvolumen verhält [38, 39, 40]. Angestrebt wird daher die Korrosionsgeschwindigkeit der Legierung so zu gestalten, dass diese möglichst genau mit der ablaufenden Knochenneubildung übereinstimmt.

Bisher finden in den klinischen Alltag hauptsächlich nicht resorbierbare Metallimplantate in der Orthopädie und Unfallchirurgie Verwendung. Die häufig notwendige Entfernung

derselben macht einen zweiten operativen Eingriff mit den verbundenen Risiken nötig und verursacht eine nicht unerhebliche Kostenbelastung. Erfolgt die Entfernung des Implantates nicht, so besteht die Gefahr des so genannten „stress shieldings“. Dabei wird die anfallende Last größtenteils durch das Metallimplantat getragen und nur in beschränktem Ausmaß durch den neu gebildeten Knochen. Dies kann zu einer verminderten Kalzifizierung der knöchernen Strukturen sowie zu einer unphysiologischen Ausbildung der Knochenstruktur führen und damit zu einem nicht physiologischen Heil- und Regenerationsprozess führen.

Im Rahmen von Vorversuchen der eigenen Arbeitsgruppe wurden unter anderem die Elemente Magnesium, Bor, Phosphor und Silber in Verbindung mit Eisen hinsichtlich ihrer Bioverträglichkeit sowie der mechanischen Charakteristika getestet. Dabei stellte sich Phosphor als am besten geeigneter Legierungspartner heraus. Zu erwarten ist aus den bereits vorbekannten Materialeigenschaften, dass die Hinzunahme dieses Elements einen verlangsamen Einfluss auf die Degradationsgeschwindigkeit hat und die Porosität erhöht [41]. Zudem kommt es zu einer erhöhten Festigkeit durch die Bildung von Mikrokristallen bei akzeptabler Zytotoxizität. Zusammenfassend lassen sich durch den Phosphoranteil die mechanischen Eigenschaften verbessern, wobei die Degradationsgeschwindigkeit darunter nicht leidet und ein Zellwachstum möglich ist [35].

4.1.2. Tiermodell

Mehrere Großtiermodelle werden in der unfallchirurgisch-orthopädischen Forschung eingesetzt. Dabei hat sich gerade das Schafsmodell insbesondere im Bereich des „tissue engineering“ in den letzten Jahren bewährt [42, 43, 44].

Ein Vorteil dieser Tierspezies besteht darin, dass die vorherrschenden Dimensionen des Extremitätenskeletts denen eines Menschen, im Vergleich etwa zu Kleinsäugetieren, ähnlich sind. In der mikroskopischen Betrachtung gibt es aber auch Unterschiede in der knöchernen Struktur des Schafknochens verglichen mit dem eines Menschen. Man findet bei Schafen überwiegend eine primäre Knochenstruktur, die mit fortschreitendem

Alter nur sehr zögerlich in Sekundärknochen umgebaut wird. Beim Menschen hingegen lassen sich nach Abschluss des Wachstums größtenteils Sekundärosteone als Zeichen der knöchernen Ausreifung nachweisen [42, 43].

Ein weiteres Spezifikum des Modelles ist, dass das Schaf im Gegensatz beispielsweise zum Hund die operierte Extremität nicht vollständig entlasten kann und daher mindestens eine Teilbelastung erfolgt, welche als Regenerationsreiz gewünscht ist. Für die *in vivo* Erprobung des porösen Implantatzylinders war dies ein wichtiges Auswahlkriterium. In der Literatur lassen sich mehrere Studien finden, die die Notwendigkeit der Belastung einer osteosynthetisch versorgten Extremität belegen. Durch die Belastung wird ein osteoinduktiver Effekt erzielt [45].

In unserer Studie wurde das Implantat in den Tibiakopf der linken hinteren Extremität eingesetzt. Für vergleichbare zylindrische Implantate konnte in Untersuchungen gezeigt werden, dass sich das Regenerations- und Knochenneubildungsverhalten dem des Menschen sehr ähnelt [10, 46].

Im Rahmen der regelmäßigen Visitationen der Tiere, welche in der ersten Zeit nach dem operativen Eingriff bei den durchzuführenden Blutentnahmen in kurzen Zeitabständen stattfanden, konnte neben einer reizlosen und zeitgerechten Wundheilung auch eine zeitnah durchgeführte Vollbelastung der operierten unteren Extremität beobachtet werden. Bereits am ersten postoperativen Tag war bei der überwiegenden Anzahl der Tiere ein artgerechtes Gangbild erfassbar, spätestens jedoch in der gewohnten Umgebung in Gruppenhaltung auf dem Schafhof ab dem dritten postoperativen Tag.

Auch bietet dieses Tiermodell neben dem Kriterium einer guten Verfügbarkeit der Versuchstiere auch ökonomische Vorteile, u.a. seien hier überschaubar kalkulierbare Anschaffungs- und Haltungskosten genannt [43].

Nach Bewertung der angeführten Gründe erscheint das international etablierte Tiermodell des Schafes insbesondere als Versuchstier bei Projekten des muskuloskelettalen Systems geeignet und fand daher auch in unserem Versuch Anwendung.

4.2. Ergebnisse

4.2.1. Qualitativ-histologische Auswertung

Sowohl die Giemsa-Eosin gefärbten Schnitte, als auch die fluoreszenz-markierten Schnitte wurden in der Durchlichtmikroskopie betrachtet und unter der Supervision des Histologen Prof. Dr. med. Stefan Milz ausgewertet.

