

In-vivo-Untersuchung zu offenporigen Magnesium-Scaffolds der
Legierung LAE442 in der Kaninchentibia

von Marlene Schmidt

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

In-vivo-Untersuchung zu offenporigen Magnesium-Scaffolds der
Legierung LAE442 in der Kaninchentibia

Von Marlene Schmidt

aus Zella-Mehlis

München 2023

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

Lehrstuhl für Chirurgie der Kleintiere

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

Mitbetreuung durch:
Dr. Anja-Christina Waselau

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

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

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

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

Tag der Promotion: 22. Juli 2023

Meiner Familie

Ergebnisse dieser Dissertation wurden auf folgendem Fachkongress präsentiert:

Annual Meeting of the German Society for Biomaterials (DGBM), 15. – 17. September 2022,
Essen, Jahrestagung der deutschen Gesellschaft für Biomaterialien

Implementation of an open-wedge high tibial osteotomy in rabbits to investigate the porous magnesium scaffold LAE442

M. Schmidt, F. Feichtner, S. Julmi, C. Klose, A.-C. Waselau, A. Meyer-Lindenberg

INHALTSVERZEICHNIS:

I.	EINLEITUNG	1
II.	LITERATURÜBERSICHT.....	3
1.	Knochen	3
1.1.	Regeneration des Knochens	3
1.2.	Arten von Knochengewebe	5
1.3.	Remodelling	5
1.4.	Osteotomie und Osteotomieheilung.....	6
2.	Knochenersatzstoffe und Knochentransplantate.....	7
2.1.	Historie des Knochenersatzes	7
2.2.	Eigenschaften von Knochentransplantaten und Knochenersatzstoffen	8
2.3.	Reaktion des Knochens auf ein Knochenersatzmaterial	8
2.4.	Nicht resorbierbare Knochenersatzstoffe.....	9
2.4.1.	Titaniumscaffolds	9
2.5.	Resorbierbare Knochenersatzstoffe	10
2.5.1.	Natürliche Knochenersatzstoffe.....	10
2.5.1.1.	Autogene Transplantate	10
2.5.1.2.	Allogene Transplantate	10
2.5.1.3.	Xenogene Transplantate.....	11
2.5.2.	synthetische Knochenersatzstoffe	11
2.5.2.1.	Keramiken.....	11
2.5.2.2.	Bioresorbierbare Polymere	12
2.5.2.3.	Eisenscaffolds	12
2.5.3.	Magnesium und seine Legierungen	13
2.5.3.1.	Geschichte von Magnesium und seinen Legierungen.....	13
2.5.3.2.	Magnesium und seine Legierungen als Festkörper.....	13
2.5.3.3.	Magnesium und seine Legierungen als Scaffold	15
3.	Methoden zur Untersuchung von Knochenersatzstoffen.....	16
3.1.	Histologische Untersuchung	16
3.2.	Histomorphometrie	17
3.3.	Rasterelektronenmikroskop und energiedispersive Röntgenspektroskopie.....	17
3.4.	Mikrocomputertomographie	18
III.	PUBLIKATION.....	19

IV.	DISKUSSION	39
V.	ZUSAMMENFASSUNG.....	51
VI.	SUMMARY.....	53
VII.	LITERATURVERZEICHNIS	55
VIII.	DANKSAGUNG	73

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS:

μCT	Mikrocomputertomographie
Al	Aluminium
AX30	Magnesiumlegierung mit 3 Ma.-% Aluminium und ≤ 1 Ma.-% Calcium
AZ31	Magnesiumlegierung mit 3 Ma.-% Aluminium, 1 Ma.-% Zink
AZ91	Magnesiumlegierung mit 9 Ma.-% Aluminium, 1 Ma.-% Zink
BMU	basic multicellular unit
CaP	Calciumphosphat
CT	Computertomograph
EDX	Energy dispersive X-ray
LACer442	Magnesiumlegierung mit 4 Ma.-% Lithium, 4 Ma.-% Aluminium und 2 Ma.-% Cerium
LAE442	Magnesiumlegierung mit 4 Ma.-% Lithium, 4 Ma.-% Aluminium und 2 Ma.-% Seltenen Erden
LANd442	Magnesiumlegierung mit 4 Ma.-% Lithium, 4 Ma.-% Aluminium und 2 Ma.-% Neodym
MAO	micro-arc oxidation
Mg	Magnesium
MgCa0,8	Magnesiumlegierung mit 0,8 Ma.-% Calcium
MgF ₂	Magnesiumfluorid
PCL	Polycaprolacton
PGA	Poly glycolic acid (= Polyglycolid)
PLA	Poly lactid
PLGA	Poly(lactid-co-glycolid)
REM	Rasterelektronenmikroskop
WE43	Magnesiumlegierung mit 4 Ma.-% Yttrium, 3 Ma.-% Seltenen Erden

I. EINLEITUNG

Große Knochendefekte stellen eine beträchtliche Herausforderung in der chirurgischen Versorgung dar, da der Körper diese Defekte nicht selbst heilen kann (Petite et al. 2000, Gartzke et al. 2019). Autologe Knochentransplantate gelten als Goldstandard zur Behandlung dieser Defekte aufgrund ihrer osteogenen, osteokonduktiven und osteoinduktiven Eigenschaften (Dimitriou et al. 2011). Jedoch ist die Menge autologen Knochens, welcher gewonnen werden kann, limitiert und beinhaltet das Risiko einer Infektion und die Morbidität an der Spenderstelle (Sen & Miclau 2007). Aufgrund der Nachteile von Transplantaten wird an der Entwicklung von synthetisch hergestellten resorbierbaren Knochenersatzstoffen geforscht (Witte et al. 2006, Hampp et al. 2013, Willbold et al. 2013, Angrisani et al. 2016). Der ideale Knochenersatz sollte eine gute Biokompatibilität aufweisen, damit der Knochendefekt heilen kann. Er sollte die Knochenbildung fördern und sobald der Defekt konsolidiert ist, sollte der Knochenersatz im idealsten Falle degradieren und resorbiert werden, ohne toxisch auf den Organismus zu wirken (Yuen & Ip 2010, Wu et al. 2019). All diese Anforderungen an ein ideales Knochenersatzmaterial werden durch die Eigenschaften des Biomaterials Magnesium (Mg) größtenteils abgedeckt (Wu et al. 2019). Andere resorbierbare Knochenersatzmaterialien wie Hydroxylapatit und Trikalziumphosphat, die zu den Keramiken gehören, sowie auch Polymere weisen schlechtere mechanische Eigenschaften als Mg auf (Hofmann 1995, Gogolewski 2000, Salgado et al. 2004, Müller et al. 2006). Auch aufgrund seiner biologischen Abbaubarkeit und Resorptionsfähigkeit, ohne dabei lokale oder systemische toxische Effekte zu verursachen, wird Mg für den Einsatz als Knochenersatzmaterial als geeignet eingestuft (Claes 1992, Yuen & Ip 2010). Zusätzlich fördert Mg die Knochenneubildung (Kraus et al. 2012). Es ist bekannt, dass es zu einer Gasbildung während der Degradation von Mg kommt (Song & Atrens 2003). Dies kann zu Problemen in der Verwendung von diesem Biomaterial führen, da dieses Gas im umgebenden Gewebe akkumulieren kann, wenn die Degradationsprozesse zu schnell ablaufen (Witte et al. 2005, Wu et al. 2019). Eine Reduzierung der Korrosionsrate und Verbesserung der mechanischen Eigenschaften von Knochenersatzstoffen auf Mg-Basis können durch eine Beschichtung (Wang et al. 2012, Shadanbaz et al. 2014) sowie auch durch die Wahl einer geeigneten Porengröße erreicht werden (Del Valle et al. 2006, Del Valle & Ruano 2008, Alvarez-Lopez et al. 2010). So wurde gezeigt, dass eine Magnesiumfluorid (MgF_2)-Schicht auf der Metalloberfläche die Korrosionsanfälligkeit von Mg reduziert (Thomann et al. 2010, Lalk et al. 2013). Mit einer zusätzlichen Calciumphosphat (CaP)-Schicht auf einer unterliegenden MgF_2 -Schicht konnte die Korrosionsbeständigkeit *in vitro* und *in vivo* weiter erhöht werden (Julmi et al. 2019, Wang et al. 2019, Witting et al. 2020). Das Ziel der Verwendung offenporiger

Scaffolds auf Mg-Basis besteht im Einwachsen von Knochengewebe in das Scaffold bei gleichzeitiger Degradation des Scaffoldmaterials (Lalk et al. 2013, Julmi et al. 2017).

Um die Gasbildung und das Korrosionsverhalten von Mg weiter zu reduzieren, wurden verschiedene Mg-Legierungen entwickelt (Witte et al. 2005, Alvarez-Lopez et al. 2010, Bondarenko et al. 2013). Unter diesen zeigte die Mg-Legierung LAE442 (4 Ma.-% Lithium, 4 Ma.-% Aluminium und 2 Ma.-% Seltene Erden) sowohl als Vollkörper (Witte et al. 2005, Thomann et al. 2009, Reifenrath et al. 2010, Bondarenko et al. 2011) als auch als Scaffold mit interkonnektierenden Poren eine langsame und homogene Degradation sowie eine gute Biokompatibilität (Kleer et al. 2019, Augustin et al. 2020, Witting et al. 2020, Kleer-Reiter et al. 2021).

Bisher wurde dieses vielversprechende Material jedoch nur im unbelasteten Knochen untersucht, sodass in der vorliegenden Studie die *In-vivo*-Untersuchung eines offenporigen Keiles aus LAE442 mit zwei verschiedenen Beschichtungen im stärker gewichtstragenden Knochen thematisiert wird. Die Operation erfolgte in Form einer aufklappenden Korrekturosteotomie der proximalen Tibia im Kaninchenmodell. Ziel dieser Studie war die Evaluation des Degradationsverhaltens, der Biokompatibilität und der Osseointegration dieses Materiales als möglicher Knochenersatzstoff zur operativen Versorgung von Korrekturosteotomien.

II. LITERATURÜBERSICHT

1. Knochen

1.1. Regeneration des Knochens

Die organische Komponente der Knochenmatrix wird von Osteoblasten gebildet. Im Endost und Periost des Knochens sind Vorläuferzellen von Osteoblasten zu finden, welche eine wichtige Rolle während des Knochenaufbaus und während der Heilung von knöchernen Defekten einnehmen. Ansonsten befinden sich Osteoblasten lediglich an der Knochenoberfläche (Junqueira et al. 2004).

Im Zuge der Neubildung von Knochengewebe wird zunächst durch Osteoblasten nicht mineralisierte Knochenmatrix (Osteoid), bestehend aus Glykoproteinen, Proteoglykanen und Typ-I-Kollagen, gebildet. Durch die Einlagerung von anorganischen Salzen in Form von Hydroxylapatitkristallen mineralisiert (verkalkt) das Osteoid zu Ossein aus, welches zu 35 % aus organischer Grundsubstanz und zu 65 % aus anorganischen Salzen besteht (Seeger 2010). Pro Tag können Osteoblasten einen ca. 1 μm breiten Osteoidsaum bilden. Innerhalb von 3 – 4 Tagen mineralisiert 70 % des Osteoids und nach 6 Wochen ist dieser Vorgang abgeschlossen (Liebich 2010).

Der Prozess der Mineralisierung ist noch nicht abschließend erforscht. Er beginnt mit der Ablagerung von Kalziumphosphat auf den Kollagenfibrillen. Dieser Vorgang wird durch Osteocalcin, Osteopontin, Osteonektin und anderen Proteinen, die von den Osteoblasten gebildet werden, sowie auch von Proteoglykanen unterstützt (Junqueira et al. 2004, Liebich 2010). Es wird vermutet, dass die Ablagerung von Kalziumsalzen sowie auch die Umwandlung dieser in Hydroxylapatitkristalle durch Matrixvesikel beschleunigt wird, welche sich von den Osteoblasten abschnüren. Auch die alkalische Phosphatase, welche auf der Oberfläche von Osteoblasten verankert ist, ist an einem noch nicht erforschten Prozess an der Mineralisation beteiligt (Junqueira et al. 2004).

Im Zuge der Mineralisierung werden Osteoblasten in den Knochen eingeschlossen. Sie differenzieren zu reifen Knochenzellen, sogenannten Osteozyten, innerhalb von ca. 3 Tagen aus (Liebich 2010). Osteozyten liegen einzeln in den Lakunen der Knochenmatrix und sind durch Kanalikuli miteinander verbunden (Junqueira et al. 2004, Seeger 2010), wodurch sie die

extrazelluläre Matrix aufrechterhalten und auf die mechanische Beanspruchung des Knochens reagieren können (Junqueira et al. 2004).

Knochengewebe kann auf zwei Arten entstehen. Es entsteht entweder durch die Differenzierung mesenchymaler Zellen zu Osteoblasten und folgender Mineralisierung der von Osteoblasten sezernierten Matrix (desmale oder direkte Ossifikation) oder durch den Umbau zuvor angelegten Knorpelgewebes in Knochengewebe (enchondrale oder indirekte Ossifikation) (Junqueira et al. 2004, Seeger 2010).

Beide Formen der Ossifikation beginnen mit dem Auftreten von Geflechtknochen, welcher im zeitnahen Verlauf durch Lamellenknochen ersetzt wird. Geflecht- u. Lamellenknochen können während der Wachstumsphase nebeneinander auftreten (Junqueira et al. 2004).

In der Embryonalphase entstehen durch desmale Ossifikation die parietalen, frontalen, okzipitalen und temporalen Schädelknochen sowie auch Mandibula und Maxilla (Junqueira et al. 2004). Der Knochen entsteht direkt aus Bindegewebe (Sinowatz & Rodler 2017). Der Startpunkt ist ein primäres Ossifikationszentrum. Mesenchymale Zellen wandeln sich in diesem Ossifikationszentrum zu Osteoblasten um. Diese produzieren eine Knochenmatrix, welche anschließend mineralisiert. Diese Mineralisierung hat die Einkapselung einiger Osteoblasten zur Folge und somit bilden sich Geflechtknochenbälkchen (Junqueira et al. 2004). Die Bälkchen wachsen durch Apposition (Kühnel 2014, Sinowatz & Rodler 2017). Zwischen diese Bälkchen wachsen Blutgefäße ein und an dieser Stelle differenzieren sich Mesenchymzellen zu Knochenmarkszellen. Durch weitere Teilung mesenchymaler Zellen und Differenzierung zu Osteoblasten wächst das Ossifikationszentrum. Durch das Verschmelzen mehrerer Ossifikationszentren wird das ursprüngliche Bindegewebe ersetzt. So handelt es sich beispielsweise bei den Fontanellen Neugeborener um noch nicht verknöchertes Bindegewebe (Junqueira et al. 2004).

Bei der enchondralen Ossifikation entsteht zunächst, ausgehend von einer Mesenchymverdichtung, ein Modell des zu bildenden Knochens aus Knorpelgewebe. Dieser Knorpel verknöchert im Anschluss. Diese Ossifikationsform findet vorrangig in kurzen und langen Röhrenknochen statt. Sie erfolgt in zwei Phasen. In der ersten Phase kommt es zur Hypertrophie der Chondrozyten. Diese gehen anschließend zugrunde und hinterlassen Lakunen. Die restliche Knorpelmatrix wird entweder abgebaut oder sie verkalkt. In der zweiten Phase erfolgt das Eindringen von Blutgefäßen und mesenchymalen Stammzellen in die

entstandenen Lakunen. Die Stammzellen entwickeln sich zu Osteoblasten, die anschließend die Knorpelreste mit Knochenmatrix überziehen (Junqueira et al. 2004).

1.2. Arten von Knochengewebe

Histologisch sind Lamellenknochen (*Os membranaceum lamellosum*) und Geflechtknochen (*Os membranaceum reticulofibrosus*) unterscheidbar (Junqueira et al. 2004, Liebich 2010). Der Geflechtknochen spielt eine Rolle während der Knochenentwicklung und der Heilung von knöchernen Defekten. Das knöcherne Skelett von Adulten besteht hauptsächlich aus Lamellenknochen mit Ausnahme der Suturen der platten Schädelknochen, der Alveolen der Zähne und der Ansatzstellen einiger Sehnen (Junqueira et al. 2004). Beide Arten von Knochengewebe besitzen qualitativ die gleiche zelluläre, kollagenfaserige und mineralisierte Zusammensetzung, differieren jedoch in der Quantität dieser Bestandteile (Liebich 2010). Der Geflechtknochen (Primärknochen) ist hinsichtlich der Entwicklungsgeschichte die einfachere Form. Er tritt während jeder Knochenneubildung auf. Er wird während der embryonalen Entwicklung angelegt und wird nach der Geburt durch den weiter differenzierten Lamellenknochen ersetzt (Liebich 2010). Der Geflechtknochen zeichnet sich durch einen geringeren Mineralgehalt im Vergleich zum Lamellenknochen (Sekundärknochen) aus. Weiterhin weist er eine zufällige Anordnung der Kollagenfibrillen auf (Junqueira et al. 2004). Der Lamellenknochen ist durch eine streng nach statischen und funktionellen Gesichtspunkten orientierten parallel oder konzentrisch geschichteten Ordnung der Kollagenfasern charakterisiert. Seine strukturelle Grundlage bildet das Osteon (Havers-System) (Liebich 2010).

1.3. Remodelling

Knochengewebe weist im Allgemeinen eine sehr hohe Regenerationsfähigkeit auf. Dieses Regenerationspotential ist essentiell für die Anpassung des Knochens an wechselnde Ansprüche und zeigt sich im ständigen Umbau des Knochens (Remodelling). Durch das hohe Regenerationspotential ist Knochengewebe außerdem fähig, kleinere Verletzungen und Frakturen zu heilen. Das hohe Regenerationspotential von Knochen ist durch die starke Vaskularisation des Gewebes gegeben (Seeger 2010).

Knochenaufbau und Knochenabbau finden parallel zueinander über die gesamte Lebensspanne eines Individuums statt. Während des Wachstums überwiegt der Knochenaufbau (Junqueira et al. 2004). Der Knochenabbau erfolgt über die Resorption verkalkter Knochenmatrix (Ossein) mittels Osteoklasten. Osteoklasten sind mehrkernige Riesenzellen, welche aus Monozyten hervorgehen (Junqueira et al. 2004, Seeger 2010). Sie liegen in so genannten Howship-

Lakunen, welche durch die Resorptionsvorgänge der Osteoklasten entstehen (Sinowitz & Rodler 2017). Die Lebensdauer eines Osteoklasten beträgt ca. 6 Wochen und ein Osteoklast kann pro Zeiteinheit bis zu dreimal mehr Knochenmatrix abbauen als ein Osteoblast aufbaut (Liebich 2010).

Ein Knochenumbau (sog. Turnover) erfolgt bei Kindern bis zu 200-mal schneller als bei Erwachsenen. Beim adulten Menschen wird ca. 10 % der Knochenmasse im Jahr ersetzt. Reguliert wird der Knochenumbau über Druck und Spannung, erzeugt durch Muskelkontraktionen, Körperbewegungen und Hormone (Junqueira et al. 2004). Diese teils auch nur geringen Änderungen der Belastungen werden durch Osteozyten detektiert. Der Knochenumbau erfolgt durch eine gut organisierte Gruppe von Osteoblasten und Osteoklasten, der so genannten „basic multicellular unit“ (BMU) (Welsch & Kummer 2018).

1.4. Osteotomie und Osteotomieheilung

Bei einer Osteotomie wird der Knochen in zwei Segmente geteilt. Im Zuge einer Korrekturosteotomie werden die Diaphyse oder die Metaphyse eines Knochens durchtrennt und neu positioniert. Der dabei entstandene Defekt wird bis zur Durchbauung ruhiggestellt. Diese Osteotomien finden Anwendung zur Korrektur einer Achsenabweichung oder zur Behebung von Rotationsfehlern, die durch Trauma oder eine ungenügende Frakturheilung entstanden sind. Außerdem können durch Korrekturosteotomien Knochen verlängert werden sowie Gelenkinkongruenzen korrigiert werden. Das Ziel einer Korrekturosteotomie besteht darin, die normale Funktionalität einer Gliedmaße durch Repositionierung von Gelenk oder Knochen wiederherzustellen (Welch Fossum 2020).

Unter stabilen Fixationsbedingungen verheilen Knochendefekte im Rahmen der desmalen Ossifikation ohne Bildung einer knorpeligen Zwischenstufe. Im Gegensatz dazu verheilen mechanisch instabil versorgte Knochendefekte über diese knorpelige Zwischenstufe im Zuge der enchondralen Ossifikation (Probst & Spiegel 1997). Jedoch spielt nicht nur die Stabilität des Defektes eine Rolle, sondern auch die Vaskularisation im Defektbereich, sodass auch stabil versorgte Defekte bei unzureichender Blutversorgung über die enchondrale Ossifikation verheilen (Claes et al. 2006).

Der Knochenspalt ist zunächst durch ein Hämatom ausgefüllt, welches durch rupturierte Blutgefäße bedingt ist. Das Hämatom wird anschließend durch Granulationsgewebe mit vielen Makrophagen und Fibroblasten ersetzt. Die Makrophagen entsorgen abgestorbene Knochenzellen und die zerstörte Knochenmatrix. Im Granulationsgewebe entwickelt sich

Bindegewebe, welches die Defektstelle umgibt und zwischen die Knochenenden hineinwächst (Bindegewebskallus). Bei stabilen Verhältnissen und guter Vaskularisation bildet sich hieraus desmaler Knochen, der im nachfolgenden Zeitraum in Lamellenknochen umgebaut wird. Bei einer bestehenden Instabilität oder einer unzureichenden Vaskularisation entsteht zwischen den beschädigten Knochenenden faserreiches Binde- und Knorpelgewebe (fibrocartilaginärer Kallus). Im Anschluss verknöchert ein solcher Knorpelkallus ebenso. Der so entstehende harte Kallus entspricht Geflechtknochen und er kann durch enchondrale und desmale Ossifikation entstehen. Er hat eine reine Stützfunktion, um die Knochenenden stabil zu überbrücken. Das Kallusgewebe wird aufgrund der Belastung des Knochens im weiteren Zeitverlauf umgebaut und schrittweise durch Lamellenknochen ersetzt, wobei es zur Wiederherstellung der Ursprungsform des Knochens kommt (Junqueira et al. 2004, Claes et al. 2006, Welsch & Kummer 2018).

2. Knochenersatzstoffe und Knochentransplantate

Es wird angestrebt, Knochentransplantate bzw. Knochenersatzstoffe zur Verbesserung der Knochenheilung in der Behandlung von Knochendefekten und bei Gelenkarthrosen zu verwenden. Hierbei gibt es folgende Optionen: Autotransplantat (Knochentransplantation innerhalb desselben Menschen oder Tieres), Allotransplantat (Knochentransplantation von einem Individuum zu einem anderen gleicher Art), xenogene Knochentransplantation (Einsetzen von Knochen einer fremden Spezies), synthetische Knochenersatzstoffe, osteogene Zellen, osteoinduktive Wachstumsfaktoren und synthetisch osteokonduktive Matrizen (Oryan et al. 2014, Welch Fossum 2020).

2.1. Historie des Knochenersatzes

Bereits 1668 behandelte der niederländische Chirurg Job van Meekeren erfolgreich den Schädeldefekt eines Soldaten mittels xenogener Knochentransplantation, indem er ein Knochenstück aus einer Hundekalotte transplantierte. Hierbei zeigte sich eine gute Einheilung des Transplantates (De Boer 1988). Die Entwicklung der Anästhesie (1846) und Antisepsis (1864) waren für die weitere Etablierung der Knochentransplantationsmedizin von großer Bedeutung. So konnte der schottische Chirurg Macewen im Jahre 1881 eine allogene Knochentransplantation erfolgreich durchführen. Er rekonstruierte einen 11 cm langen osteomyelitischen Defekt in der Humerusdiaphyse eines dreijährigen Jungen mit allogenen Knochenfragmenten sechs anderer Kinder. Die Knochenfragmente dieser Kinder wurden aufgrund von zuvor vorgenommenen Umstellungsosteotomien an der Tibia gewonnen (Macewen 1881).

2.2. Eigenschaften von Knochentransplantaten und Knochenersatzstoffen

Knochentransplantate und Knochenersatzstoffe sollten aufgrund spezifischer Eigenschaften ausgewählt werden. Zu diesen Eigenschaften gehören Osteogenese, Osteoinduktion, Osteokonduktion und Osteointegration (Welch Fossum 2020).

Die Osteogenese beschreibt im Allgemeinen die Bildung von Knochengewebe. Als Osteogenese wird die Fähigkeit von Zellen verstanden, eine Transplantation zu überleben und daraufhin als Quelle für Osteoblasten zu fungieren. Die Osteoinduktion beschreibt die Fähigkeit eines Materials, die Knochenneubildung anzuregen. Die Osteokonduktion beschreibt das Bereitstellen eines Gerüsts (Leitstruktur) des Materials für das Einwachsen des Wirtsknochens. Die Osteointegration bestimmt die Oberflächenbindung zwischen Transplantat bzw. Knochenersatzstoff und dem Wirtsknochen (Welch Fossum 2020). Auf eine ausreichende mechanische Unterstützung des Defekts durch das verwendete Material muss ebenfalls geachtet werden (Welch Fossum 2020).

Um das Knocheneinwachsverhalten in der Verwendung von synthetisch hergestellten Knochenersatzstoffen und um die Degradation im Falle der Verwendung von resorbierbaren Materialien weiter zu verbessern, ist man dazu übergegangen, Knochenersatzstoffe mit interkonnektierenden Poren zu produzieren. Diese sogenannten Scaffolds fungieren als Gerüst, die biologische Substanzen aufnehmen und mit Zellen besiedelt werden können (Baino et al. 2015). Die Eigenschaften, die ein Scaffold im Einsatz in der Knochenregeneration aufweisen sollte, beinhalten Biokompatibilität und Osteokonduktivität. Weiterhin sollte ein Scaffold auch eine Osteoinduktivität, Permeabilität, standardisierte Herstellbarkeit und mechanische Integrität aufweisen (Johnson & Herschler 2011). Die interkonnektierenden Poren sollen ein Einwachsen von Zellen und die Nährstoffversorgung dieser ermöglichen. Trotz Poren muss weiterhin auch hierbei die gewünschte mechanische Stabilität des Scaffolds realisiert werden (Hollister 2005).

2.3. Reaktion des Knochens auf ein Knochenersatzmaterial

Bei der Versorgung eines Knochendefektes stellt jeder eingesetzte Typus immer einen Fremdkörper für den Organismus dar. Sobald es sich hierbei um ein resorbierbares Knochenersatzmaterial handelt, müssen die freiwerdenden Abbauprodukte ebenfalls als Fremdkörper betrachtet werden (Anderson et al. 2008).