Die Fluoreszenzmarkierung mit Calceingrün und Xylenolorange gelang exemplarisch in einigen Präparaten und konnte dort eine fortschreitende Knochenneubildung dokumentieren. Eine statistische Auswertung konnte deshalb aber nicht durchgeführt werden. Dort wo die Anfärbung gelang, zeigten sich zirkumferente Banden, die ein Knochenwachstum in den letzten 8 Wochen des Versuches belegen konnten und damit die These der langsamen Knochenregeneration im Implantatinneren bestätigten.

Die Giemsa-Eosin gefärbten Schnitte wurden hinsichtlich der zuvor definierten histologischen Kriterien bewertet. Als erstes wurde die Bildung eines Lagerknochens um das Implantat beurteilt. Bei allen vier Implantatgruppen lässt sich ein neu gebildeter Lagerknochen um das Implantat finden. Es wurde weiter unterschieden, ob sich dieser Knochenring komplett oder inkomplett ausgebildet hat. Die Ergebnisse der beiden Kurzzeitgruppen zeigen, dass der Schwerpunkt noch auf der inkompletten Ausbildung des Knochenrings lag. So kam es in der Kurzzeitgruppe 1.0 in 64 % (7 von 11 Tieren) zu einer kompletten Ausbildung. In der Kurzzeitgruppe 1.4 konnte dies in 38 % (5 von 13 Tieren) der Präparate festgestellt werden. Bei der Analyse der Langzeitgruppen fiel ein geschlossener Ring sehr viel häufiger auf, in der Gruppe 1.0 zu 82 % (9 von 11 Tieren) und in der Gruppe 1.4 zu 91 % (10 von 11 Tieren).

Die Bildung eines Knochenrings kann als sicheres Zeichen dafür gewertet werden, dass um das Implantat ein physiologisches, das Knochenwachstum stimulierendes Milieu herrscht. Dieses erlaubt, dass im zeitlichen Verlauf zunehmende neue knöcherne Strukturen entstehen können.

Ein zweites Kriterium betrachtet nun die erfolgte Osteoidbildung. In allen vier Gruppen lässt sich nahezu in jedem Präparat neu gebildetes Osteoid im Implantatbereich finden. Unterschiede ergeben sich in der Mineralisation des Knochens. In der Kurzzeitgruppe

1.0 ist bei einem Tier eine erfolgte Mineralisation nachweisbar. Die Langzeitgruppe 1.0 weist in allen Fällen eine erfolgte Osteoidbildung auf, eine Mineralisation kann nicht gefunden werden. Bei den beiden Gruppen der Dichte 1.4 stellt sich dieses umgekehrt dar. Hier ist bei den Tieren der Kurzzeitgruppe keine Mineralisation feststellbar, wogegen in der Langzeitgruppe dies bei vier von zehn Tieren zutrifft.

4.2.2. Quantitative Auswertung der Kontaktradiographien

Mit Hilfe der quantitativen Analyse der Kontaktradiographien konnten die Zusammenhänge im Knochenwachstum und Implantatabbau der einzelnen Gruppen in den verschiedenen ROI dargestellt werden.

So wurde in einem ersten Auswertungsschritt der prozentuale Knochenanteil einer ROI zum Zeitpunkt sechs und zwölf Monate sowohl der Gruppe 1.0 als auch der Gruppe 1.4 miteinander verglichen. Dabei ließ sich insbesondere im äußersten Knochenring Yellow ein signifikant höherer prozentualer Knochenanteil der Langzeitgruppe 1.0 gegenüber der entsprechenden Kurzzeitgruppe finden. Innerhalb der beiden Gruppen 1.4 des Yellow-Ringes sowie im Bereich des Knochenrings Fuchsia aller Implantatgruppen ließ sich dagegen keine Signifikanz feststellen.

Betrachtet man die diesem Ergebnis zugrundeliegenden Kontaktradiographien einzeln, ergibt sich eine mögliche Erklärung. Gerade in der Langzeitgruppe 1.0 befinden sich mehrere Implantate in der Grenzregion Spongiosa/Kompakta bzw. Kortikalis. Erfasster bzw. ausgewerteter kompakter Knochen stellt sich dichter als Spongiosa dar, wodurch sich folglich ein höherer absoluter Zahlenwert generiert. Dass weitere Faktoren Einfluss auf das Ergebnis nehmen, ist wahrscheinlich. Eine weitere Aussage auf der Basis der durchgeführten Studie lässt sich nicht treffen.

Der äußere Implantatring Olive befindet sich in unmittelbarem Kontakt mit umgebenden gesunden Knochen. In dieser Grenzzone lässt sich ebenfalls in der Langzeitgruppe 1.0 ein signifikant höherer prozentualer Knochenanteil verglichen mit der Kurzzeitgruppe 1.0 messen. Dies zeigt, dass über den längeren Zeitraum von zwölf Monaten mehr Knochen

in den äußersten Implantatbereich (Ring Olive) eingewachsen ist als zum Zeitpunkt von sechs Monaten.

Für die inneren Implantatringe Lime und Aqua der Dichte $1,0 \text{ g/cm}^3$ konnte ein mit dem Ring Olive vergleichbares Ergebnis festgestellt werden. Hier besteht ebenfalls ein signifikanter Mehranteil von eingewachsenem Knochen zum späteren Zeitpunkt.

Zusammenfassend zeigte sich in allen fünf Implantatringen der Gruppe 1.0 eine signifikante Zunahme des neugebildeten Knochens im zeitlichen Verlauf. Dies gilt insbesondere für den äußersten Implantatring Olive, wobei die Knochenneubildung in den beiden innersten Implantatringen Lime und Aqua geringer ausgeprägt ist.

Für die Kohorten der Implantatdichte 1.4 besteht im äußersten Implantatring Olive ein leichter Rückgang des erfassten Knochens, in den innersten Ringen Lime und Aqua ist ein signifikanter Rückgang des erfassten Knochens festzustellen. Dies ist aus dem Grunde überraschend, da dieses Ergebnis konträr zur histologischen Beurteilung steht. Hier konnte vor allem im Ring Olive vermehrte Mineralisation des entstandenen Osteoids im zeitlichen Verlauf gefunden werden.

Einen Erklärungsansatz für diese Erkenntnis bietet das Implantatcharakteristikum der Offenporigkeit. Gerade die Implantatdichte 1,4 hat diesbezüglich nachweislich mehr Defizite, als dies bei der verminderten Dichte 1,0 gegeben ist. Dies ist ein materialtechnisches Fertigungsproblem und wird von Fraunhofer - Projektpartner in der Weiterentwicklung der Herstellungsprozesse adressiert. Ein stetiges wie fortschreitendes „Einwachsen“ der knöchernen Strukturen in die entsprechenden Implantate war daher nur eingeschränkt möglich.

Im Rahmen der qualitativen Analyse der einzelnen Präparate konnte das Phänomen der partiellen „Nichtoffenporigkeit“ der Implantate, insbesondere der Dichte 1,4, gehäuft aufgezeigt werden. Es handelte sich dabei um Implantatzonen, die nicht am organischen Stoffwechsel sowie an den sich abspielenden physiologischen Umbauprozessen teilnahmen.

Eine abschließende Erklärung, wieso in der Langzeitgruppe 1.4 in den Implantatringen ein leichter Rückgang des prozentualen Knochenanteils zu erheben ist, kann nicht gemacht werden.

In einem weiteren Auswertungsschritt wurde nun nach diesen Erkenntnissen die Leerlochgruppe mit einbezogen. Im Rahmen der statistischen Testung wurde diese mit beiden Kurzzeitimplantatgruppen wiederum bezüglich des prozentualen Knochenanteils in den einzelnen 5 Ringen in Relation gesetzt.

Der einzige sich ergebende signifikante Unterschied lässt sich bei einem p-Wert von 0,002 im Kruskal-Wallis-Test im Ring Olive aufzeigen. Der im Anschluss durchgeführte Mann-Whitney-U-Test ermöglichte eine weitere Differenzierung des Sachverhalts. So ist der prozentuale Knochenanteil in der Leerlochgruppe im Ring Olive gegenüber jeder einzelnen Kurzzeitgruppe signifikant höher. Zwischen den beiden Implantatgruppen besteht keine Signifikanz.

Die Defektheilung bzw. die Knochenneubildung unterliegen u.a. dem Zeitfaktor. Da es sich bei den vorliegenden Daten um jene der Kurzzeitgruppen handelt, ist erklärlich, dass dieser Effekt in den beiden innersten Ringen noch nicht in signifikanter Weise eingetreten ist. Bei den absoluten Werten zeigt sich im Ring Lime jedoch eine erkennbare Tendenz.

Die Veränderungen des Implantatmaterials wurden ebenfalls statistisch erfasst und ausgewertet. Betrachtet wurden die drei den Implantatbereich abbildenden Ringe Olive, Lime und Aqua. Die Kurz- und Langzeitgruppe der beiden getesteten Dichten wurden wiederum miteinander verglichen.

Dabei stellte sich ein einheitliches Ergebnis dar. Für die erfasste Implantatoberfläche besteht in allen Implantatgruppen im zeitlichen Rahmen kein signifikanter Unterschied. Es ist daher statistisch kein signifikanter Abbauprozess der beiden Implantattypen innerhalb des betrachteten Zeitraums nachweisbar. Dennoch ergeben sich sowohl aus den Ergebnissen der qualitativ-histologischen Betrachtung der dem Implantat angrenzenden Weichteilstrukturen, aus den Lymphknoten, wie auch aus den

histologischen Auswertungen der Präparate, vgl. Hämosiderin beladene Makrophagen, eindeutige Hinweise auf stattfindende Abbauprozesse des eisenbasierten Implantates. Dabei handelt es sich vermutlich um Degradationsprodukte, die reichlich auch in der Umgebung der Implantate nachweisbar sind, so dass trotz fehlender Signifikanz von einem Degradationsprozess ausgegangen werden muss.

Zusammenfassend gilt, dass es eindeutige Hinweise auf das Vorliegen ablaufender Abbauprozesse des Implantates gibt, welche wiederum ohne nennenswertes entzündliches Geschehen stattfinden.