Nach Implantation eines Knochenersatzmaterials in einen Knochen lagert sich in den ersten Nanosekunden Gewebsflüssigkeit um das Material an. Anschließend erfolgt in den nächsten

Sekunden bis Stunden eine Adhäsion von Proteinen an die Materialoberfläche, sodass diese eine Proteinhülle bilden. Diese Adhäsion entspricht der provisorischen Matrixbildung (Hench & Wilson 1993, Anderson et al. 2008). Nach der Phase der provisorischen Matrixbildung folgt die Phase der Entzündung (Anderson et al. 2008). Eine geringgradige entzündliche Reaktion tritt immer auf und wird als physiologisch eingestuft. Dabei erreichen Zellen (Granulozyten, Makrophagen, Monozyten und später zusätzlich Fremdkörperriesenzellen) wenige Minuten bis Tage nach erfolgter Operation diese gebildete Proteinhülle. Diese Zellen wurden entweder über das Blut zum verwendeten Material transportiert oder stammen aus der näheren Umgebung und interagieren mit der Materialoberfläche (Hench & Wilson 1993). In der darauffolgenden Phase, welche Stunden bis Tage nach der Operation auftritt, kommt es zur Migration undifferenzierter bzw. teildifferenzierter mesenchymaler Zellen in den Implantationsbereich. Diese mesenchymalen Zellen differenzieren sich anschließend zu Osteoblasten und haften sich an das eingesetzte Material an. Werden poröse Materialien verwendet, können die mesenchymalen Zellen sowie Osteoblasten in den Knochenersatzstoff eindringen. Die Osteoblasten produzieren sodann das Osteoid, welches anschließend mineralisiert. Bei resorbierbaren Knochenersatzstoffen wird eine vollständige Resorption des Materials und dessen Ersatz durch neuen Knochen als abgeschlossene Heilung angesehen. Im Gegensatz dazu wird die Einheilung nicht resorbierbarer Knochenersatzstoffe durch eine vollendete Mineralisierung des Osteoids charakterisiert. Hierbei sollte der Prozess in einen stabilen Material-Knochen-Verbund münden (Davies 2003, Roach et al. 2007, Anderson et al. 2008).

2.4. Nicht resorbierbare Knochenersatzstoffe

2.4.1. Titanscaffolds

Scaffolds aus Titanium können als Knochenersatzmaterial im Bereich von Umstellungsosteotomien sowie als Wirbelkörperersatz fungieren (Robertson et al. 1976). Erfolgreiche werkstoffwissenschaftliche Arbeiten sind seit Anfang der 2000er Jahre bekannt (Ryan et al. 2006). Aufgrund der porösen Struktur kommt es zu einer verringerten Steifigkeit des Materials im Vergleich zu Vollkörpern (Anpassung des E-Moduls) (Robertson et al. 1976). Jedoch ist die Steifigkeit von Titan im Hinblick auf dessen Einsatz als Knochenersatzmaterial trotz der Verwendung einer porösen Form immer noch höher als für diese Anwendung erforderlich. Dies kann zu einer Knochenresorption und Lockerung des eingesetzten Materials führen (Bobyne et al. 1992, Dunand 2004).

Nicht resorbierbare Knochenersatzmaterialien aus Titanium sind lasttragend und weisen eine gute Biokompatibilität auf (Keegan et al. 2007). Letzteres wird jedoch vermehrt in Frage

gestellt, da obwohl dieses Material nicht korrodiert, es Präzipitationen abgibt. So wurde gezeigt, dass Titanpartikel einen negativen Einfluss auf die Differenzierung mesenchymaler Stammzellen zu Osteoblasten haben (Wang et al. 2002). Außerdem wird ein Zusammenhang zwischen Titanium und einer möglichen Metallsensitivität und dem Auftreten allergischer Reaktionen diskutiert (Thomas et al. 2011).

2.5. Resorbierbare Knochenersatzstoffe

2.5.1. Natürliche Knochenersatzstoffe

2.5.1.1. Autogene Transplantate

Autogene Transplantate sind der Goldstandard unter allen Knochentransplantaten. Mit diesen werden alle Transplantatmaterialien verglichen, da sie nicht immunogen sind und optimale osteogene, osteokonduktive sowie osteoinduktive Eigenschaften aufweisen. Sie werden empfohlen, wenn eine schnelle Knochenbildung gewünscht wird und wenn von einer suboptimalen Heilung ausgegangen wird. Darunter zählen beispielsweise kortikale Defekte nach Fraktur Reparaturen, verzögerte Frakturheilungen, Frakturen bei älteren Tieren, Osteotomien, Arthrodesen, Nonunionen oder zystische Defekte. Zur Förderung der Knochenbildung bei infizierten Frakturen finden autogene Transplantate ebenfalls Anwendung. Der Nachteil dieser Transplantate liegt in der verlängerten Operationszeit zur Gewinnung des Transplantates, dem Morbiditätsrisiko der Spenderstelle und der begrenzten Verfügbarkeit. Zur Gewinnung von Spongiosatransplantaten kann die Metaphyse eines jeden langen Röhrenknochens verwendet werden, wobei proximaler Humerus, proximale Tibia, distales Femur und Iliumflügel am häufigsten verwendet werden, da sie große Mengen an Spongiosa bereitstellen und gut zugänglich sind. Autogene Kortikalistransplantate werden an Stellen entnommen, an denen es zu keiner Funktionsbeeinträchtigung aufgrund der Entnahme kommt. Als Beispiele lassen sich hier Darmbeinflügel, Rippen, Fibula und distale Ulna nennen (Welch Fossum 2020). Die häufigste autogene Kortikalistransplantation ist die Versorgung von Mandibulafrakturen mit Hilfe von Rippen in der Humanmedizin (Goh et al. 2008).

2.5.1.2. Allogene Transplantate

Im Handel existieren kommerzielle allogene Spongiosatransplantate in Form von gefrorenen Chips oder Chips gemischt mit demineralisiertem Knochenpulver. Weiterhin sind außerdem gefrorene Kortikalistransplantate erhältlich. Durch die vorgefertigten Allotransplantate ergibt sich eine kürzere Operationsdauer. Weiterhin ist das Transplantat in unbegrenzter Menge verfügbar. Nachteilig sind die Kosten des Transplantates und das Fehlen der osteogenetischen

Eigenschaften. Um große Defekte zu füllen, können spongiöse Allotransplantate mit autogener Spongiosa gemischt werden. Um die osteogenetischen Eigenschaften zu verbessern, können sie mit autologem Knochenmark vermischt werden. Zwar kommt es in der Verwendung von allogenen Transplantaten zu einer langsameren Knochenbildung als bei Autotransplantaten, jedoch besteht kein Unterschied im langfristigen Ergebnis. Allogene Kortikalistransplantate werden häufiger für die Extremitätenerhaltung als für die Versorgung von Frakturen verwendet (Welch Fossum 2020).

Ein erheblicher Nachteil von allogenen Transplantaten liegt zum einen in der Gefahr von Infektionsübertragungen, zum anderen in der vorhandenen Antigenität des verwendeten Materiales, sodass eine entsprechende Abstoßungsreaktion nur durch eine Immunsuppression verhindert werden kann (Burchardt et al. 1977, Tomford 1981, Lord et al. 1988).

2.5.1.3. Xenogene Transplantate

Eine xenogene Knochen transplantation bedeutet das Einsetzen von Knochen einer fremden Spezies. Der Vorteil dieses Verfahrens liegt in der großen Verfügbarkeit an Knochenmaterial. Es besteht jedoch ein hohes Risiko der Übertragung von Krankheitserregern und eine hohe Gefahr an Unverträglichkeitsreaktionen (Oryan et al. 2014).

Aufgrund ihrer erheblichen Antigenität und großen Infektionsgefahr finden xenogene Knochen transplantate heutzutage noch keine Anwendung in der klinischen Praxis (Kingma 1960, Campana et al. 2014).

2.5.2. synthetische Knochenersatzstoffe

2.5.2.1. Keramiken

Keramiken stellen synthetische Kombinationen von Kalziumphosphaten dar, prinzipiell Hydroxylapatit und/oder Trikalziumphosphat. Sie stellen ein biokompatibles Gerüst für eine Knochenbildung bereit. Hydroxylapatit wird langsamer resorbiert als Trikalziumphosphat. Um die Funktion und die Resorptionsrate zu verbessern, können Porosität, Porengröße und Partikelgröße verändert werden. Keramische Materialien mit hoher Dichte zeigen zwar einen langsameren Abbau als Keramiken mit niedriger Dichte, bieten aber eine bessere mechanische Festigkeit. Es gibt Kalziumphosphatkeramiken in Pasten- und Blockform (Welch Fossum 2020).

Der Nachteil bei der Verwendung von Keramiken liegt in der geringen mechanischen Stabilität, der geringen Flexibilität und in den spröden Eigenschaften dieser (Salgado et al. 2004, Oryan et al. 2014).

2.5.2.2. Bioresorbierbare Polymere

Polymere sind lange Makromoleküle aus einer oder mehrerer sich wiederholender Moleküleinheiten, die kovalent verbunden sind. Es gibt natürliche (organische) und synthetische Polymere. Sie können allein als osteokonduktives Gerüst verwendet werden sowie auch in Kombination mit osteogenen und osteoinduktiven Materialien (Welch Fossum 2020).

Die Struktur der Polymere kann durch chemische und physikalische Prozesse so verändert werden, dass sich die Resorptionsrate individuell einstellen lässt (Gleeson & O'Brien 2011).

Zu den gängigsten Vertretern biosresorbierbarer Polymere gehören Polyglykolid (PGA), Polylactid (PLA) und deren Kopolymere (Van Der Elst et al. 2000).

Die Abbauprodukte von Polymeren (Oligomere und Monomere) rufen im Körper häufig unerwünschte, teils auch toxische Reaktionen hervor (Böstman & Pihlajamäki 2000). Polymere werden oft nicht vollständig abgebaut und es verbleiben Mikrokristallite zurück, die Entzündungsherde im Körper auslösen (Santavirta et al. 1990). Als Abbauprodukte fallen Säuren an, die den pH-Wert in der Umgebung senken und so ebenfalls Entzündungs- und Fremdkörperreaktionen auslösen und die Heilung behindern (Santavirta et al. 1990).

2.5.2.3. Eisenscaffolds

Eisen ist das zweithäufigste vorkommende metallische Element in der Erdkruste. Es ist ein essentielles Element für die meisten Organismen aufgrund deren zahlreichen eisenhaltigen Enzyme und Proteine. Eisen spielt eine signifikante Rolle im menschlichen Körper, insbesondere hinsichtlich des Transportes und der Speicherung von Sauerstoff sowie in der Reduktion von Ribonukleotiden (Fontecave & Pierre 1993). Im Falle der Verwendung von reinem Eisen als Knochenersatzmaterial weist es eine sehr langsame Degradationsgeschwindigkeit auf. Dies verursacht zusammen mit den ferromagnetischen Eigenschaften dieses Biomaterials Probleme (Purnama et al. 2010). Jedoch können durch die Verwendung von Eisen-Legierungen schnellere Degradationsraten erreicht werden sowie auch ein antiferromagnetischer Zustand (Hermawan et al. 2008). Im Bereich der Kardiologie wurden Scaffolds aus Eisen zur Behandlung atherosklerotischer Koronararterien *in vivo* untersucht. Hierbei kam es zu keinen thromboembolischen Komplikationen bzw. inflammatorischen Reaktionen (Peuster et al. 2001). Auch in anderen Studien bewährten sich eisenbasierte Gefäß-

Stents (Peuster et al. 2006, Mueller et al. 2012). Hinsichtlich ossärer Anwendungen werden eisenbasierte offenporige Legierungen ebenso als geeignet eingestuft (Yusop et al. 2012). Sie haben gegenüber Knochenersatzstoffen auf Mg-Basis den Vorteil, dass es während der Degradation zu keiner Gasentwicklung kommt (Zhang et al. 2010, Vojtěch et al. 2014). Jedoch bleibt das Hauptproblem in der Verwendung von eisenbasierten Knochenersatzstoffen in den zu geringen Degradationsraten *in vivo* bestehen. Daher wird aktuell intensiv nach Möglichkeiten geforscht, die Degradationsgeschwindigkeit zu beschleunigen (Vojtěch et al. 2014, Wegener et al. 2020).

2.5.3. Magnesium und seine Legierungen

2.5.3.1. Geschichte von Magnesium und seinen Legierungen

Im Jahr 1900 wurde Mg das erste Mal als orthopädisches Material untersucht. Payr hatte die Idee, eine Mg-Platte in der Gelenkendoprothetik zur Wiedererlangung bzw. Erhaltung der Gelenkbewegung zu verwenden (Payr 1900). Diese Idee griff Lambotte auf und es folgte 1906 ein Versuch zur Reparatur von Knochenbrüchen. Hierbei wurde ein 17-Jähriger mit einer Mg-Platte und Eisenschrauben behandelt, der an einer komplizierten Pseudarthrose mit schwerer Fehlstellung des distalen Unterschenkeldrittels aufgrund einer zwei Monate alten Unterschenkelfraktur litt. Lambotte erkannte eine Gasansammlung in der subkutanen Umgebung in Nähe des implantierten Materiales und beschrieb zum ersten Mal die begleitende Korrosionsproblematik bei Mg (Lambotte 1909, Lambotte 1932). Verbrugge versuchte 1933 und McBride 1938 die Problematik der Gasentstehung mittels Mg-Aluminium- (Al) bzw. Mg-Al-Mangan-Legierungen positiv zu beeinflussen, jedoch zeigte sich auch hier eine zu hohe Resorptionsrate mit entsprechender Gasentwicklung (Verbrugge 1934, McBride 1938). 1940 berichtete Maier von der Verwendung von Mg-Pins zur Versorgung von zwei Humerusfrakturen beim Menschen, wobei die volle Funktionalität der Gliedmaßen wiedererlangt wurde. Basierend auf diesen Resultaten implantierte Maier Mg subperiostal in Kaninchentibiae und erkannte neben der Korrosion des Mg und der Bildung von Gasansammlungen auch eine extensive Bildung periostalen Knochengewebes (Maier 1940).

2.5.3.2. Magnesium und seine Legierungen als Festkörper

In den vergangenen Jahren fiel das Augenmerk der Forschung wieder vermehrt auf Mg und seine Legierungen. Sie gelten als eine neue Generation metallischer Biomaterialien aufgrund ihres Degradationsvermögens (Zhao et al. 2017). Mg-Legierungen werden heutzutage

vorrangig im Bereich der Kardiologie und Orthopädie erforscht (Heublein et al. 2003, Witte et al. 2007).

Mg und seine Legierungen zeichnen sich durch eine gute Biokompatibilität, eine geringe Dichte und einem Elastizitätsmodul nahe dem des natürlichen Knochens aus (Pawelec & Planell 2019). Diese Eigenschaften reduzieren den Stress-shielding Effekt, sodass das Risiko eines unbefriedigenden Heilungsergebnisses reduziert ist (Staiger et al. 2006). Mg zählt, wie auch Titan, zu den Leichtmetallen, sodass das Gewicht des eingesetzten Materials gering gehalten werden kann (Song & Atrens 1999). Weiterhin stimuliert es die Knochenneubildung durch freigesetzte Mg-Ionen (Staiger et al. 2006).

Ein negativer Aspekt von Mg ist die Produktion von Wasserstoffgas während der Degradation, und zwar unter folgender Redoxreaktion: $\text{Mg} + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{Mg}(\text{OH})_2 + \text{H}_2$

Diese Formel zeigt auf, dass die Menge an abgebautem Mg der Menge an produziertem Gas entspricht (Wu et al. 2019). Um die Korrosionsrate und die damit zusammenhängende Gasbildung zu reduzieren, gelten Beschichten und Zulegieren als Hauptstrategien zur Modifizierung der mechanischen Eigenschaften und der Degradation von Mg. Das Ziel besteht darin, ein zeitlich komplementäres Verhältnis zwischen Knochenregeneration und Degradation des implantierten Materiales zu erreichen (Wang et al. 2012, Zheng et al. 2014).

So zeigt sich das Zulegieren als eine wichtige und effektive Methode bei Vollkörpern auf Mg-Basis zur Verbesserung der Korrosionsbeständigkeit und der mechanischen Eigenschaften (Staiger et al. 2006). Bei der Verwendung von Mg-Legierungen muss davon ausgegangen werden, dass das Material in der Lage ist, einen Knochendefekt drei Monate *post operationem* zu stabilisieren (Staiger et al. 2006). Mit Hilfe der Legierung AZ91 konnte eine ein Million Mal geringere Korrosion im Vergleich zu reinem Mg beobachtet werden (Song & Song 2007). Weiterhin wurden geringere Gasansammlungen und eine langsamere und homogenere Degradation mit den Legierungen und LAE442 im Vergleich zu den Legierungen AZ31 und AZ91 beschrieben (Witte et al. 2005). Im Vergleich zwischen LAE442 und MgCa_{0,8} zeigte letztere ein stärkeres Knochenremodelling, jedoch eine unruhigere Knochenstruktur (Thomann et al. 2009). Bei der Legierung LACer442 wurde die Seltene Erden-Mischung von LAE442 durch Cerium ersetzt. Zwar weist diese Legierung eine sehr ähnliche Zusammensetzung wie LAE442 auf, jedoch wurde sie in einer *In-vivo*-Studie als nicht biokompatibel eingestuft, da das verwendete Cerium zytotoxisch wirkte (Reifenrath et al. 2010). LANd442 wurde ebenfalls als Abwandlung der Mg-Legierung LAE442 untersucht und enthält statt der Mischung seltener

Erden nur Neodym. Es zeigte jedoch eine höhere und inhomogenere Korrosion im Vergleich zu LAE442 (Ullmann et al. 2011). Es wurde weiter von einer korrosionshemmenden Wirkung bei folgenden Legierungspartnern berichtet: Al, Kalzium, Mangan, Natrium, Silikon, Zink, Blei, Thorium, Zirconium, Beryllium, Yttrium und Praseodym (Kaese 2002, Shaw 2003). Laut Song (2007) eignen sich vor allem folgende Legierungselemente, da sie gut vom Körper toleriert werden und die Degradation abmildern: Zink, Kalzium, Mangan und kleine Mengen an gering toxischen seltenen Erden (Song 2007).

Um die Korrosionsbeständigkeit weiter zu verbessern, können Mg-Legierungen beschichtet werden (Wang et al. 2019). Hierbei wurde eine CaP-Beschichtung, die eine ähnliche chemische Komponente wie der mineralische Anteil von Säugetierknochen zeigt, häufig verwendet und zeichnete sich durch eine exzellente Biokompatibilität aus (Song et al. 2010, Waterman et al. 2011, Waterman et al. 2012, Dorozhkin 2014, Hiromoto et al. 2015). Auch eine Oxidbeschichtung stellt eine gute Möglichkeit dar, um die Korrosionsbeständigkeit zu erhöhen. Diese Oxidschicht entsteht durch die micro-arc Oxidation (MAO), weist eine hohe Bindungsstärke an Mg und seinen Legierungen auf und besteht hauptsächlich aus Mg-Oxid (Fischerbauer et al. 2013, Dorozhkin 2014). Darüber hinaus wird eine Beschichtung mittels Fluoridbehandlung auch häufig verwendet (Witte et al. 2010, Hornberger et al. 2012, Zheng et al. 2014). Auch eine Beschichtung mittels biodegradierbarer Polymere findet Anwendung. So wurden beispielsweise Poly(lactid-co-glycolid) (PLGA), Polycaprolacton (PCL) und Chitosan für die Beschichtung von Mg-Legierungen untersucht (Gu et al. 2009, Wong et al. 2010, Chen et al. 2011, Xu & Yamamoto 2012, Wu et al. 2013).

2.5.3.3. Magnesium und seine Legierungen als Scaffold

Im Rahmen von Knochenersatzstoffen auf Mg-Basis als schwammartige Körper untersuchten unter anderem Witte et al. (2006) offene AZ91-Zylinder als subchondralen Knochenersatz, wobei jedoch eine zu starke Degradation evaluiert wurde, sodass die Autoren auf die Notwendigkeit einer Beschichtung hinwiesen (Witte et al. 2006). Lalk et al. (2013) untersuchten zylindrische Schwämme der Mg-Legierung AX30 mit einer einfachen MgF_2 -sowie einer zusätzlichen CaP-Beschichtung und erkannten, dass die Degradationsgeschwindigkeit ebenfalls zu hoch war (Lalk et al. 2013). Zhang et al. (2018) untersuchten Scaffolds aus einer Mg-Legierung mit Zink, Calcium und seltenen Erden, welche mit morseliertem Knochen gefüllt wurden. Diese wurden in 15 mm große Ulnaosteotomien im Kaninchenmodell untersucht. In der Verwendung dieser Legierung entstanden subkutane Gasblasen, welche mehrfach abpunktiert werden mussten (Zhang et al. 2018). Dagegen wurden

in der Verwendung von zylindrischen LAE442 Scaffolds mit interkonnektierenden Poren *in vivo* vielversprechende Ergebnisse und vor allem eine sehr langsame und homogene Degradation der Scaffolds evaluiert (Kleer et al. 2019, Augustin et al. 2020, Witting et al. 2020, Kleer-Reiter et al. 2021).

3. Methoden zur Untersuchung von Knochenersatzstoffen

3.1. Histologische Untersuchung

Durch die Histologie ist es möglich, Gewebeschnitte qualitativ auf Zellniveau zu evaluieren. Die Einbettung von unentkalkten Knochenproben in Methacrylat stellt hierbei eine gängige Methode dar (Romeis 1989, Wolf et al. 1992, Lang 2012).

Die Trenn-Dünnschliff-Methode nach Donath ermöglicht die Herstellung von bis zu 10 µm dünnen Schliffen unentkalkter Knochenproben. Sie wird routinemäßig zur Bearbeitung von nicht in Paraffin eingebetteten Gewebeproben eingesetzt. Die Proben werden in gepufferter 4 % Formalinlösung fixiert, per aufsteigender Alkoholreihe dehydriert und anschließend mit Technovit 9100 infiltriert und eingebettet (Donath & Breuner 1982).

Durch das Färben der histologischen Schliffe zeigt die Probe verschiedene Kontraste, wodurch bestimmte Strukturen hervorgehoben werden. Toluidinblau ist eine dunkelblaue Färbung, welche sich durch eine gute Zellkernfärbung auszeichnet. Es ist ein basischer Farbstoff und ermöglicht die Differenzierung von Zellen und Geweben mit Hilfe seiner Metachromasie. Die Metachromasie ist auf das Vorkommen dicht benachbarter und in einer großen Anzahl vorliegender saurer Gruppen in organischen Molekülen zurückzuführen. So können basophile Zellbestandteile gut dargestellt werden (Lang 2012, Sinowatz & Rodler 2017, Welsch & Kummer 2018).

Histologische Analysen finden im Bereich der operativen Versorgung von Knochendefekten in der qualitativen Beurteilung von Knochenregeneration, Osseointegration und Spaltüberbrückung zwischen eingesetztem Material und Knochen Anwendung (Anderson et al. 1997, Sachse et al. 2005). Sie werden zur Überprüfung der Biokompatibilität eines Knochenersatzstoffes angewandt (An & Martin 2003). Durch deskriptive Histologie werden interessante Gewebsstrukturen, so vor allem Zellen, Veränderungen des implantierten Materiales und das Material-Gewebe-Interface bewertet (An & Martin 2003). Zur semiquantitativen Auswertung werden meist Scoringsysteme angewandt (An & Martin 2003).

Der Nachteil histologischer Analysen liegt darin, dass es sich zum einen um eine zweidimensionale Methode handelt und dass diese nur *post mortem* durchgeführt werden kann. Auch die Anzahl an Schnitten pro Probe ist limitiert (Van Oosterwyck et al. 2000).

3.2. Histomorphometrie

Die Histomorphometrie ist ein Verfahren zur quantitativen Analyse der mikroskopischen Struktur von Zellen und Geweben (Yeom et al. 2008, Kulak & Dempster 2010). Die Messungen erfolgen in der Regel anhand von zweidimensionalen histologischen Schnitten, wobei Flächen- und Längenmessungen, Abstände zwischen zwei Punkten und Anzahl bestimmter Komponenten morphometrisch gemessen werden können (Bartels 2011). Hinsichtlich eines Knochenersatzstoffes mit umgebendem Knochengewebe können so die Knochen- und Osteoidoberfläche, der Knochen-Material-Abstand, der Resorptionsgrad und die Anzahl von Entzündungszellen bemessen werden (Parfitt et al. 1987). Die verschiedenen Parameter werden dabei mittels einer Analysesoftware, die auf maschinellem Lernen basiert, erhoben (Kulak & Dempster 2010).

3.3. Rasterelektronenmikroskop und energiedispersive Röntgenspektroskopie

Bei der Verwendung eines Rasterelektronenmikroskops (REM) wird ein Präparat mit einem gebündelten Elektronenstrahl zeilenförmig abgerastert. Durch Rückstreuelektronen (Sekundärelektronen) entsteht das Bild. Eine Szintillatorscheibe fungiert als Detektor. Die Lichtsignale dieser Scheibe werden mit Hilfe eines Fotomultipliers verstärkt und in elektrische Signale zurück verwandelt. Das Bild im REM, welches auf dem Leuchtschirm betrachtet wird, entsteht im Anschluss durch das Zahlenraster (Welsch & Kummer 2018). Im REM werden natürliche sowie auch künstliche Objektoberflächen betrachtet, wie beispielsweise Epithelien, Zellen, extrazelluläre Fasern, Hartsubstanzen, Organe und auch ganze Tiere (Welsch & Kummer 2018). Darüber hinaus bietet es die Möglichkeit zur Analyse ultrastruktureller Verhältnisse zwischen implantiertem Knochenersatzmaterial und Knochen (An & Martin 2003).

Eine wichtige Anwendung des REM besteht in der Elementbestimmung. Mittels energiedispersiver Röntgenspektroskopie bzw. Energy dispersive X-ray (EDX) wird die Elementzusammensetzung einer Probe durch die von ihr emittierten Röntgenstrahlen bestimmt. Dazu werden die Atome der Probe durch einen Elektronenbeschuss angeregt und senden folgend Röntgenstrahlen mit einer elementspezifischen Energie aus. So können verschiedene Stellen einer histologischen Probe hinsichtlich ihrer dortigen Elementzusammensetzung untersucht werden. In der Forschung mit Biomaterialien aus Mg können so zum Beispiel mit

Hilfe der EDX-Analysen die Degradationsschichten untersucht werden (Witte et al. 2004, Xu et al. 2008).

3.4. Mikrocomputertomographie

Die Mikrocomputertomographie (μ CT) stellt eine hochauflösende Computertomographie dar, welche für die Untersuchung der Knochenmorphologie bei Versuchstieren gut geeignet ist (Bouxsein et al. 2010). Das μ CT ist eine Weiterentwicklung des konventionellen Computertomographen (CT) mit einer höheren Ortsauflösung. Es wurde 1989 von Feldkamp entwickelt in Folge seines 1984 publizierten Kegelstrahlalgorithmus (Feldkamp et al. 1984, Feldkamp et al. 1989). Im Vergleich zum klinisch genutzten Computertomographen können im μ CT Auflösungen bis in den Submikrometer-Bereich erzeugt werden (Ritman 2011). Die Messung mittels μ CT ist ein nicht destruktives und dreidimensionales Analyseverfahren, welches im Bereich der Osteologie gut etabliert ist (Lowet 1997, Van Oosterwyck et al. 2000). Sie ist für die räumliche Darstellung der Knochenneubildung an Materialoberflächen und des umgebenden Bereiches bestens geeignet (Bernhardt et al. 2004). Die untersuchten Proben liegen nach erfolgtem Scanvorgang unverändert vor und stehen so für weitere Auswertungsmethoden zur Verfügung (Rüegsegger et al. 1996). Das μ CT realisiert studienbegleitende Untersuchungen mit Verlaufskontrollen, sodass fortlaufend Scans während eines *In-vivo*-Beobachtungszeitraumes generiert werden können. Das μ CT ermöglicht somit schnelle detaillierte Erkenntnisse unter der Senkung der Versuchstieranzahl (David et al. 2003, Klinck et al. 2008). So wurde in diversen Studien die Degradation und Osseointegration verschiedener Mg-basierender Biomaterialien mittels μ CT-Analysen untersucht (Thomann et al. 2009, Hampp et al. 2013, Kleer et al. 2019, Augustin et al. 2020). Das μ CT bietet außerdem die Möglichkeit, die Korrosionsrate der verwendeten Mg-Legierung über den Volumenverlust zu bestimmen (Kraus et al. 2012, Sanchez et al. 2015).

III. PUBLIKATION

Die nachfolgende Publikation wurde am 22. Juli 2022 im Journal of Applied Biomaterials & Functional Materials eingereicht und am 09. November 2022 zur Veröffentlichung angenommen:

***In vivo* investigation of open-pored magnesium scaffold LAE442 with different coatings in an open wedge defect**

M. Schmidt, A.-C. Waselau, F. Feichtner, S. Julmi, C. Klose, H.J. Maier, P. Wriggers, A. Meyer-Lindenberg

DOI:10.1177/22808000221142679



Original Research Article

JABFM | Journal of Applied
Biomaterials &
Functional
Materials

In vivo investigation of open-pored magnesium scaffolds LAE442 with different coatings in an open wedge defect

 Journal of Applied Biomaterials &
Functional Materials
1–19
© The Author(s) 2022
Article reuse guidelines:
sagepub.com/journals-permissions
DOI: 10.1177/22808000221142679
journals.sagepub.com/home/jbf
SAGE

Marlene Schmidt¹ , Anja-Christina Waselau¹, Franziska Feichtner¹ , Stefan Julmi², Christian Klose², Hans Jürgen Maier², Peter Wriggers³ and Andrea Meyer-Lindenberg¹

Abstract

The magnesium alloy LAE442 showed promising results as a bone substitute in numerous studies in non-weight bearing bone defects. This study aimed to investigate the in vivo behavior of wedge-shaped open-pored LAE442 scaffolds modified with two different coatings (magnesium fluoride (MgF₂, group 1)) or magnesium fluoride/calcium phosphate (MgF₂/CaP, group 2)) in a partial weight-bearing rabbit tibia defect model. The implantation of the scaffolds was performed as an open wedge corrective osteotomy in the tibia of 40 rabbits and followed for observation periods of 6, 12, 24, and 36 weeks. Radiological and microcomputed tomographic examinations were performed in vivo. X-ray microscopic, histological, histomorphometric, and SEM/EDS analyses were performed at the end of each time period. μ CT measurements and X-ray microscopy showed a slight decrease in volume and density of the scaffolds of both coatings. Histologically, endosteal and periosteal callus formation with good bridging and stabilization of the osteotomy gap and ingrowth of bone into the scaffold was seen. The MgF₂ coating favored better bridging of the osteotomy gap and more bone-scaffold contacts, especially at later examination time points. Overall, the scaffolds of both coatings met the requirement to withstand the loads after an open wedge corrective osteotomy of the proximal rabbit tibia. However, in addition to the inhomogeneous degradation behavior of individual scaffolds, an accumulation of gas appeared, so the scaffold material should be revised again regarding size dimension and composition.

Keywords

Magnesium alloy, porous scaffold, biodegradation, coating, osseointegration

Date received: 22 July 2022; revised: 1 November 2022; accepted: 9 November 2022

Introduction

Autografts are considered the gold standard for the treatment of bone defects due to their good biocompatibility.^{1,2} However, associated problems include limited availability of donor bone, morbidity at the donor site, and possible inadequate integration into the bone defect with subsequent prolonged hospitalization of patients.^{2–6}

Other bone substitutes such as ceramics in the form of hydroxyapatite and tricalcium phosphate, as well as polymers, showed insufficient stability or biocompatibility in the treatment of large bone defects.^{7–11} For degradable

¹Clinic of Small Animal Surgery and Reproduction, Ludwig-Maximilians-University Munich, Munich, Germany

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

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

Corresponding author:

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



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

orthopedic implants, attention was focused on magnesium and its alloys, which showed promising results as solid implants.^{12–17} For instance, screws made of magnesium alloys are used in hallux valgus operations in human medicine.¹⁸ In initial studies, various Mg alloys were also investigated as bone replacement material in the form of open-pored cylinders with promising results in the rabbit model.^{19–23} Several studies have demonstrated that the magnesium ions released during degradation have the advantage of osteogenic and bactericidal effects.^{24–28}

The disadvantage of using Mg-based implants and bone substitutes is the formation of hydrogen gas during the degradation process depending on the alloying components.^{29–31} Controlling the rate of degradation is challenging.²⁹ To decrease the degradation rate of Mg-implants and thereby reduce hydrogen production, different Mg-alloys have been developed and investigated in animal experiments.^{30,32–34} The magnesium alloy LAE442 (4 wt.% lithium, 4 wt.% aluminum, 2 wt.% rare earths) was found to be promising and was intensively investigated as a solid body.^{30,34,35} Porous cylinders of this alloy have also been investigated as bone substitutes in non-weight bearing cancellous bone defects and showed good biocompatibility with slow homogeneous degradation and promising osseointegration.^{21–23}

To further increase corrosion resistance, both Mg solids and bone substitutes are additionally coated.^{36–38} MgF_2 has been reported in the literature to improve corrosion properties and has shown to be very biocompatible.^{21,22,27,39,40} The use of an additional calcium phosphate (CaP) coating on the MgF_2 layer even provided additional corrosion protection.^{19,37,41} It is further described that CaP improves the activity of osteoblasts and promotes bone growth.^{23,42,43} A CaP coating exhibits a similar chemical component to the mineral portion of mammalian bone and is characterized by excellent biocompatibility.^{44–46}

As the accessible literature currently lacks in vivo studies of porous LAE442 scaffolds as a bone graft substitute in partial weight-bearing bone defects, this topic was investigated in the present study. Previous in vitro studies have shown sufficient strength of the alloy for this application.^{37,47} In relation to this, specially designed wedges were investigated in the context of an open-wedge corrective osteotomy in the rabbit tibia.

Material and methods

Scaffold

A number of 40 wedge-shaped scaffolds (height=10 mm, width=14 mm, depth=4.8 mm, Figure 1) were fabricated from the magnesium alloy LAE442 (4 wt.% lithium, 4 wt.% aluminum, 2 wt.% rare earths) by investment casting with an interconnecting pore size of 500 μm .³⁷ All scaffolds were coated with a magnesium fluoride coating (MgF_2) using the “conversion coating” method.³⁷ Half the

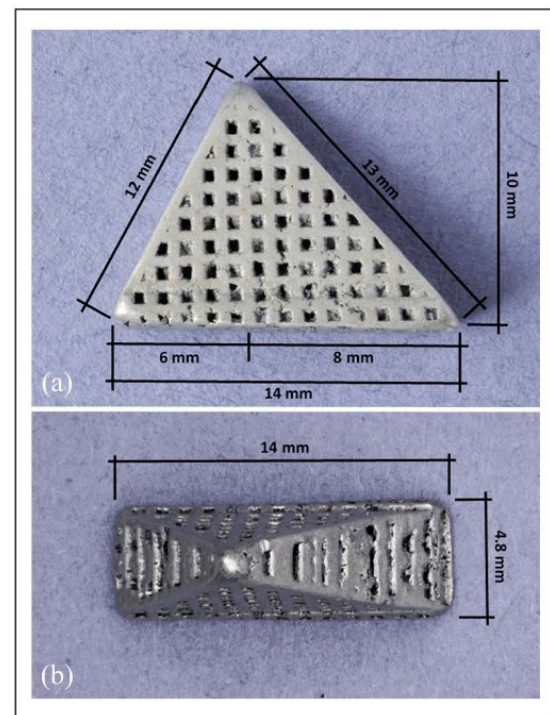


Figure 1. View of the open-pored scaffold (LAE442, CaP coated) with corresponding dimensions: (a) proximal view and (b) lateral view.

scaffolds received no further coating (group 1, $n=20$) and the other half of the scaffolds received a calcium phosphate coating directly onto the MgF_2 coating (CaP, group 2, $n=20$). The scaffolds were immersed into two solutions (first solution: phosphatic solution containing sodium dihydrogen phosphate dehydrate, pH 7.4; second solution: calcium nitrate tetrahydrate) in various circles. The coatings were produced according to the detailed description by Julmi et al.³⁷ With these manufacturing parameters, a reproducible layer thicknesses of approx. 1–2 μm is achieved on the surface of Mg implants, which has been shown, for example, in earlier work by Seitz et al.⁴⁸ As a conversion layer, the layer is largely homogeneous on the surface, but due to the chemical conversion process from $Mg(OH)_2$ to MgF_2 and especially due to the relatively high roughness of the cast implant surface, local variations of the layer thickness occur. The scaffolds were sterilized with gamma rays (>25 kGy, BBF Sterilisationsservice GmbH, Kernen, Germany) before implantation.¹⁹

Animal model

The animal experiment (approval number: ROB 55.2-2532.vet_02-18-125) was approved by the Government of Upper Bavaria according to paragraph 8 of the Animal Protection Act. A total of 40 female adult Zimmermann rabbits (ZiKa Rabbit, Asamhof Kissing, Germany) with a

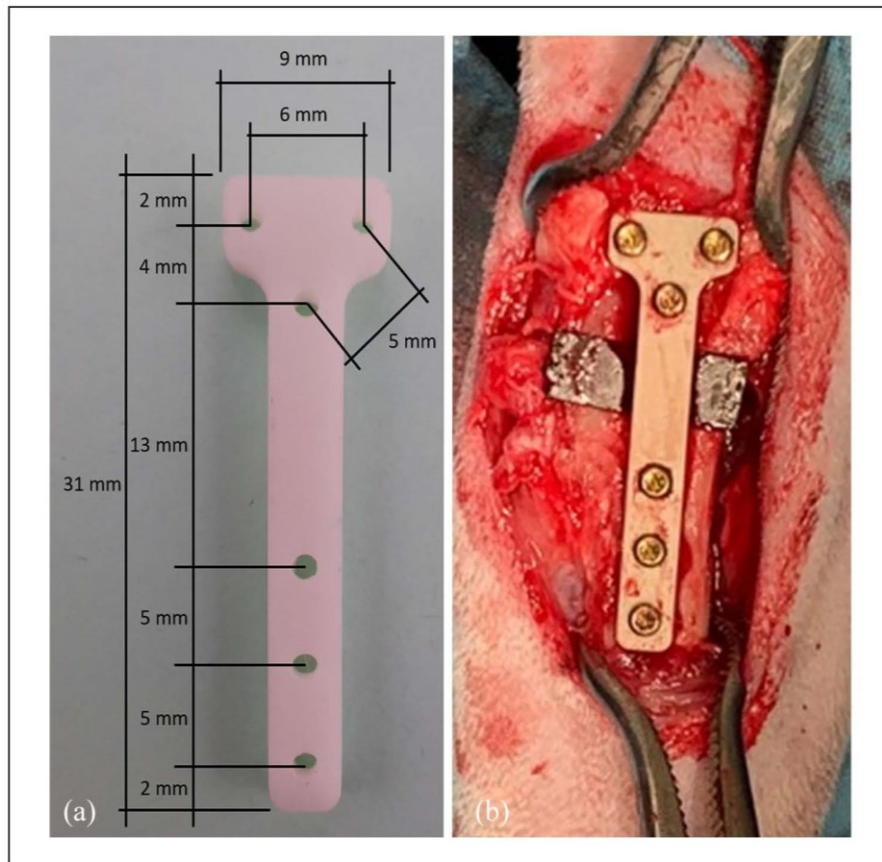


Figure 2. T-plate (PEEK (polyetheretherketone)): (a) with corresponding dimensions and (b) intraoperative view on the tibia with inserted scaffold, plate, and screws.

weight of 4.43 kg (± 0.29 kg) were used. The animals were randomly assigned to four time groups (6, 12, 24, and 36 weeks). Six animals were used in each group. To reduce the number of animals and to obtain an intermediate trend after 24 weeks, two animals per coating group were additionally implanted and evaluated for this time point.

Surgery and euthanasia

Preoperatively, the animals received enrofloxacin (10 mg/kg, Enrobactin[®], CP-Pharma GmbH, Burgdorf, Germany) as an antibiotic and meloxicam (0.3 mg/kg, Meloxicam, Rheumocam[®], Albrecht GmbH, Aulendorf, Germany) orally as pain prophylaxis. For induction of anesthesia, ketamine (15 mg/kg, Anesketin[®] 100 mg/ml, Albrecht GmbH, Aulendorf, Germany) and medetomidine (0.25 mg/kg, Dorbene vet[®] 1 mg/ml, Zoetis Deutschland GmbH, Berlin, Germany) were administered intramuscularly. Anesthesia was maintained after intubation with an isoflurane/oxygen mixture. The surgical field was circularly shorn from the greater trochanter ossis femoris to the distal tibia and aseptically prepared. Intraoperative analgesia was provided with

fentanyl infusion (3 μ g/kg, Fentadon[®], 50 μ g/ml, CP-Pharma Handelsgesellschaft GmbH, Burgdorf, Germany).²² The rabbits were placed in the lateral position on the operating table and the right leg was sterilely draped and positioned in slight flexion to allow medial access to the proximal tibia. An approximate 4 cm skin incision was made, and the transection of subcutaneous tissue and deep fascia was followed by exposure of the medial collateral ligament. Cranial and caudal muscles were held aside using Hohmann levers. Using an oscillating saw under sterile water cooling (Colibri II, DePuy Synthes[®], Synthes GmbH, Oberdorf, Switzerland), a wedge-shaped piece of bone corresponding to the size of the scaffold was sawn out distally of the medial collateral ligament with the aid of a template while preserving the fibula. While stabilizing the bone defect with reduction forceps, the scaffold was inserted with a precise fit. To hold the wedge in position and to support the tibia, it was then fixed with a custom-made T-plate (Figure 2(a)) made of non-absorbable plastic (9 mm \times 31 mm, PEEK (polyetheretherketone), RISystem AG, Landquart, Switzerland) and six titanium screws (three proximal, three distal) (Cortex Screw Stardrive \varnothing 1.5 mm, DePuy Synthes[®], Synthes GmbH, Oberdorf,

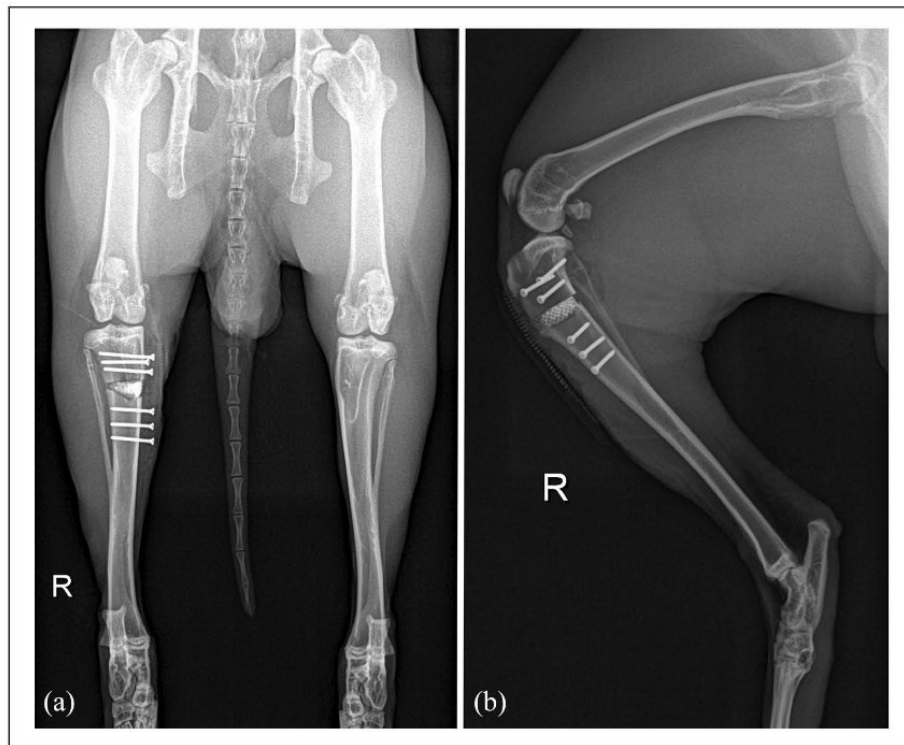


Figure 3. X-ray images in (a) craniocaudal and (b) mediolateral view post-op (the plate is generally not visible in radiodiagnostic images).

Switzerland) (Figure 2(b)). The fascia was then adapted with single staples and a continuous subcutaneous suture (Monosyn violet 4/0, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Germany). The skin was closed with single staples (Optilene blue 4/0, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Germany). Postoperative μ CT and X-ray images were taken to check the correct fit of the scaffold. As postoperative pain therapy, buprenorphine (20 μ g/kg, intravenously directly postoperatively, otherwise subcutaneously) (Bupresol[®], 0.3 mg/ml, CP-Pharma Handelsgesellschaft GmbH, Burgdorf, Germany) was given three times daily for 4 days and meloxicam daily until the fifth postoperative day. The animals were given daily antibiotic prophylaxis with enrofloxacin until the fifth postoperative day. Thereafter, the animals received metamizole (Novaminsulfon – 1A Pharma[®], 20 mg/kg, 1A Pharma GmbH, Oberhaching, Germany) and meloxicam two to three times daily if required. The animals wore a cervical collar for 10 days and received Bene-Bac (Bene-Bac[®] Gel, 0.5 g/animal/day, Dechra Veterinary Products Deutschland GmbH, Aulendorf, Germany) to support the digestive system during this time. Clinical and orthopedic evaluations of the animals were performed daily for 14 days post-op and at regular intervals thereafter. At the end of the observation period, the animals were euthanized painlessly using pentobarbital (Narkodorm[®] 200–800 mg/kg, CP-Pharma, Burgdorf, Germany). After harvesting the tibia including the fibula

and removing the soft tissue, the bone-implant samples were extracted using a diamond band saw (cut-grinder, Messner GmbH, Oststeinbek, Germany). The samples were cut proximal and distal to the adjacent screws. Samples were fixed in a 4% formalin solution for at least 5 days.

Radiological examination and evaluation

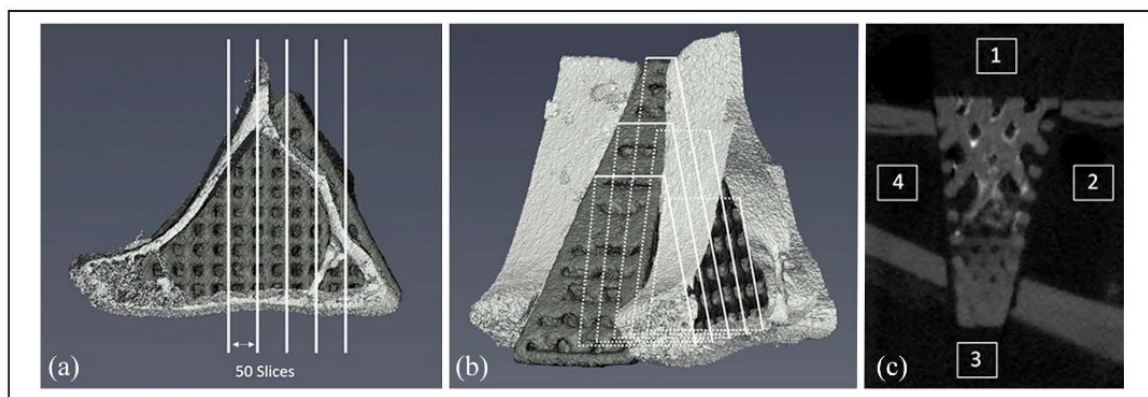
Radiographs of the hindlimbs (Multix Select DR, Siemens Healthcare GmbH, Erlangen, Germany) in craniocaudal (krkd) and mediolateral (ml) view were taken at 2-week intervals until week 12 and every 4 weeks thereafter (Figure 3) with the setting of 54.9 kV and 4.5 mAs. The evaluation was done using dicomPACS[®] software (version 8.3.20; Oehm und Rehbein GmbH, Rostock, Germany). The parameters for scaffold fit, screw position, scaffold degradation, callus formation at the osteotomy gap, gap between scaffold and bone, and gas inclusions in the vicinity of the scaffold were assessed descriptively.

In vivo μ CT examination and evaluation

In vivo μ CT scans (XtremeCT II, Scanco Medical, Zurich, Switzerland) were obtained under sedation (medetomidine 0.25 mg/kg and ketamine 15 mg/kg) according to the

Table 1. Scoring system for μ CT evaluation. Parameters were scored at each scan timepoint. The lowest value of 0 represents the desired result.

Scoring parameter	Score 0	1	2	3	4
Gas in the surrounding tissue	None	Diffuse ($\varnothing < 1$ mm)	Low grade ($\varnothing < 5$ mm)	Medium grade ($\varnothing: 5-10$ mm)	High grade ($\varnothing < 10$ mm)
Gas in the medullary cavity	None	Diffuse ($\varnothing < 1$ mm)	Low grade ($\varnothing < 2.5$ mm)	Medium grade ($\varnothing < 5$ mm)	High grade ($\varnothing > 5$ mm)
Osteotomy gap closed from the outside (covered with callus)	Complete bridging (100%)	>75% callus	>50% callus	>25% callus	No or minimal bridging via callus tissue
Scaffold integration (reoriented scan)	100% contact surface between bone and scaffold, no gaps	>75% contact area between bone and scaffold, only minimal gaps	>50% contact area between bone and scaffold, isolated gaps	>25% contact area between bone and scaffold, larger gaps	No or slight contact between bone and scaffold, clear gaps

**Figure 4.** (a and b) Illustration of the five standardized cross-sections of the scaffold in the reoriented scan and (c) central reoriented cross sections with directional positions: (1) medial, (2) proximal, (3) lateral, and (4) distal.

radiological examination interval. The scan area included the proximal tibia including the scaffold and the implant. The following settings were chosen: tube voltage 68 kV, current 1470 μ A, 1000 projections/180°, integration time 250 ms, and isotropic voxel size 30.3 μ m. The images were evaluated descriptively, semiquantitatively and quantitatively by two observers using the μ CT Evaluation Program V6.6 software (Scanco Medical, Zurich, Switzerland).

Descriptive and semiquantitative evaluation of the μ CT examination. Scaffold shape and scaffold degradation were descriptively evaluated in the original scan (transverse plane). The semiquantitative evaluation was performed by two observers using a scoring system (Table 1). Gas accumulation in surrounding tissues or in the medullary canal (which were measured with the ruler option of the evaluation software) and bridging of the osteotomy gap with callus were evaluated in the transverse plane. The scaffold scans were reoriented to evaluate scaffold integration (bone-scaffold contacts) using five standardized scaffold cross-sections in the sagittal plane (Table 1, Figure 4).

Quantitative evaluation of the μ CT examination. Scaffold degradation was analyzed quantitatively at each scan time point by calculating the volume and density of the scaffolds. A threshold of 146 was used for LAE442 according to the literature.^{21–23}

X-ray microscopy images

The scaffolds were scanned before implantation and after explantation using an X-ray microscope (Zeiss Xradia 410 Versa, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Germany). Pre-implantation scans were obtained with a pixel size of 10 μ m, a voltage of 60 kV, and an exposure time of 1.5 s. Explanted scaffold bone composites were scanned with a pixel size of 6 μ m, a voltage of 50 kV, and an exposure time of 2 s. The scans were generated using a flat panel and a power of 4 W. Using these high-resolution X-ray microscope scans, the volumes of all scaffolds were analyzed before implantation and at the end of each study period and compared with the data from μ CT. Volumes were calculated with the μ CT evaluation program V6.6 software (Scanco Medical, Zurich, Switzerland) by using a

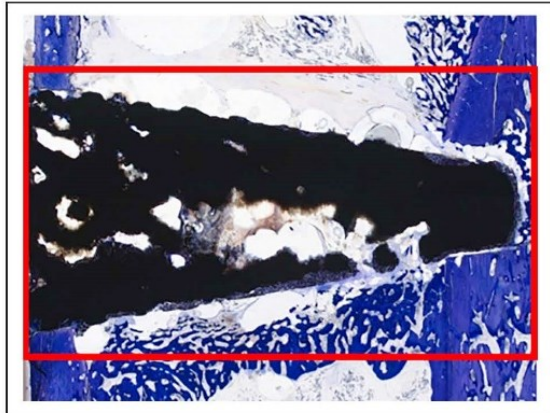


Figure 5. Central histological cross-section containing the measurement frame (2600 pixels \times 1450 pixels) for histomorphometric evaluation.

scan-specific threshold according to the half maximum height (HMH) protocol.⁴⁹

Histological examination and evaluation

After the formalin-fixed samples were scanned using the X-ray microscope, they were dehydrated in an ascending series of alcohol, defatted with xylene (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Germany) and embedded in Technovit 9100 (Technovit® 9100, Heraeus Kulzer GmbH, Wehrheim, Germany). 80 μ m histological sections as a longitudinal sections were produced using the cutting and grinding technique according to Donath and Breuner.⁵⁰ The sections were made using longitudinal cuts in the center of the plate in a mediolateral direction (Figure 5) with a diamond band saw and then ground down to the appropriate thickness (cut grinder and lap grinder, Messner GmbH, Oststeinbek, Germany). Histological sections were surface stained with 0.1% toluidine blue O (Waldeck, Münster, Germany). Two central sections from the wedge center with adjacent cortical bone and plate were evaluated descriptively, semiquantitatively and quantitatively using an optical microscope (Axio Imager.Z2, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Germany).