Die Relation zwischen dem gewünschten Degradationsprozess, dem Abtransport und der Ausscheidung der Degradationsprodukte und dem dafür benötigten Zeitfenster stellt sich nach den hier gewonnenen Ergebnissen noch nicht in gewünschtem Verhältnis dar. Die Degradation erfolgt deutlich langsamer als vorab bei Messungen *in vitro* prognostiziert, so dass postuliert werden muss, dass weitere Prozesse diesen Degradationsprozess beeinflussen. Nach gegenwärtiger Interpretation der eigenen Arbeitsgruppe kommt es am ehesten im Rahmen der Oxidation an der Oberfläche des Implantates zur Ausbildung von Passivierungsschichten, welche das Implantatmaterial vom weiteren Oxidationsprozess entkoppeln. In diesem Zusammenhang befasste sich Haverova et al. in einer *in-vitro*-Studie mit dem Degradationsverhalten eisenbasierter Metallschäume mit Polyethylenglykol-Beschichtung. Dabei zeigte sich eine erhöhte Korrosionsrate des beschichteten im Vergleich zum unbeschichteten Material. Daraus wurde gefolgert, dass sich mit dem Grad der Beschichtung die Korrosionsgeschwindigkeit steuern lässt. Ferner hielten die Autoren fest, dass die Grenzflächenwechselwirkung zwischen hydrophiler Polymerschicht und der Eisenoberfläche die Ursache des erhöhten Oxidationsvorganges des Materials darstellt [47]. Auch Lin et. al konnten in einer *in vivo*-Studie an neuseeländischen Weißkaninchen die Korrosionszeit von eisenbasierten medikamentenfreisetzenden Koronarstents aus nitrierten Eisenmaterialien im Vergleich zu reinen Eisenstents deutlich verkürzen. Dabei ließ sich durch ein neuartiges Design des Stents mit u.a. einer Zink-Barriereschicht eine angemessene Gerüstbildung für 3 Monate erreichen. Nach 13 Monaten zeigte sich eine signifikant reduzierte Korrosionszeit sowie geringe Anzahl an Korrosionsprodukten,

wobei eine vollständige Bioresorption der Abbauprodukte noch nicht festgestellt werden konnte. Biologische Probleme traten während des Versuchszeitraumes nicht auf [48].

Die ausgewerteten Daten lassen sich insgesamt nur bedingt in die Literatur einordnen, da es bisher kaum vergleichbare tierexperimentelle Ansätze von zellulären eisenbasierten Implantaten am Knochen gibt. Einzig Kraus et al. konnten an nicht-zellulären zylindrischen Implantaten eisenbasierter Legierungen mit Mangan, Palladium und Kohlenstoff am wachsenden Knochen von Ratten nachweisen, dass sich auch dort eine nur sehr langsame Degradation realisieren ließ. Die histologische Auswertung ergab keine Hinweise auf Toxizität und zeigte eine gute Knochenintegration der Implantate. Klinische Auffälligkeiten konnten nicht dokumentiert werden. Diese Befunde decken sich überwiegend mit den Ergebnissen unserer Studie [49].

In der Literatur finden sich einige Arbeiten, die sich mit Magnesium basierten Legierungen befasst haben. So weisen gerade Mg-Legierungen in der *in vivo* Anwendung osteokonduktive Eigenschaften auf. Sie sind gut verträglich und haben eine schnelle Korrosionsfähigkeit [27, 28, 35, 50, 51].

Die Eigenschaften dieses Metalls in legierter Form führten schließlich zur klinischen Anwendung im Bereich der kardiovaskulären Chirurgie als Material für verwandte Stents [52-55]. In der Orthopädie und Unfallchirurgie werden Magnesium und seine Legierungen bisher bereits als Werkstoff für Schraubenimplantate verwendet. Unter physiologischen Bedingungen weist Magnesium eine sehr hohe Degradationsgeschwindigkeit auf, so dass es den gewünschten mechanischen Anforderungen gerade für größere knöcherne Defekte nicht mehr genügt. Ferner kommt es bei der Degradation von Magnesium zur Bildung von wasserstoffhaltigen Gasblasen, welche die Möglichkeiten der intraossären Anwendung limitieren [56]. Dieses Problem konnte durch die Verwendung von Legierungspartnern reduziert werden [21].

5. Zusammenfassung

Die Zielsetzung dieser Arbeit beinhaltet die Entwicklung und Erprobung eines degradierbaren zellulären Ersatzmaterials für Knochen auf Metallbasis.

In mehreren Vorversuchen wurden dabei verschiedenen Legierungen hinsichtlich ihrer Biokompatibilität sowie ihrer Korrosionsfähigkeit untersucht. Die entsprechende Legierung sollte keine zu schnelle Korrosionsgeschwindigkeit aufweisen, um so temporär als Knochenersatz auch der nötigen Festigkeit und lasttragenden Funktion des Knochens gerecht werden zu können.

In der Literatur wurden auch Eisenlegierungen in der kardiovaskulären Chirurgie mit einer guten Biokompatibilität neben einer vergleichsweise langsamen Korrosionsfähigkeit beschrieben. Da Eisen weiterhin als körpereigenes Element eine hohe Festigkeit aufweist, scheinen hier die notwendigen Voraussetzungen für die Entwicklung eines Werkstoffs gegeben.

In den durchgeführten *in vitro* Vorversuchen innerhalb des Projekts wurde eine Eisenlegierung mit einem 1,6%-igem Phosphoranteil auf Grund der niedrigen Zytotoxizität und der entsprechenden mechanischen Eigenschaften für die Verwendung *in vivo* ausgewählt.

Die postoperative Auswertung gliedert sich in die histopathologische Begutachtung der Präparate auf der einen sowie in die Erfassung des neugebildeten Knochens im Rahmen der Kontaktradiographie auf der anderen Seite. Insgesamt konnte eine gute Implantatintegration mit periimplantärer Knochenneubildung gezeigt werden. Dabei gab es keinen Hinweis auf Entzündungs- oder negative Immunreaktionen. Unstrittig ist auch, dass die Degradation des Implantats in allen Gruppen beider Dichten nachweislich stattfindet. Die Geschwindigkeit entspricht nicht den Erwartungen aus den *in vitro* Versuchen und läuft langsamer als erwartet ab.

Ein Widerspruch ist bei der Betrachtung der Ergebnisse aus der histopathologischen Bewertung die Knochenneubildung und stattgehabte Mineralisation betreffend sowie der kontaktradiographischen Auswertung der Knochenneubildung auffällig. Während das Knochenwachstum der Gruppe 1.4 im Implantatbereich vom Zeitraum sechs auf zwölf

Monate signifikant abnimmt, zeigt sich gerade in der Langzeitgruppe eine deutlich zunehmende Mineralisation des vorhandenen Knochengewebes.