Descriptive and semiquantitative histological evaluation. In two sections per specimen, remodeling of the cortices, the amount of callus and gas bubbles (which were measured with the ruler option of the evaluation software), degradation of the scaffold and the bridging of the osteotomy gap were assessed using a semiquantitative scoring system by two observers at 2.5 \times magnification (Table 2). The presence of cartilaginous tissue, macrophages, foreign body giant cells, adipocytes, blood vessels, and newly formed tissue at the scaffold edge or in the pores, as well as changes in the scaffold, such as cracks, were descriptively assessed at 20 \times magnification.

Quantitative histological evaluation. As with the semiquantitative evaluation, two central sections of each sample were evaluated histomorphometrically. The sections were photographed as micrographs with a 2.5 \times magnification using the Zeiss AxioCam microscope camera (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Germany) and the Zeiss ZEN2 software (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Germany) and analyzed histomorphometrically using Zen Intellesis software. For automated segmentation, an AI (artificial intelligence) model based on machine learning was trained. All sections were segmented and evaluated identically. For this purpose, a measurement frame of 2600 pixels \times 1450 pixels was placed over the scaffold and adjacent structures (Figure 5). When placing the measuring frame, care was taken to include as few parts of the fixation plate as possible.

The percentage area of the following elements was calculated: scaffold, bone, gas, granulation tissue, osteoid, plate, bone marrow, and cartilage.

SEM/EDS analyses

Scanning electron microscope (SEM) images were taken of unstained histological sections prepared as described in 2.7 according to Maier et al.³⁶ to characterize the surfaces of the scaffolds. Energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDS) analyses were performed in selected areas to determine the composition of the elements. Images of the histological sections were recorded by SEM (SUPRA 55 VP; Carl Zeiss AG, Oberkochen, Germany) with X-ray spectroscopy (EDX) analysis at an acceleration voltage of 15 kV. One section of an intact scaffold was measured for each time and coating group. Furthermore, one section of a severely degraded scaffold per coating group of weeks 12, 24, and 36 was measured to identify the cause of the severe degradation. Measurements were taken in the scaffold center, in the degradation layer, in bone and within conspicuous bright areas of the scaffold.

Statistics

Statistical analyses were performed using “Microsoft Excel 2016” (Microsoft Corporation, Redmond, WA 98052–6399, USA) and “SPSS Statistics 26.0” (IBM, Armonk, NY 10540, USA). This analysis was based on the comparison of the two groups in relation to the study interval. The semiquantitative μ CT- and histology data were analyzed using the Mann-Whitney U test. Quantitative data (μ CT, histomorphometry, and X-ray microscopy) were tested for normal distribution using the Shapiro-Wilk test. For normally distributed data, Levene’s test was performed followed by Welch’s or Student’s t -test. For non-normally distributed data, the Mann-Whitney U test was used. In all tests, a value of $p < 0.01$ was considered statistically significant.

Table 2. Scoring system for histological evaluation. The parameters were scored using two cross-sections per scaffold. The lowest value of 0 represents the desired result.

Scoring parameter	Score 0	1	2	3	4
Gas in the surrounding tissue	None	Diffuse ($\varnothing < 1$ mm)	Low grade ($\varnothing < 5$ mm)	Medium grade (\varnothing : 5–10 mm)	High grade ($\varnothing < 10$ mm)
Gas in the medullary cavity	None	Diffuse ($\varnothing < 1$ mm)	Low grade ($\varnothing < 2.5$ mm)	Medium grade ($\varnothing < 5$ mm)	High grade ($\varnothing > 5$ mm)
Osteotomy gap closed from the outside (covered with callus)	Complete bridging (100%)	>75% callus	>50% callus	>25% callus	No or minimal bridging via callus tissue
Scaffold integration (reoriented scan)	100% contact surface between bone and scaffold, no gaps	>75% contact area between bone and scaffold, only minimal gaps	>50% contact area between bone and scaffold, isolated gaps	>25% contact area between bone and scaffold, larger gaps	No or slight contact between bone and scaffold, clear gaps

Table 3. Scaffolds with loss of shape, presented with corresponding time points for the different evaluation methods.

Group (material)	Macroscopic onset of severe degradation (in vivo μ CT)	Time group, severe degradation in ex vivo analyses (X-ray micrographs and histology)
1	Week 4	12
1	Week 4	12
1	Week 6	12
1	Week 12	24
1	Week 16	36
1	Week 24	36
1	Week 24	36
2	Week 4	12
2	Week 4	12
2	Week 8	12
2	Week 8	12
2	Week 8	12
2	Week 12	24
2	Week 6	36

Results

Clinical examination

All animals recovered well from surgery and wound healing was uneventful. Most of the animals in both groups (23/40) showed mild to moderate lameness and little evidence of pain up to a maximum of 16 days post-surgery. Only one animal in group 2 showed persistent low-grade lameness after surgery until the end of the observation period in week 12. Palpatory emphysematous swelling medial to the proximal tibia was found in 36/40 animals from postoperative day 10 until a maximum of 6 weeks post-surgery. In 14 animals, a puncturing of the swelling was indicated once due to marked lameness (grade 3) with weight loss and pain on palpation. Gas (<2 ml) mixed with fluid (2–5 ml (seroma)) was withdrawn from the swelling and the lameness disappeared. Bacteriological testing of

the fluid was inconclusive in both aerobic and anaerobic cultivation. The histological smear of the fluid was relatively lacking in cells, with only isolated blood cells found.

Radiological evaluation

Postoperative radiographs demonstrated the correct positioning of the scaffolds and screws. In one animal (with the existing lameness) the screw proximal to the osteotomy gap was not anchored in the contralateral cortex and bent. Initial scaffold degradation was observed in group 2 in week 4 and in group 1 in week 20. All scaffolds remained clearly visible throughout the study period. Callus formation was seen in both groups starting in week 4. In week 28 (group 1) and week 32 (group 2), the osteotomy gap was completely bridged with callus from all sides in all animals (Supplemental Material 1(a) and (b)). Gap formation in the area between the scaffold and the proximal or distal bone (MgF₂: 8/20; CaP: 9/20), was visible in both planes from the second postoperative week until week 10 (group 1) or week 16 (group 2) (Supplemental Material 1(c) and (d)). Significant gas accumulation occurred in the surrounding tissue of the proximal tibia from week 2 to week 16 (group 2) and week 24 (group 1) in the majority of animals (group 1: 19/20; group 2: 17/20) (Supplemental Material 1(c) and (d)).

In vivo μ CT examination and evaluation

Descriptive and semiquantitative evaluation of the μ CT examination. The majority of the scaffolds (26/40) kept most of their original contour until the end of the respective study period. No macroscopic degradation was visible. The other scaffolds (14/40) (per group: $n=7$) showed structural loss with severe degradation (Table 3, Figure 6). In these 14 scaffolds, initial degradation was observed in week 4. In group 1, it started mostly at the scaffold tip and spread homogeneously over the entire scaffold during the

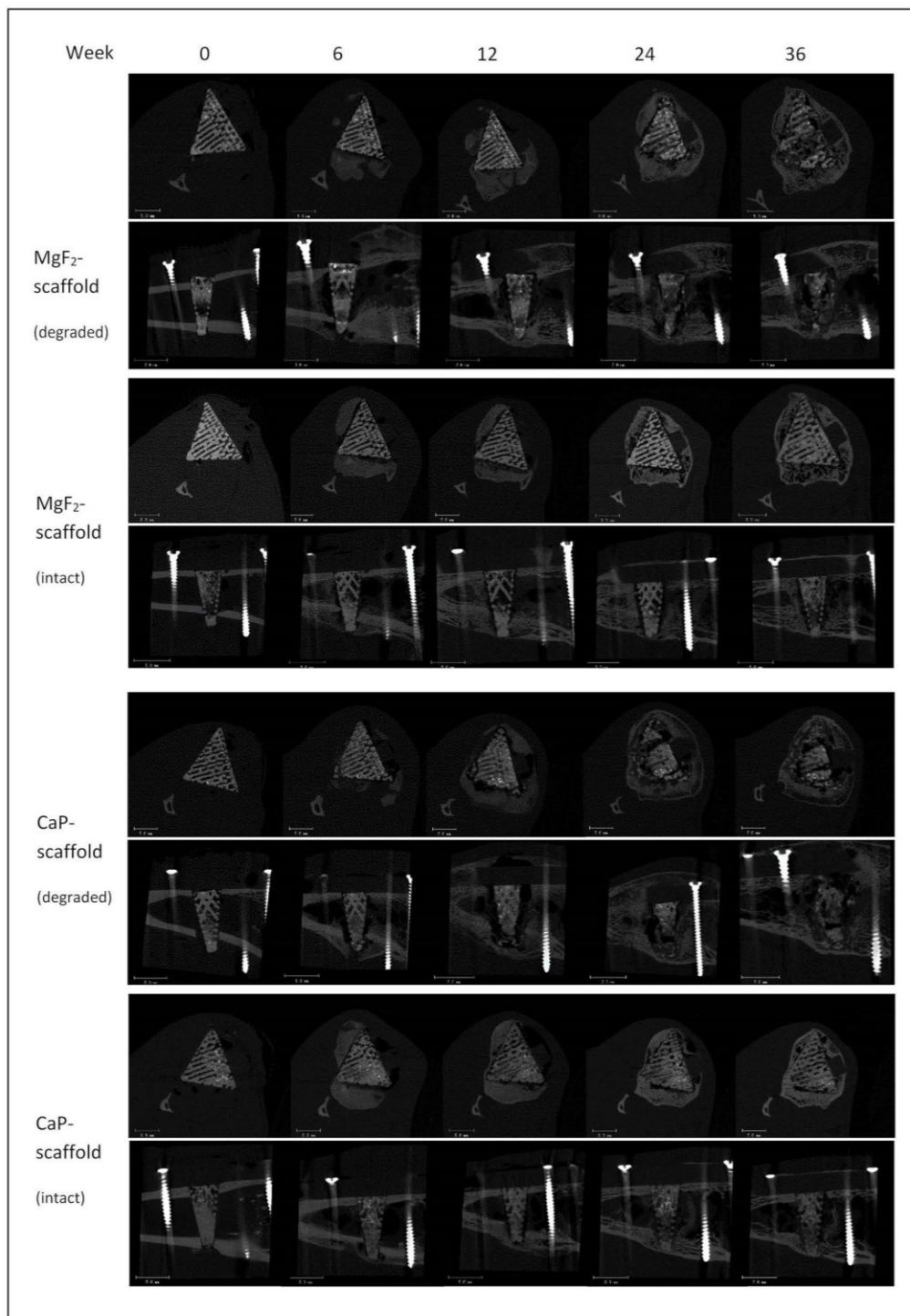


Figure 6. μ CT images of the center of intact and severely degraded scaffolds in the original and the reoriented scan.

course of the study. In group 2, the majority of this increased degradation was homogeneous. Gas formation was observed outside the bone and intramedullary in the proximal tibia. Gas outside the bone was detected until

week 32 with steadily decreasing amounts in the surrounding soft tissue (Figure 7(a)). There was an increase in the amount of intramedullary gas at weeks 2 and 4 for both groups, followed by a decrease until week 16 (group

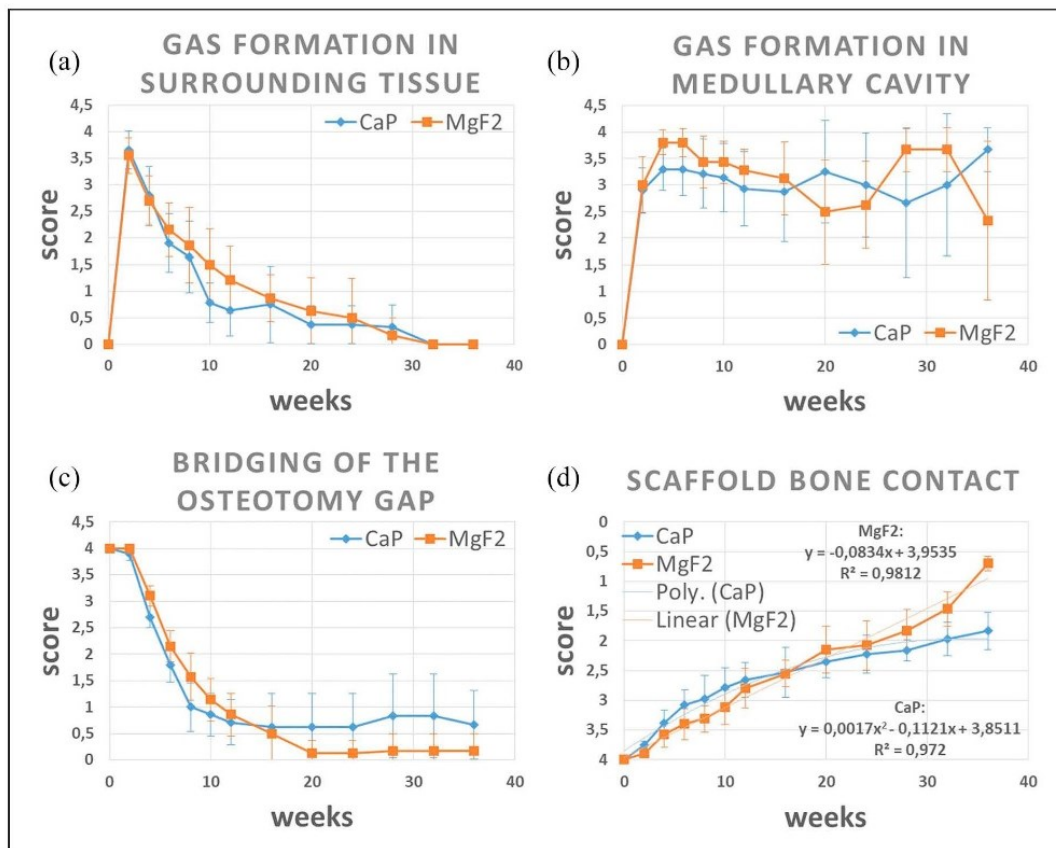


Figure 7. Semiquantitative analysis of the μ CT scans: (a) gas formation in the surrounding tissue, (b) gas formation in the medullary cavity, (c) bridging of the osteotomy gap, and (d) bone scaffold contact.

2) and 20 (group 1), respectively. Thereafter, the intramedullary gas formation differed in both groups (Figure 7(b)). Initial callus formation was observed in week 2 (group 2) or week 4 (group 1) in the scaffold tip area (transcortex, lateral cortex). After week 6, the osteotomy gap was >50% bridged with callus tissue (Figure 7(c)). At weeks 12 and 16, callus tissue appeared to be inhomogeneous in all scaffolds. Starting in week 20, bone maturation with lamellar bone was evident in group 1 and in week 24 in group 2. In week 36, the last observation time point, the osteotomy gap was completely bridged with the exception of a few scaffolds (group 1: $n=1$; group 2: $n=3$). Postoperatively, the optimal positioning and the contact of the scaffolds with the cortices could be demonstrated in the reoriented μ CT scans in 36/40 scaffolds. In 4/40 CaP-scaffolds, a small gap between scaffold and laterodistal and mediolateral cortex was observed. By postoperative week 2, all scaffolds showed developing bone-scaffold contacts (Figure 7(d)), with newly formed bone tissue uniformly approaching the scaffolds. From week 4 onward, both groups showed more contacts in the caudal region of the scaffold compared with the cranial region. Overall, a higher number of bone-scaffold contacts were

seen from week 2 to week 16 in group 2, and from week 16 to week 36 in group 1.

Quantitative evaluation of the μ CT examination. The scaffolds of both groups showed small volume decreases from the time of implantation to the end of the study at week 36 (Group 1: 8.9%; Group 2: 7.5%) (Figure 8(a)). There was also a decrease in density for both coatings (Group 1: 16.07%; Group 2: 23.65%) (Figure 8(b)).

X-ray microscopic images

The high-resolution X-ray microscope scans demonstrated the integrity of all scaffolds prior to implantation. One scaffold from group 1 showed a lower number of pores in the central area than in the other samples. Differences in the initial volume of the scaffolds were evident (Supplemental Material 2). In the images taken at the respective end of the study, severe degradation and loss of shape of the scaffolds were observed in 14/40 scaffolds (seven per group, Table 3). The volume loss of the scaffolds before implantation and at the end of the study in week 36 was relatively low (group 1: 11.8%; group 2: 5.8%) (Supplemental Material 2).

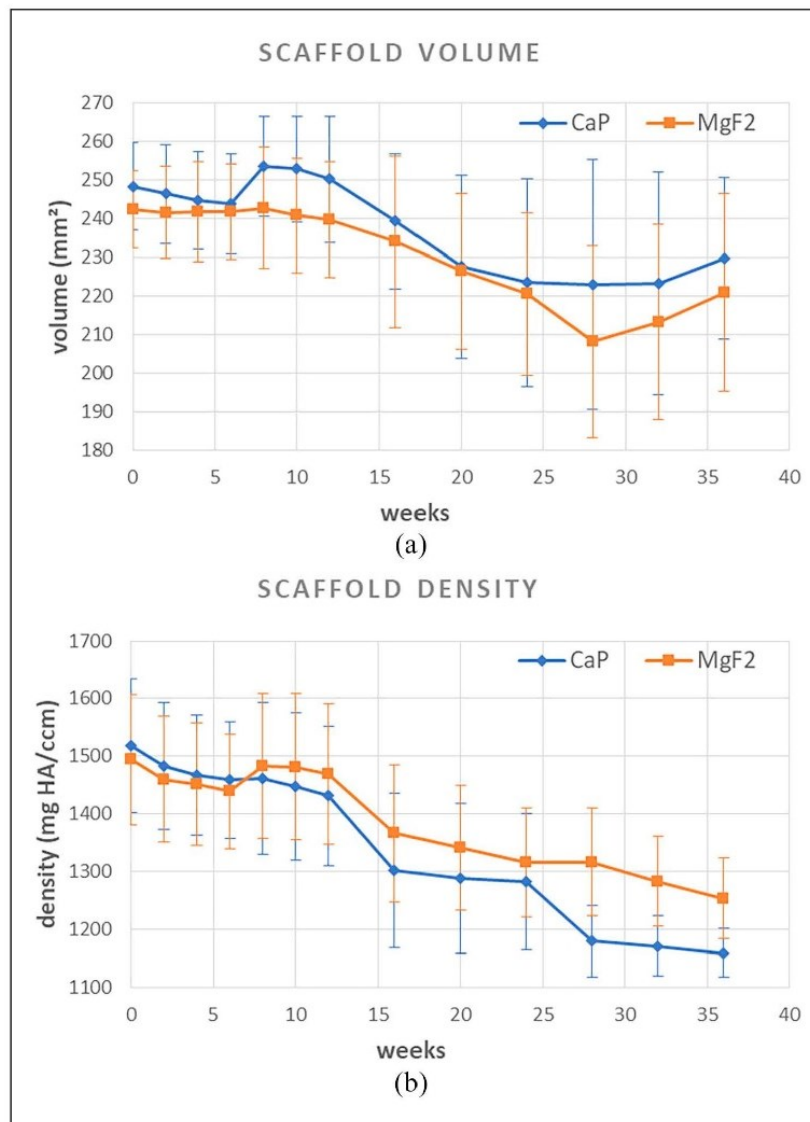


Figure 8. Quantitative evaluation of the μ CT scans: (a) scaffold volume and (b) scaffold density.

Histological evaluation

Descriptive and semiquantitative evaluation. The semiquantitative evaluation for time points 6 and 36 weeks of implantation showed more degradation in group 1 (Figure 9(a)). In week 12, degradation was greater in group 2 and in week 24 it was identical in both groups. Overall, it was noticeable that 14/40 scaffolds (seven each per group, Table 3) degraded more severely or less homogeneous than the rest. This was manifested in the loss of their original shape (Figure 10). Massive periosteal callus was present on the lateral side of the tibia after 6 and 12 weeks in both groups and was seen to a smaller extent at later examination time points after 24 and 36 weeks (Figures 9(b) and 10). In week 6, five CaP scaffolds and three MgF₂ scaffolds showed an incompletely bridged osteotomy

gap at the scaffold tip. Complete bridging was noted at later observation time points (Figure 9(c)). Small amounts of endosteal callus tissue were present in both groups after 6 and 12 weeks which increased over time. Overall, greater amounts of endosteal callus tissue were seen distal to the scaffolds than proximally (Figure 9(d) and (e)). From week 6 onward, both groups showed increasing remodeling of the cortices over time with a greater extent at the trans-cortex (cortex near the tip of the scaffold) (Figure 9(f)–(i)). Gas was observed mainly in the proximal region of the scaffold in the medullary cavity (Figure 9(j) and (k)). Overall, gas formation persisted to a moderate extent throughout the course of the study. At the 6-week time point, cracks were seen in the scaffold tip region. Over time, cracks were observed over the entire scaffold

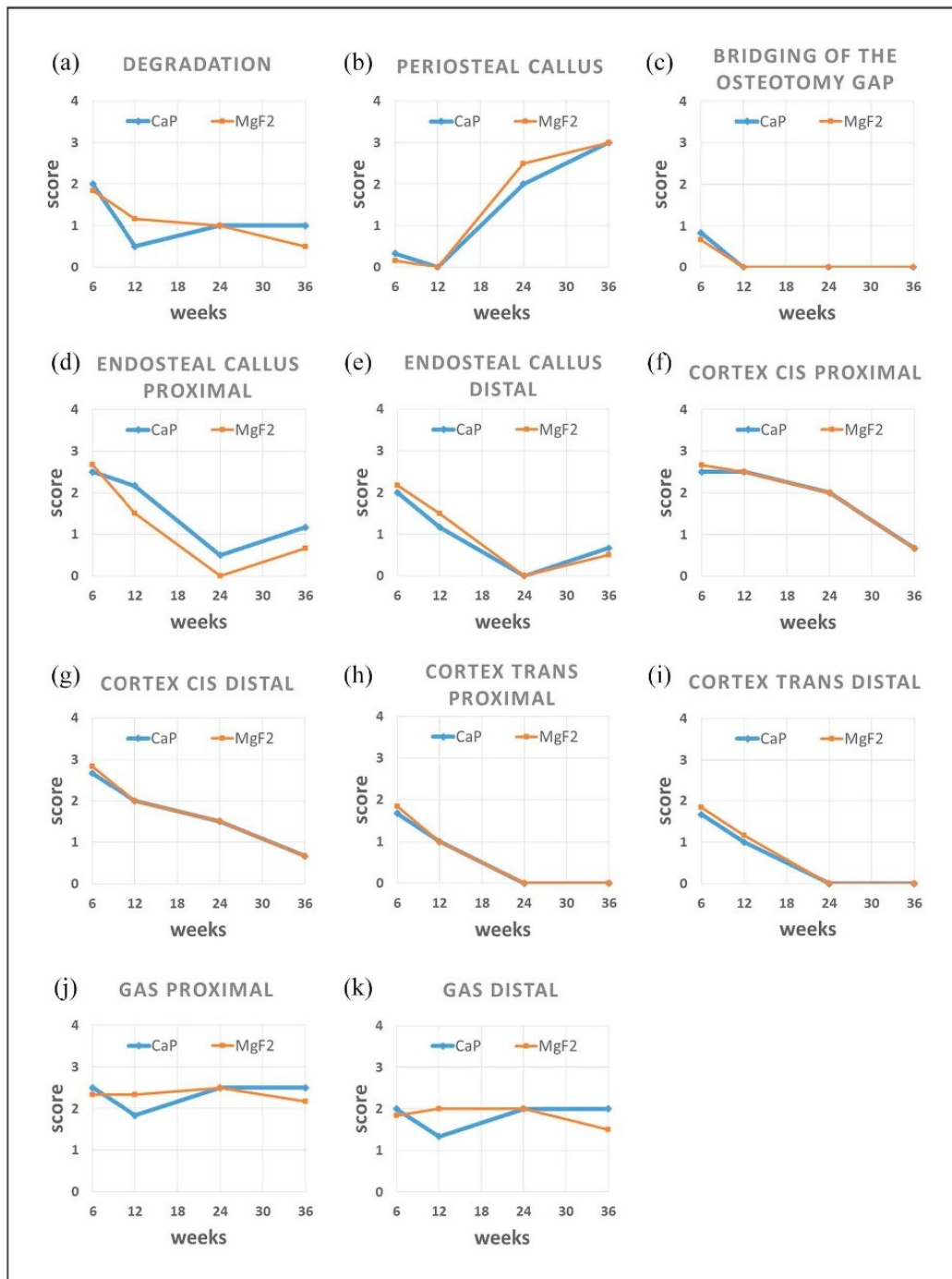


Figure 9. Semiquantitative evaluation of the histological sections : (a) degradation, (b) periosteal callus, (c) bridging of the osteotomy gap, (d) endosteal callus proximal, (e) endosteal callus distal, (f) cortex cis proximal, (g) cortex cis distal, (h) cortex trans proximal, (i) cortex trans distal, (j) gas proximal, (k) gas distal.

surface, with MgF₂ scaffolds showing more cracks than CaP scaffolds. Cartilage tissue was evident in individual scaffolds after week 6 (2 × group 1, 4 × group 2), week 12 (1 × group 1, 1 × group 2), and week 24 (1 × group 2) in the area of the

lateral osteotomy gap. In week 6, osteoid could be seen at the tip of the scaffolds in both groups. In week 12, thicker osteoid seams were seen in the tip and distal surface of the scaffold which surrounded the entire scaffold after 24 and 36 weeks

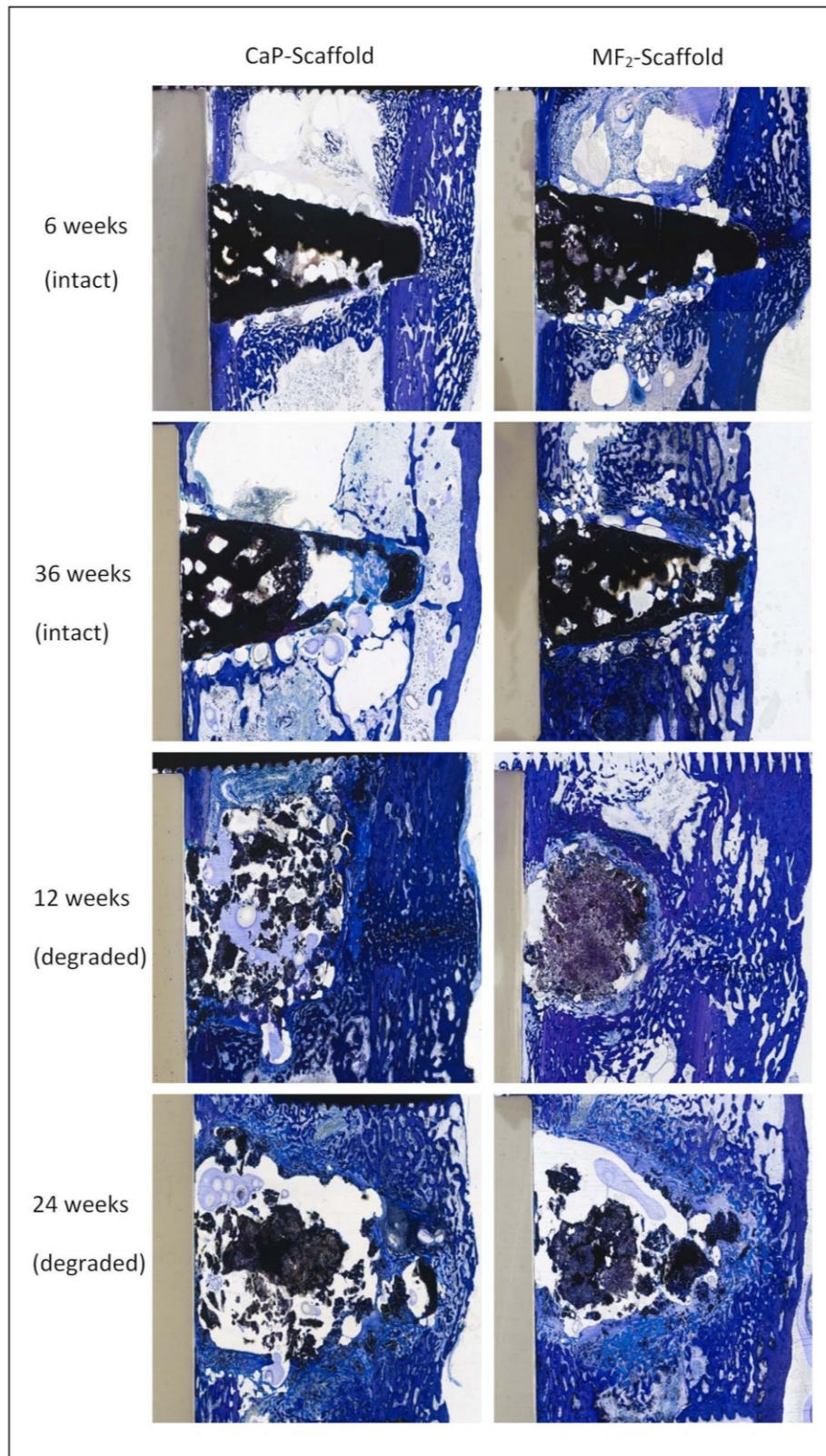


Figure 10. (Continued)



Figure 10. Histological cross-sections of intact scaffolds (upper two rows) and severely degraded scaffolds (lower three rows) of both coatings.

and sporadically extended into outer pores. On the proximal and distal surfaces of the scaffold, excluding the tip, a narrow granulation tissue fringe consisting of fibroblasts and fibrocytes was evident after 6 weeks in both groups which sporadically grew into the outer pores of the scaffolds. At week 12, a slightly more pronounced granulation tissue layer was present around the scaffold and between the callus network. At weeks 24 and 36, granulation tissue was almost exclusively evident between the callus network. In week 36, granulation tissue and osteoid could be seen in individual central pores. Bone tissue was not detected in the pores at any time.

Bone marrow located distal and proximal to the scaffolds increased over time and was characterized by many adipocytes and cells in various stages of the myeloid series. Furthermore, a moderate amount of macrophages and scattered blood vessels were seen in the medullary cavity after 6 weeks which increased over time. In week 36, more blood vessels were seen in group 1 than in group 2. Foreign body giant cells were observed only sporadically in both groups at weeks 24 and 36.

Quantitative histological evaluation. The histomorphometric evaluation (Supplemental Material 3) of both groups showed only a slight loss of material between weeks 6 and 36 (group 1: 7.3%, group 2: 2.5%). The histomorphometrically measured bone quantity (week 6: group 1: 25.3%, group 2: 16.7%) increased overall over time and reached the highest values in week 36 (group 1: 30.7%, group 2: 26.3%). It was noticeable that more bone was measured in all observation times in group 1 than in group 2. Gas was detected at all time points, with the highest gas content detected in both groups in week 24. Comparing the two groups, it was noticeable that significantly less gas was measured in group 1 than in group 2 in weeks 6, 24, and 36 (week 6, $p=0.008$). In contrast, group 1 showed significantly more gas than group 2 in week 12 ($p=0.003$). Regarding the area percentage of granulation tissue, group 1 showed a constant value of about 12% over the study period. In contrast, granulation

tissue in group 2 decreased from an initial 14.7% in week 6 to 5.6% in week 24 and increased again to 8% in week 36. Osteoid was seen at all examination time points. In group 2, the amount of osteoid increased steadily over time (week 6: 0.9%; week 36: 6.0%) and had a significantly greater proportion than group 1 at the 36-week time point ($p=0.0014$). Bone marrow tissue was detected to a similar extent in both groups and remained relatively constant over time (week 6: group 1: 6.3%, group 2: 5.6%). Cartilage tissue was measured to a very low extent in both groups. The amount of plate that could technically not be excluded from the measurements remained in the range below 1%.

SEM/EDS analyses

The SEM images showed a clearly distinguishable degradation layer in all scaffolds which appeared darker compared to the original scaffold material (Supplemental Material 4: measuring point 4; Supplemental Material 5: measuring points 1, 6). The extent of this degradation layer increased over time. Heavily degraded scaffold material showed a lot of bright islands in the SEM images. EDS analyses in this area showed that these bright spots were strong enrichments of rare earths and aluminum (Supplemental Material 5: measuring points 4, 5). Using EDS analyses, magnesium was detected in decreasing amounts from the scaffold center to the periphery with surrounding bone (Supplemental Material 4: measuring points 2, 3, 4). The amount of magnesium decreased as the implantation time progressed (Supplemental Material 4: measuring point 3; Supplemental Material 5: measuring point 3). On the scaffold surface and in the degradation layer, regions with rare earths, aluminum, and also calcium and phosphate (Ca/P) could be identified (Supplemental Material 4: measuring points 1, 5; Supplemental Material 5: measuring point 4, 5). Ca/P precipitates were found in contact points between new bone tissue and the scaffold.

Discussion

The clinically good tolerability of the magnesium alloy LAE442 has been confirmed in other studies.^{17,34,51} In the present study, no clinical adverse reactions and only mild to moderate lameness were observed in 24/40 animals, which may be attributed to the surgical procedure of a hinged corrective osteotomy. Another cause of this lameness could be gas or seroma formation, as lameness improved after a single puncture of the affected site in these animals. It is known that hydrogen is produced during the degradation of magnesium, which accumulates locally if it is insufficiently removed by the surrounding tissues and blood vessels.^{30,52,53} A causal relation between lameness and accumulation of gas due to degradation of magnesium alloys has not been observed in other studies.^{30,52,54,55} Intramedullary gas bubbles, which were observed in the medullary cavity in the vicinity of the scaffolds, remained at a moderate level over the time course of the present study and have been described many times in other studies in connection with intramedullary pins and an interlocking nail system made of LAE442 in animal models.^{16,56,57} The occurring seromas probably originated from the irritation of the skin with the underlying tissue and a surgical-induced wound cavity.^{20,58,59} The existing lameness of one animal can be attributed to the obliquely placed screw.

The gas accumulation seen immediately postoperatively is air that was physiologically entrapped intraoperatively and is unrelated to the degradation of the scaffolds.¹⁹⁻²²

The different initial volume of the scaffolds found in the X-ray microscope investigations can be attributed to the manufacturing process. The production of the wedges of this size, dimension, and standardized pore sizes proved to be very difficult in the investment casting process.³⁷ Quantitative analyses of volume and density using μ CT, X-ray microscopy, and histomorphometry showed a very slow degradation of the scaffolds with small volume and density decrease until the end of the study at week 36. The slow degradation of the magnesium alloy LAE442 was also observed on small-sized porous LAE442 cylinders which were investigated in the greater trochanter of the femur in the rabbit model.^{21-23,60,61} When comparing the coatings in the present study, it was noticed that the wedges coated only with MgF_2 (group 1) showed an overall greater volume loss than the wedges additionally coated with CaP (group 2). This indicates that additional coatings slow down degradation and at the same time gas formation. In a previous study by Julmi et al.,³⁷ who investigated small-sized porous LAE442 cylinders with the same coatings in vitro in simulated body fluid, it was also revealed that the additional CaP coating increases the corrosion resistance of the cylinders.

The present study showed that 14/40 scaffolds (per group, $n=7$) exhibited increased degradation with loss of original shape compared to the remaining 26/40 scaffolds. It has been described in the literature that increased corrosion

in magnesium alloys can be caused by microstructural features, such as segregations of alloying elements or second phases that have higher electrode potential compared with the magnesium matrix.⁶²⁻⁶⁴ In the present study, SEM/EDS analyses detected local enrichments of the alloying elements rare earths and aluminum that increase the risk of microgalvanic corrosion. Furthermore, Denkena et al. reported⁶⁵ that the corrosion of bone substitute material depends significantly on stress, with compressive stress increasing the corrosion rate and tensile stresses reducing it. Due to the natural geometry of the rabbit tibia, asymmetric stress may affect the scaffold, resulting in different local corrosion rates. This might have been the case in the present study. Histologically, crack formation was noticed in the scaffold material, which was more severe in group 1 than in group 2, which might be related to the more severe degradation of MgF_2 scaffolds. Crack formation was also seen in other in vivo studies of implants or bone substitutes made of LAE442 or Mg alloys.^{27,60,61,66,67} According to Mueller et al.,⁶⁷ cracks occur in magnesium alloys due to gas evolution during degradation.

Furthermore, in the present study, there was radiographic evidence of proximal and distal osteotomy gaps between bone and the scaffold in the first few weeks post-op. It is possible that this was physiological bone necrosis of a few millimeters according to Muhr,⁶⁸ which generally occurs in the course of indirect fracture healing due to a lack of vascularization in the defect area. However, the visible gap could also be related to degradation and the resulting gas which displaced the callus network, creating the impression of reduced bone-scaffold contact. This needs to be clarified by further investigation.

The bone defect in the open wedge corrective osteotomy performed in this study healed via secondary bone healing, which was characterized by the formation of endosteal and periosteal callus tissue and was expected based on the size of the defect according to the literature.⁶⁹ A large amount of callus is considered positive in this type of bone healing, as it indicates a high healing capacity of the bone.^{70,71} According to the literature, the massive callus formation could also be due to the osteogenic potency of the magnesium ions.^{30,72,73} Initial callus formation could be found in all animals in the area of the lateral cortex (transcortex). One reason for increased lateral callus formation could have been the medially placed support plate. It can be assumed that this stabilization compensated part of the mechanical stress in the defect area of the medial rabbit tibia resulting in increased callus formation on the lateral side. This phenomenon was also found in other studies with plate-screw systems.^{13,74}

The transformation of callus/woven bone callus into lamellar bone over time seen in histology is known to occur in the course of secondary bone healing⁷⁵⁻⁷⁷ and was associated with a decrease in periosteal callus at later examination time points. Compared to periosteal callus formation, endosteal callus formation was observed to a

lesser extent and was also observed by Hampp et al.⁷⁸ investigating intramedullary pins of different magnesium alloys in rabbit tibiae.

In contrast to the study by Witting et al.²³ in this present study a larger scaffold and another implantation localization was used, which was in contact with surrounding soft tissue (in the case of cylinders purely cancellous position). According to the literature, Mg alloys degrade more rapidly when they are in contact with soft tissue, as at this location the blood flow is higher compared to cancellous bone.^{12,54,79,80} There was comparatively more loading on the scaffold due to the partial loaded defect and consequently a different degradation and bone ingrowth behavior of the scaffold compared to the cylinders. In the cylinders, there was more ingrowth of bone trabeculae, whereas in the wedge, the defect was primarily stabilized by callus and subsequently remodeled into lamellar bone.

When comparing the coatings, group 2 showed better bridging of the osteotomy gap and more bone-scaffold contacts by week 12. This observation could be due to the osteoconductive influence of the released calcium ions from the coating which was also observed in other *in vivo* studies.^{34,72} However, at later time points, better bridging, more bone scaffold contacts, and greater remodeling were seen in group 1 in our study. These could be explained by the overall greater degradation of the MgF₂ scaffolds at later time points. This stronger degradation might have released more magnesium ions which, according to the literature, have a high osteogenic potency.⁷³ From this it can be concluded that the influence of an additional CaP coating decreased over time.

Histologically, cartilaginous tissue was detected in some scaffolds (9/40) of both groups in the area of the scaffold tip, especially at the 6-week time point. This observation can be considered physiological, as the body attempts to close the defect via osteochondral ossification.^{76,81} Pauwels⁸² postulated that massive callus formation with predominantly osteochondral ossification predominates on the compression side of a weight-bearing fracture, which was presumably the case in the present study.

In the histological sections, a small amount of granulation tissue with fibroblasts was seen in both groups, although the percentage measured histomorphometrically was relatively constant over time in group 1 and varied slightly in group 2. According to the literature, the presence of granulation tissue can also be seen as a physiological response to a foreign body.⁸³ In the present study, granulation tissue and osteoid did not appear in the central pores until week 36. Mineralized bone tissue was not detected. Interconnecting pores in bone substitutes are thought to guide tissue growth, to enable and enhance tissue regeneration and blood flow, and to have an osteoconductive effect.^{64,84,85} According to the literature, pores in bone substitutes should have a size of 150–500 μm.^{86,87} The alloy LAE442 showed improved osteoconductive

properties in a previous study where 500 μm interconnecting pores were used, therefore this pore size was also chosen for the scaffolds in the present study.^{21,61}

The delayed ingrowth of bone tissue in the present study was also reported by Lalk et al.,²⁰ who found non mineralized bone tissue in the center of porous AX30 cylinders after 24 weeks. However, it must also be noted that the wedge used in the present study was much larger compared to the cylindrical implants, and thus the distance for ingrowing tissue into the scaffold center was much greater. Grau et al.⁸⁸ were also unable to see ingrowth of bone tissue into a porous magnesium implant in a skullcap defect in mice after 12 weeks. They hypothesized that the occupation of the implant center and pores with gas prevented bone ingrowth or delayed it. In both groups of the present study, bone marrow with adipocytes and hematopoietic cells were detected in the medullary canal at all time points which can be considered physiological.

The presence of some macrophages and only a few foreign body giant cells in the present study was related to scaffold degradation and removal of corrosion products, as also reported in the literature.^{17,19,61} These cells occur physiologically as part of a foreign body reaction in implanted biodegradable materials.^{60,89}

Blood vessels were detected in the histological examination at all times and their quantity increased over time. In week 36, more blood vessels were evident in group 1 compared to group 2. Improved vascularization results in better nutrient delivery, and thus better osseointegration.^{87,90–92} The better osseointegration of the more vascularized MgF₂ scaffolds compared to CaP scaffolds was also confirmed by higher bone quantities and more bone-scaffold contacts at later time points.

Furthermore, SEM images showed a dark degradation layer at the edge of the light-colored original scaffold material which increased with time. This observation is consistent with that of Kleer-Reiter et al.,⁶⁰ who studied porous cylindrical LAE442 scaffolds in the proximal rabbit femur. The fact that the proportion of Mg decreases as degradation progresses was also reported in *in vivo* studies with Mg-based implants by Wang et al.⁷² and Bracht et al.⁹³

On the surface and in the degradation layer of the scaffolds used in the present study, calcium- and phosphate-rich regions were measured in the EDS analyses. These calcium- and phosphate-rich regions provided direct contact between the scaffold and the surrounding bone tissue. In other studies with porous scaffolds of different magnesium alloys, these contacts were also seen^{30,60,61} and can be considered positive.

Conclusion

Wedge-shaped scaffolds of the magnesium alloy LAE442 showed good clinical tolerance, bridging of the osteotomy gap, and slow but inhomogeneous degradation with a single

MgF₂ coating (group 1) or an additional CaP coating (group 2). Increased bone-scaffold contacts were more pronounced until week 12 in group 2 (MgF₂-CaP coating), however at later timepoints in group 1 (MgF₂ coating). Therefore, a decreasing influence of CaP coating at later timepoints is assumed. However, CaP coating was shown to be beneficial for the first 12 weeks in the important phase of bone healing. The strong callus formation resulted in rapid stabilization of the defect in both groups. A population of undesired cells could not be found histologically. However, the production of these scaffolds in this shape and size was difficult.³⁷ The scaffolds already showed a certain inhomogeneity before implantation, which led to inhomogeneous degradation. Furthermore, despite the use of an additional CaP coating, the accumulation of gas could not be prevented.

Acknowledgements

The authors thank Beatrix Limmer, Cristiane Meneghelli-Rudolph, and Lisa Wurm for their excellent technical support, Yury Zablotski for his help during the statistical analyses and Brigitte von Rechenberg for her assistance with the histological evaluation.

Contributorship

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

Data availability statement

The data of this study that substantiate the findings can be requested from the corresponding author upon request.

Declaration of conflicting interests

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


Funding


The author(s) disclosed receipt of the following financial support for the research, authorship, and/or publication of this article: This project was financially supported by the German Research Foundation (DFG) within the project “Interfacial effects and ingrowth behavior of magnesium sponges as a bioresorbable bone graft substitute” (Grant No. 271761343).

Guarantor

A.M.-L. takes full responsibility for this article, including the accuracy of the study as well as the appropriateness of the reference list.

ORCID iDs

Marlene Schmidt  <https://orcid.org/0000-0002-0030-5280>

Franziska Feichtner  <https://orcid.org/0000-0003-2435-1967>

Supplemental material

Supplemental material for this article is available online.

References

- Dimitriou R, Jones E, McGonagle D and Giannoudis PV. Bone regeneration: current concepts and future directions. *BMC Med* 2011; 9: 66–77.
- Parikh SN. Bone graft substitutes: past, present, future. *J Postgrad Med* 2002; 48: 142–148.
- Cipitria A, Reichert JC, Epari DR, et al. Polycaprolactone scaffold and reduced rhBMP-7 dose for the regeneration of critical-sized defects in sheep tibiae. *Biomaterials* 2013; 34: 9960–9968.
- Seiler J 3rd and Johnson J. Iliac crest autogenous bone grafting: donor site complications. *J South Orthop Assoc* 2000; 9: 91–97.
- Linhart W, Briem D, Amling M, Rueger JM and Windolf J. [Mechanical failure of porous hydroxyapatite ceramics 7.5 years after implantation in the proximal tibial]. *Unfallchirurg* 2004; 107: 154–157.
- Younger EM and Chapman MW. Morbidity at bone graft donor sites. *J Orthop Trauma* 1989; 3: 192–195.
- Salgado AJ, Coutinho OP and Reis RL. Bone tissue engineering: state of the art and future trends. *Macromol Biosci* 2004; 4: 743–765.
- Oryan A, Alidadi S, Moshiri A and Maffulli N. Bone regenerative medicine: classic options, novel strategies, and future directions. *J Orthop Surg Res* 2014; 9: 18.
- Gogolewski S. Bioresorbable polymers in trauma and bone surgery. *Injury* 2000; 31 Suppl 4: 28–32.
- Hofmann GO. Biodegradable implants in traumatology: a review on the state-of-the-art. *Arch Orthop Trauma Surg* 1995; 114: 123–132.
- Böstman O and Pihlajamäki H. Clinical biocompatibility of biodegradable orthopaedic implants for internal fixation: a review. *Biomaterials* 2000; 21: 2615–2621.
- Henderson SE, Verdels K, Maiti S, et al. Magnesium alloys as a biomaterial for degradable craniofacial screws. *Acta Biomater* 2014; 10: 2323–2332.
- Tian L, Sheng Y, Huang L, et al. An innovative Mg/Ti hybrid fixation system developed for fracture fixation and healing enhancement at load-bearing skeletal site. *Biomaterials* 2018; 180: 173–183.
- Witte F. The history of biodegradable magnesium implants: a review. *Acta Biomater* 2010; 6: 1680–1692.
- Li X, Liu X, Wu S, Yeung KWK, Zheng Y and Chu PK. Design of magnesium alloys with controllable degradation for biomedical implants: from bulk to surface. *Acta Biomater* 2016; 45: 2–30.
- Rössig C, Angrisani N, Besdo S, et al. Magnesium-based intramedullary nailing system in a sheep model: biomechanical evaluation and first in vivo results. *J Vet Sci Med Diagn* 2014; 4: 1–12.
- Angrisani N, Reifenrath J, Zimmermann F, et al. Biocompatibility and degradation of LAE442-based

- magnesium alloys after implantation of up to 3.5 years in a rabbit model. *Acta Biomater* 2016; 44: 355–365.
18. Windhagen H, Radtke K, Weizbauer A, et al. Biodegradable magnesium-based screw clinically equivalent to titanium screw in hallux valgus surgery: short term results of the first prospective, randomized, controlled clinical pilot study. *Biomed Eng Online* 2013; 12: 62.
 19. Lalk M, Reifenrath J, Angrisani N, et al. Fluoride and calcium-phosphate coated sponges of the magnesium alloy AX30 as bone grafts: a comparative study in rabbits. *J Mater Sci Mater Med* 2013; 24: 417–436.
 20. Lalk M, Reifenrath J, Rittershaus D, Bormann D and Meyer-Lindenberg A. Biocompatibility and degradation behaviour of degradable magnesium sponges coated with bioglass - method establishment within the framework of a pilot study. *Materwiss Werksttech* 2010; 41: 1025–1034.
 21. Augustin J, Feichtner F, Waselau A, et al. Comparison of two pore sizes of LAE442 scaffolds and their effect on degradation and osseointegration behavior in the rabbit model. *J Biomed Mater Res A* 2020; 108: 2776–2788.
 22. Kleer N, Julmi S, Gartzke A-K, et al. Comparison of degradation behaviour and osseointegration of the two magnesium scaffolds, LAE442 and La2, in vivo. *Materialia* 2019; 8: 100436.
 23. Witting LM, Waselau A-C, Feichtner F, et al. Influence of coatings on degradation and osseointegration of open porous Mg scaffolds in vivo. *Materialia* 2020; 14: 100949.
 24. Zhang Y, Xu J, Ruan YC, et al. Implant-derived magnesium induces local neuronal production of CGRP to improve bone-fracture healing in rats. *Nat Med* 2016; 22: 1160–1169.
 25. Chaya A, Yoshizawa S, Verdalis K, et al. In vivo study of magnesium plate and screw degradation and bone fracture healing. *Acta Biomater* 2015; 18: 262–269.
 26. Revell PA, Damien E, Zhang XS, Evans P and Howlett CR. The effect of magnesium ions on bone bonding to hydroxyapatite coating on titanium alloy implants. *Key Eng Mater* 2004; 254–256: 447–450.
 27. Thomann M, Krause C, Angrisani N, et al. Influence of a magnesium-fluoride coating of magnesium-based implants (MgCa0.8) on degradation in a rabbit model. *J Biomed Mater Res A* 2010; 93: 1609–1619.
 28. Shao Y, Zeng R-C, Li SQ, et al. Advance in antibacterial magnesium alloys and surface coatings on magnesium alloys: a review. *Acta Metallurgica Sin* 2020; 33: 615–629.
 29. Smith MR, Atkinson P, White D, et al. Design and assessment of a wrapped cylindrical Ca-P AZ31 Mg alloy for critical-size ulna defect repair. *J Biomed Mater Res A* 2012; 100B: 206–216.
 30. Witte F, Kaese V, Haferkamp H, et al. In vivo corrosion of four magnesium alloys and the associated bone response. *Biomaterials* 2005; 26: 3557–3563.
 31. Kopp A, Derra T, Mütter M, et al. Influence of design and postprocessing parameters on the degradation behavior and mechanical properties of additively manufactured magnesium scaffolds. *Acta Biomater* 2019; 98: 23–35.
 32. Alvarez-Lopez M, Pereda MD, del Valle JA, et al. Corrosion behaviour of AZ31 magnesium alloy with different grain sizes in simulated biological fluids. *Acta Biomater* 2010; 6: 1763–1771.
 33. Staiger MP, Pietak AM, Huadmai J and Dias G. Magnesium and its alloys as orthopedic biomaterials: a review. *Biomaterials* 2006; 27: 1728–1734.
 34. Thomann M, Krause C, Bormann D, von der Höh N, Windhagen H and Meyer-Lindenberg A. Comparison of the resorbable magnesium alloys LAE442 und MgCa0.8 concerning their mechanical properties, their progress of degradation and the bone-implant-contact after 12 months implantation duration in a rabbit model. *Materwiss Werksttech* 2009; 40: 82–87.
 35. Reifenrath J, Krause A, Bormann D, von Rechenberg B, Windhagen H and Meyer-Lindenberg A. Profound differences in the in-vivo-degradation and biocompatibility of two very similar rare-earth containing Mg-alloys in a rabbit model. *Materwiss Werksttech* 2010; 41: 1054–1061.
 36. Maier HJ, Julmi S, Behrens S, et al. Magnesium alloys for open-pored bioresorbable implants. *JOM* 2020; 72: 1859–1869.
 37. Julmi S, Krüger A-K, Waselau A-C, et al. Processing and coating of open-pored absorbable magnesium-based bone implants. *Mater Sci Eng C* 2019; 98: 1073–1086.
 38. Song G. Control of biodegradation of biocompatible magnesium alloys. *Corros Sci* 2007; 49: 1696–1701.
 39. Witte F, Fischer J, Nellesen J, et al. In vivo corrosion and corrosion protection of magnesium alloy LAE442. *Acta Biomater* 2010; 6: 1792–1799.
 40. Staesche M. Über die chemische Erzeugung einer dickeren magnesiumfluorid-schutzschicht auf magnesium-legierungen. *Arch für Metallkunde* 1948; 3: 99–102.
 41. Jo JH, Kang B-G, Shin K-S, et al. Hydroxyapatite coating on magnesium with MgF- interlayer for enhanced corrosion resistance and biocompatibility. *J Mater Sci Mater Med* 2011; 22: 2437–2447.
 42. da Silva D, Kaduri M, Poley M, et al. Biocompatibility, biodegradation and excretion of polylactic acid (PLA) in medical implants and theranostic systems. *Chem Eng J* 2018; 340: 9–14.
 43. Tanodekaew S, Channasanon S, Kaewkong P and Uppanan P. PLA-HA scaffolds: preparation and bioactivity. *Procedia Eng* 2013; 59: 144–149.
 44. Song Y, Zhang S, Li J, Zhao C and Zhang X. Electrodeposition of Ca-P coatings on biodegradable Mg alloy: in vitro biomineralization behavior. *Acta Biomater* 2010; 6: 1736–1742.
 45. Waterman J, Birbilis N, Dias GJ, Woodfield TBF and Staiger MP. Improving *in vitro* corrosion resistance of biomimetic calcium phosphate coatings for Mg substrates using calcium hydroxide layer. *Corros Eng Sci Technol* 2012; 47: 340–345.
 46. Waterman J, Pietak A, Birbilis N, Woodfield T, Dias G and Staiger MP. Corrosion resistance of biomimetic calcium phosphate coatings on magnesium due to varying pretreatment time. *Mater Sci Eng B* 2011; 176: 1756–1760.
 47. Julmi S, Klose C, Krüger A-K, et al. Development of sponge structure and casting conditions for absorbable magnesium bone implants. In: *TMS 2017 146th annual meeting & exhibition supplemental proceedings*, 2017, pp.307–317. Cham: Springer.
 48. Seitz JM, Collier K, Wulf E, Bormann D and Bach FW. Comparison of the corrosion behavior of coated and