Für diesen Vorgang bietet die Literatur keine Erklärung. Dass die beginnende Mineralisation gerade in der Langzeitgruppe, das heißt bei Knochen/Osteoid mit zunehmenden Entstehungsalter zu finden ist und mit einer vermehrten Festigkeit korreliert, ist ein denkbarer Ansatz. Weiterhin muss auch die jeweilige Porengröße und Offenporigkeit der Implantate in diesem Zusammenhang diskutiert werden.

Die erzielten Ergebnisse dieser Studie sowie die bisherigen Angaben der Literatur unterstreichen die Annahme, dass Legierungen auf Eisenbasis grundsätzlich als degradierbare Knochenersatzmaterialien geeignet sind. Dabei kommt in Zukunft weiterhin der Legierungsentwicklung eine entscheidende Aufgabe zu. Es gilt die Korrosionsgeschwindigkeit zu erhöhen und in gleichem Zug nicht in den erforderlichen mechanischen Eigenschaften einzubüßen.

6. Literatur

1. Giannoudis P.V., Dinopoulos H. and Tsiridis E. Bone substitutes: an update. *Injury*, 2005. 36 Suppl 3:S20-7.
2. Ollier L. *Traité de la régénération des os et de la production artificielle du tissu osseux*. Victor Mason et Fils, Paris 1867.
3. Axhausen W. The osteogenetic phases of regeneration of bone; a historical and experimental study. *The Journal of bone and joint surgery American volume* 1956;38-A:593-600.
4. Heinemann S. et al. [Resorbable bone substitution materials: An overview of commercially available materials and new approaches in the field of composites]. *Der Orthopade* 2011. 40: S. 761-73.
5. Wintermantel E. and Suk-Woo H. eds. *Medizintechnik – Life Science Engineering*, Springer Berlin Heidelberg, 4. Auflage. 2008.
6. Schenk R.K. Bone response to grafts and implants, in O.C.C Lin and E.Y.S. Chao, eds. *Perspectives on biomaterials, Materials science monographs*1. Elsevier, Taipei, Taiwan, 1986, p. 121-136.
7. Black J. Systemic effects of biomaterials. *Biomaterials*. 1984. 5: p. 11-8.
8. Hofmann G.O. Biodegradable implants in orthopaedic surgery - a review on the state-of-the-art. *Clinical Materials*, 1992; 10:1-2
9. Claes L.E. Mechanical characterization of biodegradable implants. *Clinical Materials*, 1992; 10:1-2:41-6.
10. Schnurer S.M. et al. [Bone substitutes]. *Orthopade*, 2003. 32: p. 2-10.
11. Witte F., Calliess T. and Windhagen H. [Biodegradable synthetic implant materials : clinical applications and immunological aspects]. *Der Orthopade*, 2008. 37: p. 125-30.
12. Damien C.J. and Parsons J.R. Bone graft and bone graft substitutes: a review of current technology and applications. *Journal of applied Biomaterials*, 1991. 2: p. 187-208.
13. Hench L.L. The story of Bioglass. *Journal of materials science Materials in Medicine*, 2006. 17: p. 967-78.
14. Arcos D., Izquierdo-Barba I. and Vallet-Regi M. Promising trends of bioceramics in the biomaterials field. *Journal of materials science Materials in Medicine*, 2009. 20: p. 447-55.
15. Takagi S. and Chow L.C. Formation of macropores in calcium phosphate cement implants. *Journal of materials science Materials in Medicine*, 2001. 12: p. 135-9.

16. Jansson V. et al. [A new resorbable bone-cartilage replacement transplant. Results of an animal experiment study]. *Der Orthopade*, 2000. 29: p. 151-7.
17. Epple M. Biomimetic Bone Substitution Materials, in *Handbook of Biomineralization: Biological Aspects and Structure Formation* (ed E. Bäuerlein), Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, Germany.
18. Prokop A. et al. Biodegradable implants for Pipkin fractures. *Clinical Orthopedic Relat. Res.*, 2005: p. 226-33.
19. Santavirta S. et al. Immune response to polyglycolic acid implants. *Journal of bone and joint surgery British volume*, 1990. 72: p. 597-600.
20. Schieker M., Seitz S., Gulkan H., Nentwich M., Horvath G., Regauer M., Milz S., Mutschler W. [Tissueengineering of bone. Integration and migration of human mesenchymal stem cells in colonized constructs in a murine model]. *Der Orthopade* 2004;33:1354-60.
21. Witte F. et al. In vivo corrosion of four magnesium alloys and the associated bone response. *Biomaterials*, 2005. 26: p. 3557-63
22. Wadley H. Cellular Metals Manufacturing. *Advanced Engineering Materials*, 4: 726–733.
23. Wegener B, Sichler A, Milz S, Sprecher C, Pieper K, Hermanns W, Jansson V, Nies B, Kieback B, Muller PE, Wegener V, Quadbeck P. Development of a novel biodegradable porous iron-based implant for bone replacement. *Sci Rep* 2020;10:9141. Pilliar R.M. Powder metal-made orthopedic implants with porous surface for fixation by tissue ingrowth. *Clinical orthopaedics and related research*, 1983, 176: p. 42-51.
24. Pilliar R.M. Powder metal-made orthopedic implants with porous surface for fixation by tissue ingrowth. *Clinical orthopaedics and related research*, 1983, 176: p. 42-51.
25. Klawitter J. and Hulbert S. Application of porous ceramics for the attachment of load bearing internal orthopaedic applications. *Journal of biomedical materials research*, 1971. 2: p. 161–229.
26. Flatley T.J., Lynch K.L. and Benson M. Tissue response to implants of calcium phosphate ceramic in the rabbit spine. *Clinical orthopaedics and related research*, 1983, 179: p. 246-52.
27. Witte F. et al. Biodegradable magnesium scaffolds: Part I: appropriate inflammatory response. *Journal of biomedical materials research Part A*, 2007. 81: p. 748-56.
28. Witte F. et al. Biodegradable magnesium scaffolds: Part II: peri-implant bone remodeling. *Journal of biomedical materials research Part A*, 2007. 81: p. 757-65.
29. Witte F. et al. Evaluation of the skin sensitizing potential of biodegradable magnesium alloys. *Journal of biomedical materials research Part A*, 2008. 86: p. 1041-7.