- uncoated magnesium alloys in an in vitro corrosion environment. *Adv Eng Mater* 2011; 13: B313–B323.
49. Spoor CF, Zonneveld FW and Macho GA. Linear measurements of cortical bone and dental enamel by computed tomography: applications and problems. *Am J Phys Anthropol* 1993; 91: 469–484.
 50. Donath K and Breuner G. A method for the study of undecalcified bones and teeth with attached soft tissues. The Sage-Schliff (sawing and grinding) technique. *J Oral Pathol Med* 1982; 11: 318–326.
 51. Witte F, Fischer J, Nellesen J, et al. In vitro and in vivo corrosion measurements of magnesium alloys. *Biomaterials* 2006; 27: 1013–1018.
 52. Wu Y, Wang YM, Zhao DW, et al. In vivo study of micro-arc oxidation coated Mg alloy as a substitute for bone defect repairing: degradation behavior, mechanical properties, and bone response. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2019; 181: 349–359.
 53. Witte F, Hort N, Vogt C, et al. Degradable biomaterials based on magnesium corrosion. *Curr Opin Solid State Mater Sci* 2008; 12: 63–72.
 54. Zhang N, Zhao D, Liu N, et al. Assessment of the degradation rates and effectiveness of different coated Mg-Zn-Ca alloy scaffolds for in vivo repair of critical-size bone defects. *J Mater Sci Mater Med* 2018; 29: 138.
 55. Erdmann N, Bondarenko A, Hewicker-Trautwein M, et al. Evaluation of the soft tissue biocompatibility of MgCa0.8 and surgical steel 316L in vivo: a comparative study in rabbits. *Biomed Eng Online* 2010; 9: 63.
 56. Bondarenko A, Angrisani N, Meyer-Lindenberg A, Seitz JM, Waizy H and Reifenrath J. Magnesium-based bone implants: immunohistochemical analysis of peri-implant osteogenesis by evaluation of osteopontin and osteocalcin expression. *J Biomed Mater Res A* 2013; 102: 1449–1457.
 57. Rössig C, Angrisani N, Helmecke P, et al. In vivo evaluation of a magnesium-based degradable intramedullary nailing system in a sheep model. *Acta Biomater* 2015; 25: 369–383.
 58. Baroudi R and Ferreira CA. Seroma: how to avoid it and how to treat it. *Aesthet Surg J* 1998; 18: 439–441.
 59. Garrett MP, Kakarla UK, Porter RW and Sonntag VK. Formation of painful seroma and edema after the use of recombinant human bone morphogenetic protein-2 in posterolateral lumbar spine fusions. *Neurosurg* 2010; 66: 1044–1049.
 60. Kleer-Reiter N, Julmi S, Feichtner F, et al. Biocompatibility and degradation of the open-pored magnesium scaffolds LAE442 and La2. *Biomed Mater* 2021; 16: 035037.
 61. Augustin J, Feichtner F, Waselau A-C, et al. Effect of pore size on tissue ingrowth and osteoconductivity in biodegradable Mg alloy scaffolds. *J Appl Biomater Funct Mater* 2022; 20: 22808000221078168.
 62. Huehnerschulte TA, Angrisani N, Rittershaus D, Bormann D, Windhagen H and Meyer-Lindenberg A. In vivo corrosion of two novel magnesium alloys ZEK100 and AX30 and their mechanical suitability as biodegradable implants. *Materials* 2011; 4: 1144–1167.
 63. Song GL and Atrens A. Corrosion mechanisms of magnesium alloys. *Adv Eng Mater* 1999; 1: 11–33.
 64. Gartzke A-K, Julmi S, Klose C, et al. A simulation model for the degradation of magnesium-based bone implants. *J Mech Behav Biomed Mater* 2020; 101: 103411.
 65. Denkena B, Köhler J, Stieghorst J, et al. Influence of stress on the degradation behavior of Mg LAE442 implant systems. *Procedia CIRP* 2013; 5: 189–195.
 66. Ullmann B, Reifenrath J, Seitz J-M, Bormann D and Meyer-Lindenberg A. Influence of the grain size on the in vivo degradation behaviour of the magnesium alloy LAE442. *Proc IMechE, Part H: J Engineering in Medicine* 2013; 227: 317–326.
 67. Mueller W-D, de Mele MF, Nascimento ML and Zeddies M. Degradation of magnesium and its alloys: dependence on the composition of the synthetic biological media. *J Biomed Mater Res A* 2009; 90: 487–495.
 68. Muhr G. Die bedeutung von biologie und biomechanik in der frakturheilung. In: Oestern HJ and Probst J (eds) *Unfallchirurgie in deutschland*. Berlin, Heidelberg: Springer, 1997, pp.128–134.
 69. Stürmer K. Histomorphologie der frakturheilung im vergleich der fixationsverfahren am tibiaschaft. In: Schmitz-Neuerburg KP and Stürmer KM (eds) *Die tibiaschaftfraktur beim erwachsenen*. Berlin, Heidelberg: Springer, 1987, pp.23–49.
 70. Einhorn TA and Gerstenfeld LC. Fracture healing: mechanisms and interventions. *Nat Rev Rheumatol* 2015; 11: 45–54.
 71. Féron J-M and Mauprivez R. Fracture repair: general aspects and influence of osteoporosis and anti-osteoporosis treatment. *Injury* 2016; 47: 10–14.
 72. Wang W, Nune KC, Tan L, et al. Bone regeneration of hollow tubular magnesium-strontium scaffolds in critical-size segmental defects: effect of surface coatings. *Mater Sci Eng C* 2019; 100: 297–307.
 73. Janning C, Willbold E, Vogt C, et al. Magnesium hydroxide temporarily enhancing osteoblast activity and decreasing the osteoclast number in peri-implant bone remodelling. *Acta Biomater* 2010; 6: 1861–1868.
 74. Wieding J, Lindner T, Bergschmidt P and Bader R. Biomechanical stability of novel mechanically adapted open-porous titanium scaffolds in metatarsal bone defects of sheep. *Biomaterials* 2015; 46: 35–47.
 75. Schindeler A, McDonald MM, Bokko P and Little DG. Bone remodeling during fracture repair: the cellular picture. *Semin Cell Dev Biol* 2008; 19: 459–466.
 76. Lanske B, Chandler H, Pierce A, et al. Abaloparatide, a PTH receptor agonist with homology to PTHrP, enhances callus bridging and biomechanical properties in rats with femoral fracture. *J Orthop Res* 2019; 37: 812–820.
 77. Herten M, Zilkens C, Thorey F, et al. Biomechanical stability and osteogenesis in a tibial bone defect treated by autologous ovine cord blood cells—a pilot study. *Molecules* 2019; 24: 295.
 78. Hampp C, Angrisani N, Reifenrath J, Bormann D, Seitz JM and Meyer-Lindenberg A. Evaluation of the biocompatibility of two magnesium alloys as degradable implant materials in comparison to titanium as non-resorbable material in the rabbit. *Mater Sci Eng C* 2013; 33: 317–326.
 79. Wolters L, Angrisani N, Seitz J, Helmecke P, Weizbauer A and Reifenrath J. Applicability of degradable magnesium

- LAE442 alloy plate-screw-systems in a rabbit model. *Biomed Eng* 2013; 58. DOI: 10.1515/bmt-2013-4059
80. Simon SR. *Orthopaedic basic science*. Rosemont, IL: Amer Academy of Orthopaedic, 1994.
 81. Ford JL, Robinson DE and Scammell BE. The fate of soft callus chondrocytes during long bone fracture repair. *J Orthop Res* 2003; 21: 54–61.
 82. Pauwels F. Eine neue Theorie über den Einfluß mechanischer Reize auf die Differenzierung der Stützgewebe. *Z Anat Entwicklungsgesch* 1960; 121: 478–515.
 83. Gu XN, Xie XH, Li N, Zheng YF and Qin L. In vitro and in vivo studies on a Mg-Sr binary alloy system developed as a new kind of biodegradable metal. *Acta Biomater* 2012; 8: 2360–2374.
 84. Song J, Kim J, Woo H-M, et al. Repair of rabbit radial bone defects using bone morphogenetic protein-2 combined with 3D porous silk fibroin/ β -tricalcium phosphate hybrid scaffolds. *J Biomater Sci Polym Ed* 2018; 29: 716–729.
 85. Cipitria A, Lange C, Schell H, et al. Porous scaffold architecture guides tissue formation. *J Bone Miner Res* 2012; 27: 1275–1288.
 86. Klenke FM, Liu Y, Yuan H, Hunziker EB, Siebenrock KA and Hofstetter W. Impact of pore size on the vascularization and osseointegration of ceramic bone substitutes in vivo. *J Biomed Mater Res A* 2008; 85: 777–786.
 87. Karageorgiou V and Kaplan D. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials* 2005; 26: 5474–5491.
 88. Grau M, Seiler C, Roland L, et al. Osteointegration of porous poly- ϵ -caprolactone-coated and prevascularized magnesium implants in critically sized calvarial bone defects in the mouse model. *Materials* 2018; 11: 6.
 89. Nuss KM and von Rechenberg B. Biocompatibility issues with modern implants in bone - a review for clinical orthopedics. *Open Orthop J* 2008; 2: 66–78.
 90. Cheng MQ, Wahafu T, Jiang GF, et al. A novel open-porous magnesium scaffold with controllable microstructures and properties for bone regeneration. *Sci Rep* 2016; 6: 24134.
 91. Pawelec K and Planell JA. *Bone repair biomaterials: regeneration and clinical applications*. Duxford: Woodhead Publishing, 2019.
 92. Mavrogenis AF, Dimitriou R, Parvizi J and Babis GC. Biology of implant osseointegration. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2009; 9: 61–71.
 93. Bracht K, Angrisani N, Seitz J-M, Eifler R, Weizbauer A and Reifenrath J. The influence of storage and heat treatment on a magnesium-based implant material: an in vitro and in vivo study. *Biomed Eng Online* 2015; 14: 1–17.

IV. DISKUSSION

Der ideale Knochenersatz sollte eine gute Biokompatibilität und gute mechanische Eigenschaften aufweisen, die Knochenbildung fördern und im idealsten Falle degradieren, ohne dabei toxisch auf den Organismus zu wirken. Diese Anforderungen werden durch die Eigenschaften des Biomaterials Mg größtenteils abgedeckt, sodass das Augenmerk im Bereich der Knochenersatzforschung wieder vermehrt auf die Entwicklung von Mg und seinen Legierungen fiel (Claes 1992, Zhao et al. 2017, Wu et al. 2019).

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die *In-vivo*-Untersuchung von keilförmigen offenporigen Scaffolds der Magnesiumlegierung LAE442 mit definierten interkonnektierenden Poren in der partiell belasteten Kaninchentibia im Sinne einer aufklappenden Korrekturosteotomie.

In vorhergehenden Studien wurden bis dato lediglich kleindimensionierte, zylindrische Scaffolds aus LAE442 mit interkonnektierenden Poren im Kaninchenfemur untersucht, wobei vielversprechende Ergebnisse erhoben wurden (Kleer et al. 2019, Augustin et al. 2020, Witting et al. 2020, Kleer-Reiter et al. 2021, Augustin et al. 2022). In dieser Studie wurde dieses Material daraufhin in größerer Dimension im stärker gewichtstragenden Knochen evaluiert. Weiterhin erfolgte in dieser Arbeit die erste Beschreibung des verwendeten Operationsmodells einer aufklappenden Korrekturosteotomie im Kaninchenmodell.

Die verwendete Mg-Legierung LAE442 beinhaltet Al, welches innerhalb der Mg-Forschung häufig Anwendung gefunden hat und als eines der wichtigsten Legierungskomponenten angesehen wird (Verbrugge 1934, McBride 1938, Kaese 2002). Ein Korrosionsschutz ist bei einem Gehalt von 1 – 9 Ma.-% Al gegeben, wobei sich der Korrosionsschutz mit steigendem Al-Gehalt erhöht (Kaese 2002, Witte et al. 2005). Zusätzlich hat Al einen positiven Effekt auf die Festigkeit und Härte der Legierung und verbessert die Gießbarkeit (Avedesian & Baker 1999). Jedoch wird Al oft kritisch betrachtet, da es kein Bestandteil des Stoffwechsels von Säugetieren ist (Shils & Shike 2006). Außerdem können Al-Ionen neurotoxisch sein und werden mit Gehirnerkrankungen wie beispielsweise Alzheimer und Parkinson assoziiert (Ganrot 1986). Einige Studien berichten von einer Al-induzierten Osteomalazie durch eine direkte toxische Wirkung auf die Osteoblasten (Zhu et al. 1990, Boyce et al. 1992, Avedesian & Baker 1999). In den vergangenen Jahren wurden verschiedene Mg-Legierungen mit Al untersucht (Witte et al. 2007, Thomann et al. 2009). Witte et al. (2007) (Witte et al. 2007) erkannten keine Anzeichen von Osteomalazie nach sechsmonatiger Untersuchung der Mg-Legierung AZ91 mit einem vergleichsweise hohen Anteil an Al (9 Ma.-% Aluminium). Auch

in histologischen Studien mit LAE442- und LANd442-Legierungen wurde keine Störungen der Knochenmineralisierung nachgewiesen (Witte et al. 2005, Hampp et al. 2012). Weiter wurde in einem Hundemodell die schnelle Ausscheidung von intravenös verabreichtem Al-Chlorid über den Urin nachgewiesen, wobei ein Drittel des Al nach 2 Stunden bereits eliminiert war (Kovalchik et al. 1978). Die Legierung LAE442 enthält zudem Lithium, welches die Korrosion weiter verringert und die Duktilität verbessert (Haferkamp et al. 2001, Kaese 2002). Lithium ist im Organismus in geringen Mengen vorhanden, ist jedoch nicht essentiell und seine biologische Funktion ist bis heute ungeklärt. Lithiumsalze werden in der Medizin in der Psychiatrie bei depressiven Erkrankungen eingesetzt. Jedoch kann es durch eine Überdosis an Lithium zu Übelkeit, Erbrechen, Tremor, Herzrhythmusstörungen bzw. Herzstillstand kommen (McIntyre et al. 2001). Da in LAE442 lediglich 4 Ma.-% Lithium enthalten sind, kann dennoch von einer guten Biokompatibilität dieses Materiales ausgegangen werden.

Seltene Erden, welche ebenso in geringen Mengen (2 Ma.-%) in LAE442 enthalten sind, erhöhen den Korrosionswiderstand und die Stabilität von Mg weiter (Wu et al. 2005, Willbold et al. 2015). Die Einzelelemente der seltenen Erden variieren abhängig von ihrer Herkunft in ihrer Zusammensetzung, wobei sie normalerweise reich an Cerium, Neodym und Lanthan sind (Witte et al. 2007). Inwieweit seltene Erden eine Toxizität aufweisen, ist aktuell noch nicht abschließend geklärt, jedoch sind sie in der Anwendung als Legierungselement in diesen geringen Mengen akzeptabel (Song 2007, Willbold et al. 2015). Sie werden über den Urin ausgeschieden oder mittels phagozytotischer Zellen in Leber und Milz abgebaut (Hirano & Suzuki 1996).

Wie bereits in anderen Studien beschrieben (Witte et al. 2006, Thomann et al. 2009, Angrisani et al. 2016), wiesen die Scaffolds der Mg-Legierung LAE442 auch in der vorliegenden Studie allgemein eine gute klinische Verträglichkeit auf. Jedoch zeigte die Mehrheit der Tiere im postoperativen Verlauf eine gering- bis mittelgradige Lahmheit, ohne jedoch ein gestörtes Allgemeinbefinden aufzuweisen. Diese Lahmheit kann auf verschiedene Ursachen zurückgeführt werden. Als Hauptursache kann der große operative Eingriff einer aufklappenden Korrekturosteotomie angeführt werden. Als weitere Gründe können Ansammlung von Gas im umliegenden Gewebe (Emphyseme) sowie Serome bei einigen Tieren genannt werden. In Folge der Punktion von Gas und Flüssigkeit im umliegenden Gewebe bei Tieren mit Druckschmerz und mittelgradiger Lahmheit in Woche 2 wurde eine Verbesserung der Lahmheit gesehen. Im weiteren Zeitverlauf kam es zu keiner weiteren gravierenden

Gasbildung. Lokale Akkumulationen von Gas entstehen, wenn das gebildete Gas insuffizient vom umliegenden Gewebe und den Blutgefäßen abtransportiert wird (Witte et al. 2008, Wu et al. 2019). Ein möglicher Zusammenhang zwischen der Gasbildung und der Entstehung von Lahmheit wurde in anderen Studien nicht beobachtet. So untersuchten Wu et al. (2019) wie auch Zhang et al. (2018) Mg-Legierungen in einem 15 mm großen Ulnadefekt im Kaninchenmodell und punktierten zwar das entstandene Gas ab, berichteten jedoch nicht über Lahmheiten der Tiere (Zhang et al. 2018, Wu et al. 2019). Auch Witte et al. (2005) erkannten nach Implantation verschiedener Mg-Pins in Meerschweinchenfemora Gasansammlungen ohne Entstehung klinischer Symptome (Witte et al. 2005). Erdmann et al. (2010) setzten Schrauben auf Mg-Basis in Kaninchtibiae ein und beobachteten trotz großer Gasblasen keine Lahmheit der Tiere (Erdmann et al. 2010). In der eigenen Studie muss beachtet werden, dass einige Tiere trotz des Auftretens großer Gasblasen kaum bis gar keine klinischen Symptome zeigten, sodass das entstandene Gas als Hauptursache für Lahmheit und Schmerz exkludiert werden kann. Die entstandenen Serome sind vermutlich Folge einer Reizung der Unterhaut mit dem unterliegenden Gewebe sowie einer OP-bedingten Wundhöhle, wie es von einigen Autoren auch beobachtet wurde (Baroudi & Ferreira 1998, Garrett et al. 2010, Lalk et al. 2010). Ein einzelnes Tier zeigte bis zum Studienende eine geringgradige Lahmheit bei ungestörtem Allgemeinbefinden. Diese bestehende Lahmheit könnte möglicherweise auf eine zu schräg gesetzte Schraube proximal des Osteotomiespaltes zurückgeführt werden.

Zur Beurteilung des Degradationsverhaltens wurden Dichte und Volumen aller Scaffolds beider Beschichtungen mit Hilfe von μ CT-Untersuchungen nach manuellem Konturieren der Scaffolds unter Zuhilfenahme eines materialspezifischen Thresholds für LAE442 ermittelt. Dieser Threshold (LAE442: 146) wurde in vorhergehenden Studien bestimmt (Kleer et al. 2019, Augustin et al. 2020, Witting et al. 2020). Mit Hilfe hochauflösender Röntgenmikroskopaufnahmen wurde das Volumen der Scaffolds *prae* und *post implantationem* zusätzlich bestimmt. Die Analysen zeigten einen nur sehr langsamen Abbau des Keiles mit einer geringen Volumen- und Dichtereduktion im Zeitverlauf. Dieses Verhalten weist auf eine sehr langsame Degradation dieses Materiales hin und entspricht den Beobachtungen der vorausgegangenen Studien (Kleer et al. 2019, Augustin et al. 2020, Witting et al. 2020). Auch histomorphometrisch wurde die langsame Degradation in der vorliegenden Studie bestätigt. In den Röntgenmikroskopuntersuchungen konnte ein unterschiedliches Ausgangsvolumen der Scaffolds nachgewiesen werden. Diese Differenzen können auf das Herstellungsverfahren der Keile zurückgeführt werden, welches sich in dieser Größendimension und mit genormten Poren im verwendeten Feingußverfahren als diffizil erwies (Julmi et al. 2019). Beim Vergleich beider

Beschichtungen fiel auf, dass die MgF₂-Scaffolds einen insgesamt stärkeren Volumenverlust zeigten als die CaP-Scaffolds. Julmi et al. (2019) machten bei *In-vitro*-Untersuchungen die gleiche Beobachtung, wobei kleindimensionierte poröse LAE442-Zylinder mit einfacher MgF₂-Beschichtung schneller degradierten als doppelt beschichtete Zylinder mit MgF₂- und CaP-Beschichtung (Julmi et al. 2019).

Mittels μ CT, Röntgen, Röntgenmikroskopie und Histologie zeigte sich eine verstärkte Degradation mit entsprechendem Formverlust bei insgesamt 14/40 Scaffolds beider Beschichtungen aller Wochengruppen. In den REM/EDX-Analysen wurde bei diesen Scaffolds im Vergleich zu den Scaffolds, die ihre Form bis zum entsprechenden Studienende beibehielten (26/40), größere Präzipitate von Al und seltenen Erden festgestellt. Durch diese mikrostrukturelle Differenz (inhomogene Verteilung der Legierungselemente) wurde hierbei vermutlich eine vermehrte Korrosion induziert, wie es in der Literatur beschrieben wurde (Song & Atrens 1999, Huehnerschulte et al. 2011, Gartzke et al. 2019). Diese Beobachtung widerspricht den Ergebnissen der kleindimensionierten LAE442-Zylinder der vorhergehenden Studien, die ihre ursprüngliche Form bis Woche 36 beibehielten und in denen keine Präzipitate der Legierungselemente gefunden wurden (Kleer et al. 2019, Augustin et al. 2020, Witting et al. 2020, Kleer-Reiter et al. 2021). Jedoch muss beachtet werden, dass diese Zylinder an einem anderen Lokus eingesetzt wurden (*Trochanter major ossis femoris*) und eine völlig andere Geometrie und Größendimension aufwiesen. Aufgrund der vergrößerten Oberfläche der in der eigenen Studie verwendeten Scaffolds im Vergleich zu den kleindimensionierten Zylindern könnte sich gemäß Kopp et al. (2019) die Degradationsgeschwindigkeit verstärkt haben (Kopp et al. 2019). Denkena et al. (2013) lieferten eine weitere mögliche Erklärung für dieses inhomogene Degradationsmuster der Scaffolds, welche im belasteten Kaninchenknochen untersucht wurden (Denkena et al. 2013). Demnach könnte es durch erhöhten Druckstress zu einer höheren Korrosionsrate bei den Scaffolds gekommen sein, währenddessen unter Zugbelastung im Allgemeinen die Korrosionsrate vermindert wird (Denkena et al. 2013). Durch die physiologische Anatomie einer Kaninchen Tibia ist anzunehmen, dass ein asymmetrischer Stress auf die Scaffolds gewirkt hat, sodass lokal verschiedene Korrosionsraten auftreten konnten. Die stabilisierende Platte könnte außerdem den Druckstress abgefangen haben.

Röntgenologisch zeigte sich in den ersten postoperativen Wochen eine Aufhellung im proximalen und distalen Osteotomiespalt zum Scaffold hin. Hierbei könnte es sich gemäß Muhr (1997) um eine physiologische Knochennekrose von wenigen Millimetern handeln, welche im Zuge einer indirekten Frakturheilung aufgrund einer mangelnden Vaskularisation im

Defektbereich entsteht (Muhr 1997). Diese Aufhellung könnte in der vorliegenden Studie jedoch auch im Zusammenhang mit dem gebildeten Gas stehen, sodass das Kallusnetzwerk verdrängt wurde und so das Bild eines reduzierten Knochen-Scaffold-Kontaktes erzeugt wurde. In der Verwendung der kleindimensionierten LAE442-Zylinder wurde dieses Verhalten nicht gesehen (Kleer et al. 2019, Augustin et al. 2020, Witting et al. 2020). Diese Beobachtung muss durch weitere Untersuchungen geklärt werden.

In den μ CT-Scans und den Röntgenaufnahmen der eigenen Studie wurde die erste Kallusbildung bereits ab Woche 2 gesehen und nahm im Zeitverlauf stark zu. Dieser ausgeprägte Kallus war ebenfalls gut in den histologischen Schlifften zu erkennen. Diese Kallusbildung ist positiv zu bewerten, da sie gemäß der Literatur eine hohe Heilungsfähigkeit des Knochens anzeigt (Einhorn & Gerstenfeld 2015, Féron & Mauprivez 2016). Weiterhin kann die starke Kallusbildung ihre Ursache in der osteogenen Potenz von Mg haben (Zreiqat et al. 2002, Revell et al. 2004, Witte et al. 2005, Mueller et al. 2008, Wu et al. 2019). So wurde auch eine ausgeprägte Kallusbildung in der Verwendung von vier verschiedenen Mg-Legierungen im Meerschweinchen aufgezeigt (Witte et al. 2005). Außerdem muss das Kallusgewebe an einer Defektstelle entsprechend ausgeprägt sein, um eine adäquate Stabilität zu erreichen (LaStayo et al. 2003). Auch Wu et al. (2019) sowie auch Zhang et al. (2018) erkannten nach Einsetzen verschiedener Mg-Legierungen in einen 15 mm großen Ulnadefekt im Kaninchenmodell eine frühe Kallusbildung (Zhang et al. 2018, Wu et al. 2019). In der vorliegenden Studie war auffällig, dass sich die erste Kallusbildung vor allem im Bereich des lateralen Kortex zeigte. Dieses Phänomen ist auch beim Menschen im Rahmen aufklappender Korrekturosteotomien ohne Verwendung eines Implantates bekannt (Wade et al. 2020). Des Weiteren kann auch die Stabilisierung mittels Platte auf dem medialen Kortex in der vorliegenden Studie als Ursache für die vergleichsweise geringere Kallusbildung medial und der starken Kallusbildung lateral genannt werden. So sahen auch Wieding et al. (2015) diese Erscheinung in der Verwendung von Titaniumscaffolds mit interkonnektierenden Poren in 20 mm großen Metatarsusdefekten mit medial platzierter Platte im Schafsmodell (Wieding et al. 2015). Tian et al. (2018) erkannten ebenfalls dieses Phänomen in der Verwendung von Mg-Schrauben und Titaniumplatten in Tibiaosteotomien im Kaninchenmodell (Tian et al. 2018).

Im μ CT-Scan zeigte sich in der eigenen Untersuchung bis Woche 12 eine bessere Überbrückung des Osteotomiespaltes bei Scaffolds mit CaP-Beschichtung, ab Woche 16 bei den Scaffolds mit alleiniger MgF₂-Beschichtung. Ein Knochendefekt gilt als überbrückt, wenn sich das Knochengewebe auf einer Seite des Kortex mit dem Knochengewebe auf der anderen

Seite vereinigt und so die mechanische Kontinuität wieder hergestellt wird (Oryan et al. 2015, Kuroiwa et al. 2019). Die anfänglich besseren Ergebnisse bezüglich der CaP-Beschichtung können mit dem osteokonduktiven Einfluss der freiwerdenden Calciumionen begründet werden (Thomann et al. 2009, Wang et al. 2019). Die MgF₂-Scaffolds zeigten im Vergleich zu doppelt beschichteten CaP-Scaffolds insgesamt ein vergleichsweise stärkeres Degradationsverhalten, welche mit der einfacheren Beschichtung erklärt werden kann und bereits in einer *In-vitro*-Vorstudie beobachtet wurde (Julmi et al. 2019). Aufgrund des stärkeren Degradationsverhaltens konnten bei MgF₂-Scaffolds vermehrt Mg-Ionen frei werden. Da Mg-Ionen eine starke osteogene Potenz aufweisen (Zreiqat et al. 2002, Revell et al. 2004, Witte et al. 2005, Mueller et al. 2008, Wu et al. 2019), könnte es zur vergleichweisen besseren Überbrückung der MgF₂-Scaffolds ab Woche 16 gekommen sein. Dies lässt auf einen schwindenden Einfluss einer zusätzlichen CaP-Beschichtung im Zeitverlauf schließen. Auch Janning et al. (2010) fanden heraus, dass Korrosionsprodukte von in dieser Studie verwendeten Mg-Zylindern ein verstärktes Knochenwachstum um das Material verursachen (Janning et al. 2010). Wang et al. (2019) untersuchten Mg-Scaffolds mit CaP-, MAO- und Strontiumphosphatbeschichtung und konnten nachweisen, dass die Scaffolds mit CaP-Beschichtung zwar die geringste Korrosionsrate aufwiesen, sich jedoch auch weniger neuer Knochen um diese Scaffolds bildete im Vergleich zu den anderen beiden Beschichtungen. Sie stellten die Hypothese auf, dass der Grund hierfür in der vergleichsweise reduzierten Menge an freiwerdenden Mg-Ionen lag (Wang et al. 2019).

In der vorliegenden Studie war histologisch neben der periostalen Kallusbildung auch eine endostale Kallusbildung in allen Untersuchungszeiträumen sichtbar. Der endostale Kallus nahm im Gegensatz zum periostalen Kallus im Zeitverlauf immer weiter zu und zeigte sich vermehrt distal des Scaffolds. Im Markraum wurden proximal des Scaffolds im Vergleich zu distal mehr Gasansammlungen im histologischen Bild wie auch in den μ CT-Aufnahmen gesehen. Auch Bondarenko et al. (2013) wie auch Rössig et al. (2014, 2015) berichteten von intramedullär vorkommenden Gasansammlungen nach Implantation von LAE442-Implantaten (Bondarenko et al. 2013, Rössig et al. 2014, Rössig et al. 2015). Es kann in der vorliegenden Studie angenommen werden, dass das entstandene Gas nach proximal aufstieg. Das Auftreten von Gasansammlungen entsteht durch eine verstärkte initiale Freisetzung von Wasserstoff infolge der Degradation von Mg (Song & Atrous 2003, Hampp et al. 2013). Da die Gesamtgasmenge in der vorliegenden Studie im Zeitverlauf nicht weiter anstieg, kann davon ausgegangen werden, dass sich ein Gleichgewicht zwischen Gasbildung und Gasresorption einstellte. Es ist anzunehmen, dass das entstandene Gas aufgrund seiner Lokalisation im

Markraum nicht entsprechend abtransportiert werden konnte. In den histologischen Schlifften zeigte sich im Markraum neben Gasblasen das Vorhandensein von Knochenmarksgewebe mit Adipozyten und Zellen verschiedener Stadien der myeloischen Reihe, wobei insgesamt bei MgF₂-beschichteten Scaffolds mehr Knochenmarksgewebe vorzufinden war als bei CaP-beschichteten Scaffolds. Auffällig war außerdem, dass distal des Scaffolds beider Beschichtungen insgesamt mehr Knochenmarksgewebe vorzufinden war im Vergleich zu proximal. Entsprechend der Studie von Rössig et al. (2015) (Rössig et al. 2015) wurde in der vorliegenden Studie der Markraum nie vollständig mit Knochenmark ausgefüllt, da die Regenerierung des Knochenmarkes vermutlich aufgrund der Gasentstehung verhindert wurde. Dies zeigt eine Limitation der eigenen Studie auf, da keine Kontrollgruppe, wie beispielsweise ein vergleichbares Titaniumscaffold, verwendet wurde. Hierbei hätte die Problematik mit der Gasentstehung exkludiert werden können.

Histologisch wurde in der vorliegenden Studie in Woche 6 und 12 mehr periostaler als endostaler Kallus nachgewiesen. Diese Beobachtung entspricht jener von Hampp et al. (2013), welche nach Implantation von Zylindern aus LAE442 und LANd442 in den Intramedullärraum von Kaninchentibiae nach 4 und 8 Wochen ebenfalls eine ausgeprägtere periostale Kallusbildung im Vergleich zur endostalen Kallusbildung beobachteten (Hampp et al. 2013). Der Knochendefekt in dieser Studie verheilte über eine sekundäre Knochenheilung, die durch endostalen und periostalen Kallus charakterisiert war und aufgrund der Defektgröße gemäß der Literatur auch erwartet wurde (Stürmer 1987). Im Zeitverlauf zeigte sich in der vorliegenden Studie die Umwandlung des Geflechtknochens in Lamellenknochen, was im Zuge der sekundären Knochenheilung ebenfalls erwartet wurde und mit der Abnahme des periostalen Kallus einhergeht (Schindeler et al. 2008, Herten et al. 2019, Lanske et al. 2019), wie es auch in der eigenen Studie der Fall war. Histologisch war das entstandene Kallusgewebe zu allen Untersuchungszeiträumen physiologisch, wie es von Claes et al. (2018) beschrieben wird (Claes et al. 2018).

In Woche 6 zeigte sich in der eigenen Studie bei insgesamt 9 Tibiae am lateralen Kortex im Bereich der Scaffoldspitze Knorpelgewebe. Prinzipiell versucht der Körper hierbei, einen Knochendefekt über enchondrale Ossifikation zu überbrücken (Bissinger et al. 2017, Förster et al. 2017). Dies scheint auch bei den Kaninchen in der eigenen Studie der Fall gewesen zu sein. Eine enchondrale Ossifikation verläuft allgemein über die Stufen Hämatombildung, Entzündung, Angiogenese, Knorpelbildung, Knorpelkalzifizierung, Knorpelentfernung, Knochenbildung und abschließendes Knochenremodelling (Oryan et al. 2015). Auch Zhang et

al. (2018) sahen in der Histologie von Kaninchenulnaosteotomien mit implantierten Mg-Scaffolds viele Chondrozyten im Kallus nach 4 und 8 Wochen Implantationszeit (Zhang et al. 2018). Gemäß Oryan et al. (2015) werden durch eine enchondrale Ossifikation bessere biomechanische Eigenschaften des Knochens im Vergleich zu einer desmalen Ossifikation erreicht (Oryan et al. 2015). Laut Pauwels (1960) entsteht auf der Druckseite einer Fraktur eine massivere Kallusbildung mit primär enchondraler Ossifikation (Pauwels 1960), was in dieser Studie ebenfalls der Fall gewesen sein könnte. Das Knorpelgewebe im Kallus dient gemäß der Literatur als Führungsschablone für die enchondrale Ossifikation und sorgt vorab für die biomechanische Stabilität des Defektes (Kostenuik & Mirza 2017).

Die Bildung von Cracks auf der Oberfläche der Scaffolds wurde bereits ab Woche 6 im Bereich der Scaffoldspitze gesehen. Im Zeitverlauf nahm die Crackbildung zu, wobei diese in MgF₂-im Vergleich zu den zusätzlich CaP-beschichteten Scaffolds verstärkter auftrat, was im Zusammenhang mit der stärkeren Degradation der einfach beschichteten MgF₂-Scaffolds stehen könnte. Auch Ullmann et al. (2013) beobachteten eine Crackbildung bei LAE442-Pins implantiert in den Intramedullärraum von Kaninchentibiae nach 27 Wochen Implantationszeit (Ullmann et al. 2013). Ebenso konnten Müller et al. (2008) Cracks auf der Oberfläche von LAE442 nachweisen und die Autoren brachten diese mit der Gasentstehung während des Degradationsprozesses in Verbindung (Mueller et al. 2008), was auch in dieser Studie der Fall gewesen sein könnte.

In allen histologischen Schliffen waren zu jedem Untersuchungszeitpunkt geringe Mengen an Granulationsgewebe mit Fibroblasten in direkter Umgebung des Scaffolds erkennbar und histomorphometrisch messbar. Auch Rössig et al. (2014, 2015) erkannten histologisch verschiedene Mengen an fibrösem Gewebe im Markraum um LAE442-Implantate. Sie vermuteten, dass das kontinuierliche Vorkommen von Gas bzw. die Degradation der Mg-Legierung die Entstehung dieses fibrösen Gewebes veranlasste (Rössig et al. 2014, Rössig et al. 2015). Laut einigen Autoren ist fibröses Gewebe in der Nähe von implantierten Materialien unerwünscht, da es an Fremdkörperreaktionen beteiligt sein kann und möglicherweise negative Effekte auf den Knochen aufweist (De Man et al. 2005, van der Pol et al. 2010). Dahingegen behaupten andere Autoren, dass Granulationsgewebe mit enthaltenen Fibroblasten aufgrund der natürlichen Reaktion des Körpers auf einen eingesetzten Fremdkörper als physiologisch zu betrachten sei (Gu et al. 2012). Weiterhin entsteht fibröses Gewebe auch nach Implantation konventioneller Implantate und eine moderate Menge an fibrösem Gewebe spricht für eine beginnende Integration des Materials (Anderson et al. 2008, Suska et al. 2008). Laut Schmitz

& Hollinger (1986) werden außerdem große Knochendefekte ohne Knochenersatzstoffe vorrangig über fibröses Gewebe geheilt (Schmitz & Hollinger 1986). Da in allen histologischen Schliffen dieser Studie nur geringgradige Mengen an fibrösem Gewebe vorhanden waren, kann von einer guten Biokompatibilität ausgegangen werden.

In den letzten Jahren wurden vermehrt offenporige Scaffolds aus Mg-Legierungen als Knochenersatzmaterial untersucht. Diese offenporigen Scaffolds sollen das Knocheneinwachsverhalten und auch die Degradation verbessern (Julmi et al. 2019, Kleer et al. 2019, Augustin et al. 2020, Maier et al. 2020, Witting et al. 2020). Augustin et al. (2020, 2022) beobachteten bessere Ergebnisse hinsichtlich der Osseointegration von LAE442-Zylindern, wenn diese eine Porengröße von 500 µm im Vergleich zu 400 µm aufwiesen (Augustin et al. 2020, Augustin et al. 2022). In Anlehnung an diese Studie wurden in der vorliegenden Arbeit ebenfalls Poren mit einer Größe von 500 µm verwendet. In der vorliegenden Studie konnte in den Poren im Scaffoldzentrum erst in Woche 36 Osteoid und Granulationsgewebe nachgewiesen werden. Reifer Knochen wurde zu keinem Zeitpunkt in den Poren beobachtet. In einer Studie von Grau et al. (2018) wurde ein poröses Knochenersatzmaterial aus reinem Mg mit einer Poly-ε-Caprolacton-Beschichtung in einem 3 x 3 mm großen Schädeldachdefekt im Mäusemodell untersucht und auch hier konnte nach 12 Wochen kein Knochengewebe in den Poren nachgewiesen werden (Grau et al. 2018). Die Autoren vermuteten, dass das entstandene Gas das Einwachsen von Knochengewebe verhindert haben könnte, was auch in der vorliegenden Studie der Fall gewesen sein könnte. Dagegen erkannten Kleer-Reiter et al. (2021) und Augustin et al. (2022) sog. Osteoid-like Gewebe (schlecht mineralisierte Matrix mit teilweise leeren Osteozytenlakunen) in den Poren von LAE442-Zylindern nach 6, 12, 24 und 36 Wochen Implantationszeit im Kaninchenmodell (Kleer-Reiter et al. 2021, Augustin et al. 2022).

In allen histologischen Schliffen wurden einige Makrophagen nachgewiesen, deren Anzahl im Zeitverlauf etwas zunahm. Nach 24 bzw. 36 Wochen zeigten sich auch vereinzelt Fremdkörperriesenzellen. Makrophagen und Fremdkörperriesenzellen sind laut Literatur aufgrund der Degradation des Scaffolds und folgender Resorption der anfallenden Korrosionsprodukte vorzufinden (Lalk et al. 2013, Angrisani et al. 2016). Sie treten immer im Zuge einer Fremdkörperreaktion auf implantierte biodegradierbare Materialien auf und werden als physiologisch erachtet, solange ihre Anzahl nicht überhandnimmt (Anderson 2001, Nuss & von Rechenberg 2008, Kleer-Reiter et al. 2021). Auch bei *In-vivo*-Untersuchungen zu intramedullär implantierten LAE442-Pins wurden nach 3,5 Jahren immer noch Makrophagen

und Fremdkörperriesenzellen nachgewiesen (Angrisani et al. 2016). Die Autoren führen dieses Auftreten auf die noch immer stattfindende Degradation und die stetige Entfernung der Korrosionsprodukte zurück und schätzen das Ausmaß der zellulären Reaktion als akzeptabel ein.

Bei allen Scaffolds war eine moderate Anzahl an Blutgefäßen zu sehen, deren Anzahl im Zeitverlauf zunahm. In Woche 36 konnte in MgF₂-beschichteten Scaffolds eine vergleichsweise bessere Vaskularisation zu CaP-beschichteten Scaffolds nachgewiesen werden. Anhand der Literatur zieht eine stärkere Vaskularisation eine verbesserte Nährstoffversorgung und so auch eine bessere Osseointegration nach sich (Karageorgiou & Kaplan 2005, Mavrogenis et al. 2009, Cheng et al. 2016, Pawelec & Planell 2019), welche sich durch die bessere Osseointegration der MgF₂-Scaffolds auch in dieser Studie bestätigte.

Entsprechend der Studien von Kleer-Reiter et al. (2021) und Augustin et al. (2022), welche kleindimensionierte Zylinder aus LAE442 im Kaninchenmodell untersuchten (Kleer-Reiter et al. 2021, Augustin et al. 2022), zeigte sich in den REM-Aufnahmen der eigenen Studie eine dunkle Degradationsschicht am Scaffoldrand, welche sich mit zunehmender Implantationszeit in das Scaffoldinnere ausdehnte. EDX-Analysen zeigten in der vorliegenden Studie das Vorhandensein von Mg, dessen Menge sich im Zeitverlauf reduzierte. Diese Reduktion der Mg-Menge während der *In-vivo*-Degradation von Mg konnten auch Wang et al. (2019) und Bracht et al. (2015) nachweisen (Bracht et al. 2015, Wang et al. 2019). In den EDX-Analysen wurden in der vorliegenden Studie auf der Oberfläche und in der Degradationsschicht der Scaffolds calcium- und phosphatreiche Regionen gemessen. Diese Calciumphosphate wurden bereits in diversen Studien zu Mg-Legierungen beobachtet und stellten, wie auch in dieser Studie, die Verbindung zwischen Scaffold und umliegenden Knochengewebe her (Witte et al. 2005, Thomann et al. 2010, Ullmann et al. 2013, Kleer-Reiter et al. 2021, Augustin et al. 2022).

Zusammenfassend zeigten die Scaffolds aus LAE442 sowohl mit einer einfachen MgF₂-Beschichtung sowie auch mit einer zusätzlichen CaP-Beschichtung eine gute klinische Verträglichkeit und eine sehr langsame Degradation. Histologisch wurde eine gute Überbrückung und Stabilisierung des Osteotomiespalt es sowie auch Einwachsverhalten des Knochens in das Scaffold gesehen, wobei vor allem an späteren Untersuchungszeitpunkten die MgF₂-Beschichtung eine bessere Überbrückung und vermehrte Knochen-Scaffold-Kontakte aufzeigte, sodass ein schwindender Einfluss der CaP-Beschichtung zu späteren Zeitpunkten angenommen werden kann. Jedoch erwies sich die CaP-Beschichtung als vorteilhaft während der ersten 12 Wochen innerhalb der wichtigen Phase der Knochenheilung. Die Scaffolds beider

Beschichtungen wiesen jedoch ein inhomogenes Degradationsmuster auf. Bereits *prae implantationem* konnten gewisse Differenzen zwischen den einzelnen Scaffolds aufgrund ihrer diffizilen Herstellung (Julmi et al. 2019) nachgewiesen werden. Außerdem konnte eine Akkumulation von Gas trotz einer zusätzlichen CaP-Beschichtung nicht verhindert werden. Um Mg-basierte Materialien im menschlichen Körper sicher zu verwenden, muss ihr Degradationsverhalten vorhersagbar und einstellbar sein (Kopp et al. 2019). Außerdem sollten sie im Körper ohne Auftreten klinisch sichtbarer Gasblasen degradieren (Bobe et al. 2013, Zhang et al. 2018). So muss das hier untersuchte Scaffold in dieser Größendimension und in dieser Materialzusammensetzung aufgrund des entstandenen und akkumulierten Gases und aufgrund des inhomogenen Degradationsverhaltens noch einmal überarbeitet werden.

Jedoch soll zum Schluss kurz angemerkt werden, dass LAE442 eine geringere Degradationsrate als WE43 aufweist, welche in Form einer Schraube bereits unter dem Namen MAGNEZIX® erfolgreich in der Humanmedizin im Bereich der *Hallux valgus* Operation angewendet wird (Windhagen et al. 2013).

V. ZUSAMMENFASSUNG

Die Magnesiumlegierung LAE442 zeigte sich in vorhergehenden *In-vitro* und *In-vivo* Untersuchungen in nicht belasteten kleineren Knochendefekten als vielversprechend. Ziel der vorliegenden Arbeit war die *In-vivo*-Untersuchung keilförmiger Scaffolds der Magnesiumlegierung LAE442 in größerer Dimension und mit interkonnektierenden Poren hinsichtlich ihrer Biokompatibilität, ihrer Osseointegration und ihres Degradationsverhaltens in stärker belasteten Knochendefekten. Dazu wurden 40 keilförmige Scaffolds (Höhe = 10 mm, Breite = 14 mm, Tiefe = 4,8 mm) aus der Magnesiumlegierung LAE442 im Feingußverfahren mit einer interkonnektierenden Porengröße von 500 µm hergestellt und anschließend mit einer einfachen MgF₂-Beschichtung oder einer MgF₂-Beschichtung mit zusätzlicher CaP-Beschichtung überzogen. Sie wurden im Rahmen einer aufklappenden Korrekturosteotomie in die rechte proximale Tibia von insgesamt 40 weiblichen adulten Zimmermann-Kaninchen für 6, 12, 24 und 36 Wochen implantiert. Im Zuge der Operation wurde mit einer Säge (Colibri II, DePuy Synthes®, Synthes GmbH, Oberdorf, Schweiz) und mit Hilfe einer Schablone ein der Größe des Scaffolds entsprechendes keilförmiges Knochenstück unter Erhaltung der Fibula herausgesägt und das Scaffold passgenau eingesetzt. Um den Keil in Position zu halten, wurde er anschließend durch eine speziell angefertigte T-Platte aus nichtresorbierbarem Kunststoff (9 x 31 mm, PEEK (Polyetheretherketon), RISystem AG, Landquart, Schweiz) und 6 Titanschrauben (3 proximal, 3 distal) (Cortex Screw Stardrive Ø 1,5mm, DePuy Synthes®, Synthes GmbH, Oberdorf, Schweiz) an der Tibia fixiert.

Alle Versuchstiere erhielten regelmäßige klinische, radiologische und *In-vivo*-µCT-Untersuchungen. Am Ende des Untersuchungszeitraumes wurden sie schmerzlos euthanasiert, um den Knochen-Scaffold-Verbund zu explantieren, in Formalin einzulegen und *Ex-vivo*-Analysen durchzuführen. Der Knochen-Scaffold-Verbund wurde zunächst mittels Röntgenmikroskop gescannt. Im Anschluss wurden die Proben histologisch mittels der Trenn-Dünnschliff-Technik nach Donath aufbereitet. An den ungefärbten Schliffen erfolgten REM- und EDX-Analysen. Danach wurden die Schliffe mit Toluidinblau gefärbt, um histologische und histomorphometrische Analysen zu ermöglichen.

Die Scaffolds beider Beschichtungen wiesen klinisch eine gute Verträglichkeit auf. Sie zeigten eine sehr langsame Degradation mit einer geringen Volumen- und Dichtereduktion. Es konnte jedoch trotz Verwendung von zwei verschiedenen Beschichtungen die Entstehung relativ großer Gasansammlungen, insbesondere zu Beginn, nicht verhindert werden. Im Vergleich der

Scaffolds beider Beschichtungen fiel weiterhin auf, dass die MgF_2 -Scaffolds einen insgesamt stärkeren Volumenverlust zeigten als die CaP-Scaffolds. *In-vivo*- μ CT, Röntgenmikroskopie, Röntgen und Histologie zeigten ein bei 14/40 Scaffolds verstärktes und sehr inhomogenes Degradationsverhalten. Die hergestellten Keile wiesen außerdem bereits vor Implantation eine gewisse Inhomogenität auf, was scheinbar zu einer inhomogenen Degradation führte. In den EDX-Analysen konnte eine inhomogene Verteilung der Legierungselemente nachgewiesen werden, welche die ungleichmäßige Degradation erklären könnte. Erste Kallusbildung wurde bereits ab Woche 2 gesehen und nahm im Zeitverlauf stark zu. Durch diese ausgeprägte Kallusbildung kam es schnell zur Stabilisierung des Defektes. Des Weiteren wurde eine endostale und periostale Kallusbildung zu allen Untersuchungszeitpunkten nachgewiesen sowie im Verlauf die Umwandlung des Geflechtknochens in Lamellenknochen im Rahmen der sekundären Knochenheilung. Im Vergleich der alleinigen MgF_2 - zur zusätzlichen CaP-Beschichtung zeigte letztere bis Woche 12 eine bessere Überbrückung des Osteotomiespaltes. Die reine MgF_2 -Beschichtung wies ab Woche 16 eine bessere Überbrückung des Osteotomiespaltes und eine stärkere Osseointegration im weiteren Zeitverlauf auf. Im Markraum wurden proximal des Scaffolds im Vergleich zum distalen Markraum mehr Gasansammlungen nachgewiesen, dahingegen war der distale Bereich vergleichsweise mit mehr Knochenmarksgewebe ausgefüllt. Histologisch war Granulationsgewebe und Osteoid zu allen Untersuchungszeitpunkten nachweisbar, jedoch erst ab Woche 36 in den Poren des Scaffoldzentrums. Weiterhin wurde auch eine akzeptable Anzahl an Makrophagen und Fremdkörperriesenzellen detektiert. Eine moderate Anzahl an Blutgefäßen, die im Zeitverlauf stetig zunahm, wurde ebenfalls nachgewiesen. In den REM-Aufnahmen zeigte sich eine dunkle Degradationsschicht, welche sich mit zunehmender Implantationszeit ins Scaffoldinnere ausdehnte. Die EDX-Analysen zeigten das Vorhandensein von Mg auf, dessen Menge sich im Zeitverlauf reduzierte. Außerdem wurden auf der Oberfläche und in der Degradationsschicht der Scaffolds calcium- und phosphatreiche Regionen gemessen, welche Verbindungen zwischen dem Scaffold und dem umliegenden Knochengewebe herstellten.

VI. SUMMARY

The magnesium alloy LAE442 showed promising results in *in vitro* and *in vivo* tests in non-weightbearing smaller bone defects. The aim of the present work was the *in vivo* investigation of wedge-shaped scaffolds of the magnesium alloy LAE442 in larger dimensions and with interconnecting pores with regard to their biocompatibility, their osseointegration and their degradation behavior in more pronounced weight-bearing bone defects. For this purpose, 40 wedge-shaped scaffolds (height = 10 mm, width = 14 mm, depth = 4.8 mm) were manufactured from the magnesium alloy LAE442 using investment casting with an interconnecting pore size of 500 μm and subsequently coated with a single MgF_2 coating or an MgF_2 coating with additional CaP coating. They were implanted in the right proximal tibia of a total of 40 adult female "Zimmermann" rabbits for 6, 12, 24, and 36 weeks as an open wedge corrective osteotomy. During surgery, a wedge-shaped piece of bone corresponding to the size of the scaffold was sawn out with a saw (Colibri II, DePuy Synthes®, Synthes GmbH, Oberdorf, Switzerland) with the help of a template, while preserving the fibula, and the scaffold was inserted with a precise fit. To hold the wedge in position, it was then fixed to the tibia by a custom-made T-plate made of non-absorbable plastic (9 x 31 mm, PEEK (polyetheretherketone), RISystem AG, Landquart, Switzerland) and 6 titanium screws (3 proximal, 3 distal) (Cortex Screw Stardrive \O 1.5mm, DePuy Synthes®, Synthes GmbH, Oberdorf, Switzerland).

All experimental animals received regular clinical, radiological and *in vivo* μCT examinations. At the end of the observation period, they were painlessly euthanized for explantation of the bone-scaffold composite, immersion of the same in formalin, and *ex vivo* analyses thereof. The bone-scaffold composite was first scanned using an X-ray microscope. Subsequently, the specimens were prepared histologically using the Donath thin sectioning technique. SEM and EDX analyses were performed on the unstained sections. Afterwards, the sections were stained with toluidine blue to allow histological and histomorphometric analyses.