30. Zhang E., Chen H. and Shen F. Biocorrosion properties and blood and cell compatibility of pure iron as a biodegradable biomaterial. *Journal of materials science Materials in Medicine*, 2010. 21: p. 2151-63.
31. Mueller PP., May T., Perz A., Hauser H., Peuster M. Control of smooth muscle cell proliferation by ferrous iron. *Biomaterials*
32. Peuster M., Hesse C., Schloo T., Fink C., Beerbaum P., von Schnakenburg C. Long-term biocompatibility of a corrodible peripheral iron stent in the porcine descending aorta. *Biomaterials* 2006;27:4955-62.
33. Mueller PP., Arnold S., Badar M., Bormann D., Bach FW., Drynda A., Meyer-Lindenberg A., Hauser H., Peuster M. Histological and molecular evaluation of iron as degradable medical implant material in a murine animal model. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 2012;100A:2881-9.
34. Peuster M., Wohlsein P., Brugmann M., Ehlerding M., Seidler K., Fink C., Brauer H., Fischer A., Hausdorf G. A novel approach to temporary stenting: degradable cardiovascular stents produced from corrodible metal-results 6-18 months after implantation into New Zealand white rabbits. *Heart* 2001;86:563-9.
35. Wegener B, Sievers B, Utschneider S, Muller P, Jansson V, Rossler S, Nies B, Stephani G, Kieback B, Quadbeck P. Microstructure, cytotoxicity and corrosion of powder-metallurgical iron alloys for biodegradable bone replacement materials. *Mater Sci Eng B-Adv* 2011;176:1789-96.
36. Prendergast PJ., Huiskes R., Soballe K. Biophysical stimuli on cells during tissue differentiation at implant interfaces. *Journal of biomechanics* 1997;30:539-48.
37. Tagil M., Aspenberg P. Impaction of cancellous bone grafts impairs osteoconduction in titanium chambers. *Clinical orthopaedics and related research* 1998:231-8.
38. Carter DR., Wong M., Orr TE. Musculoskeletal ontogeny, phylogeny and functional adaptation. *Journal of biomechanics* 1991;24 Suppl 1:3-16.
39. Huiskes R., Weinans H., Grootenboer HJ., Dalstra M., Fudala B., Slooff TJ. Adaptive bone-remodeling theory applied to prosthetic-design analysis. *Journal of biomechanics* 1987;20:1135-50.
40. Kummer B. [Basics of Pauwels' theory of the functional adaptation of bones]. *Der Orthopade* 1995;24:387-93.
41. Molinari A. Unravelling corrosion in P-enriched stainless steel. *Metal Powder Report* 1999;54:30-5.

42. Pearce A.I. et al. Animal models for implant biomaterial research in bone: a review. *Eur Cell Mater*, 2007. 13: p. 1-10.
43. Newman E., Turner A.S. and Wark J.D. The potential of sheep for the study of osteopenia: current status and comparison with other animal models. *Bone*, 1995. 16: p. 277S-284S.
44. Auer J.A. et al. Refining animal models in fracture research: seeking consensus in optimising both animal welfare and scientific validity for appropriate biomedical use. *BMC Musculoskelet Disord*, 2007. 8: p. 72.
45. Nunamaker D.M. Experimental models of fracture repair. *Clinical orthopaedics and related research*, 1998: p. S56-65.
46. Nuss K.M. et al. An animal model in sheep for biocompatibility testing of biomaterials in cancellous bones. *BMC Musculoskelet Disord*, 2006. 7: p. 67.
47. Haverová L, Oriňáková R, Orinak A, Gorejová R, Baláž M, Vanýsek P, Kupková M, Hrubovčáková M, Mudroň P, Radonak J, Orsagova Kralova Z, Morovska Turonova A. An In Vitro Corrosion Study of Open Cell Iron Structures with PEG Coating for Bone Replacement Applications. *Metals* 2018;8:499.
48. Lin W-J, Zhang D-Y, Zhang G, Sun H-T, Qi H-P, Chen L-P, Liu Z-Q, Gao R-L, Zheng W. Design and characterization of a novel biocorrosible iron-based drug-eluting coronary scaffold. *Materials & Design* 2016;91:72-9.
49. Kraus T, Moszner F, Fischerauer S, Fiedler M, Martinelli E, Eichler J, Witte F, Willbold E, Schinhammer M, Meischel M, Uggowitz PJ, Löffler JF, Weinberg A. Biodegradable Fe-based alloys for use in osteosynthesis: outcome of an in vivo study after 52 weeks. *Acta biomaterialia* 2014;10:3346-53.
50. Witte F, Calliess T, Windhagen H. [Biodegradable synthetic implant materials : clinical applications and immunological aspects]. *Der Orthopade* 2008;37:125-30.
51. Witte F, Fischer J, Nellesen J, Crostack HA, Kaese V, Pisch A, Beckmann F, Windhagen H. In vitro and in vivo corrosion measurements of magnesium alloys. *Biomaterials* 2006;27:1013-8.
52. Drynda A, Hassel T, Hoehn R, Perz A, Bach FW, Peuster M. Development and biocompatibility of a novel corrodible fluoride-coated magnesium-calcium alloy with improved degradation kinetics and adequate mechanical properties for cardiovascular applications. *Journal of biomedical materials research Part A* 2010;93:763-75.
53. Hermawan H, Dube D, Mantovani D. Developments in metallic biodegradable stents. *Acta biomaterialia* 2010;6:1693-7

54. Peuster M, Beerbaum P, Bach FW, Hauser H. Are resorbable implants about to become a reality? *Cardiology in the young* 2006;16:107-16.
55. Hermawan H, Dube D, Mantovani D. Degradable metallic biomaterials: design and development of Fe-Mn alloys for stents. *Journal of biomedical materials research Part A* 2010;93:1-11
56. Ohta S. Molecular hydrogen as a preventive and therapeutic medical gas: initiation, development and potential of hydrogen medicine. *Pharmacology & Therapeutics* 2014; 144: 1-11.

7. Anhang

Übersicht der einzelnen Abbildungen

Abbildung 1: Übersicht der Gruppeneinteilung sowie der Zahl der randomisierten Versuchstiere

Abbildung 2: Offenporiges zelluläres Implantat in konisch/zylindrischer Form, Größe 15x10 mm

Abbildung 3: intraoperativer Situs mit Implantat, postoperative Röntgenkontrolle

Abbildung 4: Schnittstelle für die Auswahl histologischer Schnitte

Abbildung 5: links dargestellt eine repräsentative Kontaktradiographie, rechts der gleiche Querschnitt unter Einblendung der ROI

Abbildung 6: Repräsentative Kontaktradiographie eines MMA eingebetteten, nicht entkalkifizierten Schnittes 6 Monate nach Implantation

Abbildung 7: Übersicht der Gruppeneinteilung nach Ablauf der Versuchszeiträume

Abbildung 8: disloziertes Implantatmaterial Verlaufskontrolle 3 Monate
(Schaf, Histonummer 22928, Kurzzeitgruppe 1.4)

Abbildung 9: Histonummer 22795, GE; links deutlich verdichteter mineralisierter Knochenring (rot), der in Kontakt mit dem spongiösen Implantatzylinder (schwarz, rechts) eine beginnende knöcherne Verankerung aufweist

Abbildung 10: Histonummer 22795, GE; Randbereich eines Implantats mit angrenzendem Implantatlager: sowohl um das Implantat wie auch um den angrenzenden Lagerknochen findet sich (blau angefärbtes) Osteoid, welches von deutlich erkennbaren Osteoblastensäumen (perlschnurartig angeordnete Zellen) angelagert wird

Abbildung 11: Mehrkernige Riesenfresszelle im Übergang Bindegewebe – Implantat (Zellkerne stark gefärbt)

Abbildung 12: Histonummer 22924, GE; nicht offener Bereich eines Implantates (rot umrandet) als in sich abgeschlossener Raum

- Abbildung 13: Histologische Darstellung der Fluoreszenzbanden von Calceingrün und Xylenolorange in einem Tier der Langzeitgruppe 1.0 (Histonummer 23059)
- Abbildung 14: Graphische Darstellung der Knochenneubildung der Implantatgruppe 1.0 über den Maximalzeitraum von 12 Monaten. Farblich entsprechen die fünf Kurven den jeweilig definierten ROI
- Abbildung 15: Graphische Darstellung der Knochenneubildung der Implantatgruppe 1.4 über den Maximalzeitraum von 12 Monaten. Farblich entsprechen die fünf Kurven den jeweilig definierten ROI
- Abbildung 16: Wilcoxon-Test über die Mediane der einzelnen ROI aller Gruppen mit Darstellung der signifikanten Unterschiede der Knochenanteile gegenüber dem „Partial-Volume“-Effekt
- Abbildung 17: Boxplot-Diagramm mit Veranschaulichung des signifikanten Unterschiedes des prozentualen Knochenanteils im ROI Yellow der Kurz- und Langzeitgruppe 1.0
- Abbildung 18: Boxplot-Diagramm mit Darstellung der jeweilig nicht bestehenden Signifikanz im prozentualen Knochenanteil des ROI Fuchsia in den miteinander verglichenen Gruppen
- Abbildung 19: Boxplot-Diagramm mit Darstellung des signifikanten Unterschieds im prozentualen Knochenanteil der ROI Olive zugunsten der Langzeitgruppe 1.0 im Vergleich zur Kurzzeitgruppe 1.0
- Abbildung 20: Zwei signifikante Zusammenhänge im Boxplot-Diagramm der ROI Lime:
In der Langzeitgruppe 1.0 besteht ein signifikant höherer prozentualer Knochenanteil verglichen mit der Kurzzeitgruppe 1.0, in der Langzeitgruppe 1.4 ein signifikant niedrigerer Knochenanteil verglichen mit der Kurzzeitgruppe 1.4.

Abbildung 21: Zwei signifikante Zusammenhänge im Boxplot-Diagramm der ROI Aqua:

In der Langzeitgruppe 1.0 besteht ein signifikant höherer prozentualer Knochenanteil verglichen mit der Kurzzeitgruppe 1.0, in der Langzeitgruppe 1.4 ein signifikant niedrigerer Knochenanteil verglichen mit der Kurzzeitgruppe 1.4.

Abbildung 22: Kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Kurzzeitgruppen im prozentualen Knochenanteil der ROI Yellow

Abbildung 23: Kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Kurzzeitgruppen im prozentualen Knochenanteil der ROI Fuchsia

Abbildung 24: signifikanter Unterschied zwischen den jeweiligen Implantatkurzzeitgruppen und der Leerlochgruppe im prozentualen Knochenanteil der ROI Olive.

Abbildung 25: kein signifikanter Unterschied zu den einzelnen Kurzzeitgruppen im prozentualen Knochenanteil der ROI Lime

Abbildung 26: kein signifikanter Unterschied zu den einzelnen Kurzzeitgruppen im prozentualen Knochenanteil der ROI Aqua

Abbildung 27: keine signifikanten prozentualen Implantatveränderungen im Vergleich der einzelnen Gruppen 1.0 sowie 1.4 der ROI Olive

Abbildung 28: Keine signifikanten prozentualen Implantatveränderungen im Vergleich der einzelnen Gruppen 1.0 sowie 1.4 der ROI Lime

Abbildung 29: Keine signifikanten prozentualen Implantatveränderungen im Vergleich der einzelnen Gruppen 1.0 sowie 1.4 der ROI Aqua

Übersicht der einzelnen Tabellen

Tabelle 1: Reaktion des Lagerknochens um das Implantat in der Leerlochgruppe

Tabelle 2: Reaktion des Lagerknochens um das Implantat in der Kurzzeitgruppe 1.0

Tabelle 3: Reaktion des Lagerknochens um das Implantat in der Kurzzeitgruppe 1.4

Tabelle 4: Reaktion des Lagerknochens um das Implantat in der Langzeitgruppe 1.0

Tabelle 5: Reaktion des Lagerknochens um das Implantat in der Langzeitgruppe 1.4

Tabelle 6: Osteoidbildung in der Leerlochgruppe

Tabelle 7: Osteoidbildung in der Kurzzeitgruppe 1.0

Tabelle 8: Osteoidbildung in der Kurzzeitgruppe 1.4

Tabelle 9: Osteoidbildung in der Langzeitgruppe 1.0

Tabelle 10: Osteoidbildung in der Langzeitgruppe 1.4

Tabelle 11: Bräunlicher Niederschlag in der Leerlochgruppe

Tabelle 12: Bräunlicher Niederschlag in der Kurzzeitgruppe 1.0

Tabelle 13: Bräunlicher Niederschlag in der Kurzzeitgruppe 1.4

Tabelle 14: Bräunlicher Niederschlag in der Langzeitgruppe 1.0

Tabelle 15: Bräunlicher Niederschlag in der Langzeitgruppe 1.4

Tabelle 16: Mann-Whitney-U Test Ergebnisse der Kurzzeitgruppe

Tabelle 17: Übersichtstabelle der angewendeten Testverfahren sowie der Veränderung des erfassten Knochens (ROI Knochen) und des Implantates (ROI Implantat)

Affidavit

	LUDWIG- MAXIMILIANS- UNIVERSITÄT MÜNCHEN	Promotionsbüro Medizinische Fakultät	 
Eidesstattliche Versicherung			

Sichler, Anton Maximilian

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel:

Resorptionsverhalten und Biokompatibilität eines neuen degradierbaren eisenbasierten Biomaterials als Knochenersatz

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Grassau, 20.05.2022

Ort, Datum

Sichler Anton

Unterschrift Doktorandin bzw. Doktorand

8. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen einen herzlichen Dank aussprechen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ganz besonders ist es mir ein Anliegen, bei meinem Betreuer Prof. Dr. Bernd Wegener großen Dank zu sagen. Er war die treibende Kraft dieser Arbeit, hatte stets ein offenes Ohr für Probleme oder Fragen und hat mich zu jeder Zeit uneingeschränkt unterstützt. Seine motivierenden, zu rechter Zeit auch mahnenden, aber stets konstruktiven Anregungen zeigten mir immer wieder das Ziel vor Augen und den Weg dorthin auf.

Des weiteren darf ich mich bei Herrn Prof. Dr. Stefan Milz für die Durchsicht der histologischen Präparate und die vielen guten Ratschläge und Expertisen herzlich bedanken. Herrn Dr. Christoph Sprecher und seinem Team im AO Forschungsinstitut in Davos gilt für die Unterstützung bei der Auswertung der Histologien, insbesondere für die Hilfe bei der Datenverarbeitung, und für die freundschaftliche Aufnahme meinerseits meine besondere Wertschätzung.

Ein liebevoller Dank gebührt meinen Eltern, die mich auf Ihre ganz persönliche Art unermüdlich und uneingeschränkt unterstützten. Dabei möchte ich diese Arbeit besonders meiner Mutter widmen, die leider viel zu früh den Kampf gegen Ihre schwere Krankheit verloren hat. Ihr war es bis zuletzt sehr wichtig, dass ich meine Doktorarbeit erfolgreich abschließen.

Als letztes möchte ich meiner Ehefrau Katharina und meinen vier Kindern Veronika, Anton, Marlena und Kathrin von Herzen Danke sagen: meinen Kindern, die mir durch Ihre fröhliche und liebevolle Art Auftrieb und Lebensfreude vermitteln; meiner Frau, die mir in gewiss schweren und nicht immer stressfreien Stunden immer Ihren Rückhalt gewährte und den Weg mit mir gemeinsam geht.