The scaffolds of both coatings were clinically well tolerated. They showed a very slow degradation with a low volume and density reduction. However, despite the use of two different coatings, the formation of relatively large gas accumulations, especially at the beginning, could not be prevented. Comparing the scaffolds of both coatings, it was further noticed that the MgF_2 scaffolds showed an overall greater volume loss than the CaP scaffolds. *In vivo* μCT , X-ray microscopy, radiography, and histology showed an increased and highly inhomogeneous degradation behavior in 14/40 scaffolds. The fabricated wedges also exhibited some

inhomogeneity even prior to implantation, apparently leading to inhomogeneous degradation. The EDX analyses showed an inhomogeneous distribution of the alloying elements, which could explain the irregular degradation. Initial callus formation was seen from week 2 and increased sharply over time. This pronounced callus formation resulted in rapid stabilization of the defect. Furthermore, endosteal and periosteal callus formation was seen at all time points during examination, as well as during the transformation of the woven bone into lamellar bone over time during the course of secondary bone healing. Comparing the MgF₂ and additional CaP coating, the latter showed better bridging of the osteotomy gap until week 12. The solely MgF₂-coated scaffolds showed better bridging of the osteotomy gap from week 16 and stronger osseointegration at later time points. More gas accumulation was detected in the medullary cavity proximal to the scaffold compared to the distal medullary cavity, whereas the distal area was comparatively filled with more bone marrow tissue. Histologically, granulation tissue and osteoid were detectable at all examination time points, but only from week 36 onward in the pores of the scaffold center. Furthermore, an acceptable number of macrophages and foreign body giant cells were also detected. A moderate number of blood vessels, which increased steadily over time, was also detected. SEM images showed a dark degradation layer that extended into the scaffold interior with increasing implantation time. EDX analyses revealed the presence of Mg, the amount of which decreased over time. In addition, calcium- and phosphate-rich regions were measured on the surface and in the degradation layer of the scaffolds, which established connections between the scaffold and the surrounding bone tissue.

VII. LITERATURVERZEICHNIS

Alvarez-Lopez, M., Pereda, M. D., Del Valle, J., Fernandez-Lorenzo, M., Garcia-Alonso, M., Ruano, O. A. & Escudero, M. (2010). "Corrosion behaviour of AZ31 magnesium alloy with different grain sizes in simulated biological fluids." Acta Biomaterialia **6**(5): 1763-1771.

An, Y. H. & Martin, K. L. (2003). Handbook of histology methods for bone and cartilage, New York, Springer.

Anderson, D. E., St-Jean, G., Richardson, D. C., De Bowes, R. M., Roush, J. K., Lowry, S. R., Toll, P. W., Aberman, H. M., Van Sickle, D. C. & Hoskinson, J. J. (1997). "Improved osseointegration of calcium phosphate-coated external fixation pins: Studies in calves." Acta Orthopaedica Scandinavica **68**(6): 571-576.

Anderson, J. M. (2001). "Biological responses to materials." Annual Review of Materials Research **31**(1): 81-110.

Anderson, J. M., Rodriguez, A. & Chang, D. T. (2008). „Foreign body reaction to biomaterials.“ Seminars in Immunology **20**(2): 86-100.

Angrisani, N., Reifenrath, J., Zimmermann, F., Eifler, R., Meyer-Lindenberg, A., Vano-Herrera, K. & Vogt, C. (2016). "Biocompatibility and degradation of LAE442-based magnesium alloys after implantation of up to 3.5 years in a rabbit model." Acta Biomaterialia **44**: 355-365.

Augustin, J., Feichtner, F., Waselau, A.-C., Julmi, S., Klose, C., Wriggers, P., Maier, H. J. & Meyer-Lindenberg, A. (2020). "Comparison of two pore sizes of LAE442 scaffolds and their effect on degradation and osseointegration behavior in the rabbit model." Journal of Biomedical Materials Research Part B: **108**(6): 1-13.

Augustin, J., Feichtner, F., Waselau, A.-C., Julmi, S., Klose, C., Wriggers, P., Maier, H. J. & Meyer-Lindenberg, A. (2022). "Effect of pore size on tissue ingrowth and osteoconductivity in biodegradable Mg alloy scaffolds." Journal of Applied Biomaterials & Functional Materials **20**: 22808000221078168.

Avedesian, M. M. & Baker, H. (1999). ASM specialty handbook: magnesium and magnesium alloys, Materials Park Ohio, ASM international.

Baino, F., Novajra, G. & Vitale-Brovarone, C. (2015). "Bioceramics and scaffolds: a winning combination for tissue engineering." Frontiers in Bioengineering and Biotechnology **3**(202): 1-17.

Baroudi, R. & Ferreira, C. A. A. (1998). "Seroma: how to avoid it and how to treat it." *Aesthetic Surgery Journal* **18**(6): 439-441.

Bartels, F. (2011). *Histomorphometrische Untersuchungen der Knochenstruktur am ovariectomierten Göttinger Minischwein zur Etablierung eines Großtiermodells zur Simulation der postmenopausalen Osteoporose*, Universität Göttingen.

Bernhardt, R., Scharnweber, D., Müller, B., Thurner, P., Schliephake, H., Wyss, P., Beckmann, F., Goebels, J. & Worch, H. (2004). "Comparison of microfocus-and synchrotron X-ray tomography for the analysis of osteointegration around Ti6Al4V implants." *European Cells & Materials* **7**(42): 42-51.

Bissinger, O., Kreutzer, K., Wolff, K. D., Wexel, G., Hapfelmeier, A., Pautke, C., Vogt, S., Michael Proding, P. & Tischer, T. (2017). "Does cefuroxime alter fracture healing in vivo? A micro-computertomographic, biomechanical, and histomorphometric evaluation using a rat fracture model." *Journal of Biomedical Materials Research Part B* **105**(8): 2282-2291.

Bobbe, K., Willbold, E., Morgenthal, I., Andersen, O., Studnitzky, T., Nellesen, J., Tillmann, W., Vogt, C., Vano, K. & Witte, F. (2013). "In vitro and in vivo evaluation of biodegradable, open-porous scaffolds made of sintered magnesium W4 short fibres." *Acta Biomaterialia* **9**(10): 8611-8623.

Bobyn, J. D., Mortimer, E. S., Glassman, A. H., Engh, C. A., Miller, J. E. & Brooks, C. E. (1992). "Producing and avoiding stress shielding: Laboratory and clinical observations of noncemented total hip arthroplasty." *Clinical Orthopaedics and Related Research (1976-2007)* **274**: 79-96.

Bondarenko, A., Angrisani, N., Meyer-Lindenberg, A., Seitz, J. M., Waizy, H. & Reifenrath, J. (2013). "Magnesium-based bone implants: immunohistochemical analysis of peri-implant osteogenesis by evaluation of osteopontin and osteocalcin expression." *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **102**(5): 1449-1457.

Bondarenko, A., Hewicker-Trautwein, M., Erdmann, N., Angrisani, N., Reifenrath, J. & Meyer-Lindenberg, A. (2011). "Comparison of morphological changes in efferent lymph nodes after implantation of resorbable and non-resorbable implants in rabbits." *BioMedical Engineering OnLine* **10**(32): 1-15.

Böstman, O. & Pihlajamäki, H. (2000). "Clinical biocompatibility of biodegradable orthopaedic implants for internal fixation: a review." *Biomaterials* **21**(24): 2615-2621.

Bouxsein, M. L., Boyd, S. K., Christiansen, B. A., Guldberg, R. E., Jepsen, K. J. & Müller, R. (2010). "Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography." *Journal of Bone and Mineral Research* **25**(7): 1468-1486.

Boyce, B., Byars, J., McWilliams, S., Mocan, M., Elder, H., Boyle, I. & Junor, B. (1992). "Histological and electron microprobe studies of mineralisation in aluminium-related osteomalacia." Journal of Clinical Pathology **45**(6): 502-508.

Bracht, K., Angrisani, N., Seitz, J.-M., Eifler, R., Weizbauer, A. & Reifenrath, J. (2015). "The influence of storage and heat treatment on a magnesium-based implant material: an in vitro and in vivo study." BioMedical Engineering OnLine **14**(92): 1-17.

Burchardt, H., Glowczewskie, F. & Enneking, W. (1977). "Allogeneic segmental fibular transplants in azathioprine-immunosuppressed dogs." Journal of Bone and Joint Surgery **59**(7): 881-894.

Campana, V., Milano, G., Pagano, E., Barba, M., Cicione, C., Salonna, G., Lattanzi, W. & Logroscino, G. (2014). "Bone substitutes in orthopaedic surgery: from basic science to clinical practice." Journal of Materials Science: Materials in Medicine **25**(10): 2445-2461.

Chen, Y., Song, Y., Zhang, S., Li, J., Zhao, C. & Zhang, X. (2011). "Interaction between a high purity magnesium surface and PCL and PLA coatings during dynamic degradation." Biomedical Materials **6**(2): 025005.

Cheng, M.-q., Wahafu, T., Jiang, G.-f., Liu, W., Qiao, Y.-q., Peng, X.-c., Cheng, T., Zhang, X.-l., He, G. & Liu, X.-y. (2016). "A novel open-porous magnesium scaffold with controllable microstructures and properties for bone regeneration." Scientific Reports **6**(1): 1-14.

Claes, L. (1992). "Mechanical characterization of biodegradable implants." Clinical Materials **10**(1-2): 41-46.

Claes, L., Maurer-Klein, N., Henke, T., Gerngross, H., Melnyk, M. & Augat, P. (2006). "Moderate soft tissue trauma delays new bone formation only in the early phase of fracture healing." Journal of Orthopaedic Research **24**(6): 1178-1185.

Claes, L., Meyers, N., Schulke, J., Reitmaier, S., Klose, S. & Ignatius, A. (2018). "The mode of interfragmentary movement affects bone formation and revascularization after callus distraction." Public Library of Science One **13**(8): 1-12.

David, V., Laroche, N., Boudignon, B., Lafage-Proust, M. H., Alexandre, C., Ruegsegger, P. & Vico, L. (2003). "Noninvasive in vivo monitoring of bone architecture alterations in hindlimb-unloaded female rats using novel three-dimensional microcomputed tomography." Journal of Bone and Mineral Research **18**(9): 1622-1631.

Davies, J. E. (2003). "Understanding peri-implant endosseous healing." Journal of Dental Education **67**(8): 932-949.

De Boer, H. H. (1988). "The history of bone grafts." Clinical Orthopaedics and Related Research **226**: 292-298.

De Man, F., Tigchelaar, W., Marti, R., Van Noorden, C. & Van der Vis, H. (2005). "Effects of mechanical compression of a fibrous tissue interface on bone with or without high-density polyethylene particles in a rabbit model of prosthetic loosening." Journal of Bone and Joint Surgery **87(7)**: 1522-1533.

Del Valle, J., Carreño, F. & Ruano, O. A. (2006). "Influence of texture and grain size on work hardening and ductility in magnesium-based alloys processed by ECAP and rolling." Acta Materialia **54(16)**: 4247-4259.

Del Valle, J. & Ruano, O. A. (2008). "Superplasticity in a magnesium alloy prepared with bimodal grain size distributions developed by dynamic recrystallisation." Materials Letters **62(19)**: 3391-3394.

Denkena, B., Köhler, J., Stieghorst, J., Turger, A., Seitz, J., Fau, D., Wolters, L., Angrisani, N., Reifenrath, J. & Helmecke, P. (2013). "Influence of stress on the degradation behavior of Mg LAE442 implant systems." Procedia CIRP **5**: 189-195.

Dimitriou, R., Jones, E., McGonagle, D. & Giannoudis, P. V. (2011). "Bone regeneration: current concepts and future directions." BMC Medicine **9(1)**: 66-77.

Donath, K. & Breuner, G. (1982). "A method for the study of undecalcified bones and teeth with attached soft tissues* The Säge-Schliff (sawing and grinding) Technique." Journal of Oral Pathology & Medicine **11(4)**: 318-326.

Dorozhkin, S. V. (2014). "Calcium orthophosphate coatings on magnesium and its biodegradable alloys." Acta Biomaterialia **10(7)**: 2919-2934.

Dunand, D. C. (2004). "Processing of titanium foams." Advanced Engineering Materials **6(6)**: 369-376.

Einhorn, T. A. & Gerstenfeld, L. C. (2015). "Fracture healing: mechanisms and interventions." Nature Reviews Rheumatology **11(1)**: 45-54.

Erdmann, N., Bondarenko, A., Hewicker-Trautwein, M., Angrisani, N., Reifenrath, J., Lucas, A. & Meyer-Lindenberg, A. (2010). "Evaluation of the soft tissue biocompatibility of MgCa0.8 and surgical steel 316L in vivo: a comparative study in rabbits." BioMedical Engineering Online **9(63)**: 1-17.

Feldkamp, L. A., Davis, L. C. & Kress, J. W. (1984). "Practical cone-beam algorithm." Journal of Optical Society of America **1(6)**: 612-619.

- Feldkamp, L. A., Goldstein, S. A., Parfitt, M. A., Jesion, G. & Kleerekoper, M. (1989). "The direct examination of three-dimensional bone architecture in vitro by computed tomography." Journal of Bone and Mineral Research **4**(1): 3-11.
- Féron, J.-M. & Mauprivez, R. (2016). "Fracture repair: general aspects and influence of osteoporosis and anti-osteoporosis treatment." Injury **47**(1): 10-14.
- Fischerauer, S., Kraus, T., Wu, X., Tangl, S., Sorantin, E., Hänzi, A., Löffler, J. F., Uggowitz, P. J. & Weinberg, A. (2013). "In vivo degradation performance of micro-arc-oxidized magnesium implants: a micro-CT study in rats." Acta Biomaterialia **9**(2): 5411-5420.
- Fontecave, M. & Pierre, J. (1993). "Iron: metabolism, toxicity and therapy." Biochimie **75**(9): 767-773.
- Förster, Y., Bernhardt, R., Hintze, V., Möller, S., Schnabelrauch, M., Scharnweber, D. & Rammelt, S. (2017). "Collagen/glycosaminoglycan coatings enhance new bone formation in a critical size bone defect—A pilot study in rats." Materials Science and Engineering: C **71**: 84-92.
- Ganrot, P. (1986). "Metabolism and possible health effects of aluminum." Environmental Health Perspectives **65**: 363-441.
- Garrett, M. P., Kakarla, U. K., Porter, R. W. & Sonntag, V. K. (2010). "Formation of painful seroma and edema after the use of recombinant human bone morphogenetic protein-2 in posterolateral lumbar spine fusions." Neurosurgery **66**(6): 1044-1049.
- Gartzke, A.-K., Julmi, S., Klose, C., Waselau, A.-C., Meyer-Lindenberg, A., Maier, H. J., Besdo, S. & Wriggers, P. (2019). "A simulation model for the degradation of magnesium-based bone implants." Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials **101**: 103411.
- Gleeson, J. P. & O'Brien, F. J. (2011). Composite scaffolds for orthopaedic regenerative medicine, Rijeka, InTech.
- Gogolewski, S. (2000). "Bioresorbable polymers in trauma and bone surgery." Injury **31**(4): 28-32.
- Goh, B. T., Lee, S., Tideman, H. & Stoelinga, P. J. (2008). "Mandibular reconstruction in adults: a review." International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery **37**(7): 597-605.
- Grau, M., Seiler, C., Roland, L., Matena, J., Windhövel, C., Teske, M., Murua Escobar, H., Lüpke, M., Seifert, H. & Gellrich, N.-C. (2018). "Osteointegration of porous poly-ε-caprolactone-coated and previtalised magnesium implants in critically sized calvarial bone defects in the mouse model." Materials **11**(6): 1-22.

Gu, X., Xie, X., Li, N., Zheng, Y. & Qin, L. (2012). "In vitro and in vivo studies on a Mg–Sr binary alloy system developed as a new kind of biodegradable metal." Acta Biomaterialia **8**(6): 2360-2374.

Gu, X., Zheng, Y., Lan, Q., Cheng, Y., Zhang, Z., Xi, T. & Zhang, D. (2009). "Surface modification of an Mg-1Ca alloy to slow down its biocorrosion by chitosan." Biomedical Materials **4**(4): 044109.

Haferkamp, H., Kaese, V., Niemeyer, M., Philipp, K., Tai, P. T., Heublein, B. & Rohde, R. (2001). "Untersuchungen an magnesiumbasierten Legierungen als neue Materialien in der Implantologie." Materialwissenschaft und Werkstofftechnik **32**(2): 116-120.

Hampp, C., Angrisani, N., Reifenrath, J., Bormann, D., Seitz, J.-M. & Meyer-Lindenberg, A. (2013). "Evaluation of the biocompatibility of two magnesium alloys as degradable implant materials in comparison to titanium as non-resorbable material in the rabbit." Materials Science & Engineering C **33**(1): 317-326.

Hampp, C., Ullmann, B., Reifenrath, J., Angrisani, N., Dziuba, D., Bormann, D., Seitz, J. M. & Meyer-Lindenberg, A. (2012). "Research on the biocompatibility of the new magnesium alloy LANd442—an in vivo study in the rabbit tibia over 26 weeks." Advanced Engineering Materials **14**(3): B28-B37.

Hench, L. L. & Wilson, J. (1993). An introduction to bioceramics, Gainesville, World Scientific.

Hermawan, H., Alamdari, H., Mantovani, D. & Dube, D. (2008). "Iron–manganese: new class of metallic degradable biomaterials prepared by powder metallurgy." Powder Metallurgy **51**(1): 38-45.

Herten, M., Zilkens, C., Thorey, F., Tassemeier, T., Lensing-Hohn, S., Fischer, J. C., Sager, M., Krauspe, R. & Jager, M. (2019). "Biomechanical Stability and Osteogenesis in a Tibial Bone Defect Treated by Autologous Ovine Cord Blood Cells-A Pilot Study." Molecules **24**(2): 295.

Heublein, B., Rohde, R., Kaese, V., Niemeyer, M., Hartung, W. & Haverich, A. (2003). "Biocorrosion of magnesium alloys: a new principle in cardiovascular implant technology?" Heart **89**(6): 651-656.

Hirano, S. & Suzuki, K. T. (1996). "Exposure, metabolism, and toxicity of rare earths and related compounds." Environmental Health Perspectives **104**(1): 85-95.

Hiromoto, S., Inoue, M., Taguchi, T., Yamane, M. & Ohtsu, N. (2015). "In vitro and in vivo biocompatibility and corrosion behaviour of a bioabsorbable magnesium alloy coated with octacalcium phosphate and hydroxyapatite." Acta Biomaterialia **11**(1): 520-530.

Hofmann, G. (1995). "Biodegradable implants in traumatology: a review on the state-of-the-art." Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery **114**(3): 123-132.

Hollister, S. J. (2005). "Porous scaffold design for tissue engineering." Nature materials **4**(7): 518-524.

Hornberger, H., Virtanen, S. & Boccaccini, A. R. (2012). "Biomedical coatings on magnesium alloys—a review." Acta Biomaterialia **8**(7): 2442-2455.

Huehnerschulte, T. A., Angrisani, N., Rittershaus, D., Bormann, D., Windhagen, H. & Meyer-Lindenberg, A. (2011). "In vivo corrosion of two novel magnesium alloys ZEK100 and AX30 and their mechanical suitability as biodegradable implants." Materials **4**(6): 1144-1167.

Janning, C., Willbold, E., Vogt, C., Nellesen, J., Meyer-Lindenberg, A., Windhagen, H., Thorey, F. & Witte, F. (2010). "Magnesium hydroxide temporarily enhancing osteoblast activity and decreasing the osteoclast number in peri-implant bone remodelling." Acta Biomaterialia **6**(5): 1861-1868.

Johnson, A. J. W. & Herschler, B. A. (2011). "A review of the mechanical behavior of CaP and CaP/polymer composites for applications in bone replacement and repair." Acta Biomaterialia **7**(1): 16-30.

Julmi, S., Klose, C., Krüger, A.-K., Wriggers, P. & Maier, H. J. (2017). Development of sponge structure and casting conditions for absorbable magnesium bone implants, TMS 2017 146th Annual Meeting & Exhibition Supplemental Proceedings, Pittsburgh, Springer.

Julmi, S., Krüger, A.-K., Waselau, A.-C., Meyer-Lindenberg, A., Wriggers, P., Klose, C. & Maier, H. J. (2019). "Processing and coating of open-pored absorbable magnesium-based bone implants." Materials Science & Engineering C **98**: 1073-1086.

Junqueira, L. C. U., Carneiro, J., Mayerhofer, A. & Wurziger, L. (2004). Histologie, Berlin, Springer.

Kaese, V. (2002). Beitrag zum korrosionsschützenden Legieren von Magnesiumwerkstoffen, Düsseldorf, VDI Verlag.

Karageorgiou, V. & Kaplan, D. (2005). "Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis." Biomaterials **26**(27): 5474-5491.

Keegan, G., Learmonth, I. & Case, C. (2007). "Orthopaedic metals and their potential toxicity in the arthroplasty patient: a review of current knowledge and future strategies." The Journal of Bone and Joint Surgery. British volume **89**(5): 567-573.

Kingma, M. (1960). "Results of transplantations with preserved calf bone." Archivum chirurgicum Neerlandicum **12**: 221-235.

Kleer-Reiter, N., Julmi, S., Feichtner, F., Waselau, A., Klose, C., Wriggers, P., Maier, H. & Meyer-Lindenberg, A. (2021). "Biocompatibility and degradation of the open-pored magnesium scaffolds LAE442 and La2." Biomedical Materials **16**(3): 035037.

Kleer, N., Julmi, S., Gartzke, A.-K., Augustin, J., Feichtner, F., Waselau, A.-C., Klose, C., Maier, H., Wriggers, P. & Meyer-Lindenberg, A. (2019). "Comparison of degradation behaviour and osseointegration of the two magnesium scaffolds, LAE442 and La2, in vivo." Materialia **8**: 100436.

Klinck, R. J., Campbell, G. M. & Boyd, S. K. (2008). "Radiation effects on bone architecture in mice and rats resulting from in vivo micro-computed tomography scanning." Medical Engineering & Physics **30**(7): 888-895.

Kopp, A., Derra, T., Muther, M., Jauer, L., Schleifenbaum, J. H., Voshage, M., Jung, O., Smeets, R. & Kroger, N. (2019). "Influence of design and postprocessing parameters on the degradation behavior and mechanical properties of additively manufactured magnesium scaffolds." Acta Biomaterialia **98**: 23-35.

Kostenuik, P. & Mirza, F. M. (2017). "Fracture healing physiology and the quest for therapies for delayed healing and nonunion." Journal of Orthopaedic Research **35**(2): 213-223.

Kovalchik, M., Kaehny, W., Hegg, A., Jackson, J. & Alfrey, A. (1978). "Aluminum kinetics during hemodialysis." The Journal of Laboratory and Clinical Medicine **92**(5): 712-720.

Kraus, T., Fischerauer, S. F., Hänzi, A. C., Uggowitzer, P. J., Löffler, J. F. & Weinberg, A. M. (2012). "Magnesium alloys for temporary implants in osteosynthesis: in vivo studies of their degradation and interaction with bone." Acta Biomaterialia **8**(3): 1230-1238.

Kühnel, W. (2014). Taschenatlas Histologie, Stuttgart, Georg Thieme Verlag.

Kulak, C. A. M. & Dempster, D. W. (2010). "Bone histomorphometry: a concise review for endocrinologists and clinicians." Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia **54**(2): 87-98.

Kuroiwa, Y., Niikura, T., Lee, S. Y., Oe, K., Iwakura, T., Fukui, T., Matsumoto, T., Matsushita, T., Nishida, K. & Kuroda, R. (2019). "Escherichia coli-derived BMP-2-absorbed β -TCP granules induce bone regeneration in rabbit critical-sized femoral segmental defects." International Orthopaedics **43**(5): 1247-1253.

Lalk, M., Reifenrath, J., Angrisani, N., Bondarenko, A., Seitz, J. M., Mueller, P. P. & Meyer-Lindenberg, A. (2013). "Fluoride and calcium-phosphate coated sponges of the magnesium alloy AX30 as bone grafts: a comparative study in rabbits." Journal of Materials Science: Materials in Medicine **24**(2): 417-436.

Lalk, M., Reifenrath, J., Rittershaus, D., Bormann, D. & Meyer-Lindenberg, A. (2010). "Biocompatibility and degradation behaviour of degradable magnesium sponges coated with bioglass–method establishment within the framework of a pilot study." Materialwissenschaft und Werkstofftechnik **41**(12): 1025-1034.

Lambotte, A. (1909). "Technique et indication des prothèses dans le traitement des fractures." Presse med belge **17**: 321-323.

Lambotte, A. (1932). "L'utilisation du magnesium comme materiel perdu dans l'osteosynthèse." Bull Mem Soc Nat Chir **28**(3): 1325-1334.

Lang, G. (2012). Histotechnik: Praxislehrbuch für die biomedizinische Analytik, Wien, Springer.

Lanske, B., Chandler, H., Pierce, A., Brown, J., Ominsky, M., Kostenuik, P. & Hattersley, G. (2019). "Abaloparatide, a PTH receptor agonist with homology to PTHrP, enhances callus bridging and biomechanical properties in rats with femoral fracture." Journal of Orthopaedic Research **37**(4): 812-820.

LaStayo, P. C., Winters, K. M. & Hardy, M. (2003). "Fracture healing: bone healing, fracture management, and current concepts related to the hand." Journal of Hand Therapy **16**(2): 81-93.

Liebich, H.-G. (2010). Funktionelle Histologie der Haussäugetiere und Vögel: Lehrbuch und Farbatlas für Studium und Praxis, Stuttgart, Schattauer Verlag.

Lord, C., Gebhardt, M., Tomford, W. & Mankin, H. (1988). "Infection in bone allografts. Incidence, nature, and treatment." Journal of Bone and Joint Surgery **70**(3): 369-376.

Lowet, G. (1997). Bone research in biomechanics. Amsterdam, IOS Press.

Macewen, W. (1881). "IV. Observations concerning transplantation of bone. Illustrated by a case of inter-human osseous transplantation, whereby over two-thirds of the shaft of a humerus was restored." Proceedings of the Royal Society of London **32**(212-215): 232-247.

Maier, H. J., Julmi, S., Behrens, S., Klose, C., Gartzke, A.-K., Wriggers, P., Waselau, A.-C. & Meyer-Lindenberg, A. (2020). "Magnesium Alloys for Open-Pored Bioresorbable Implants." The Journal of The Minerals, Metals & Materials Society (TMS) **72**(5): 1859-1869.

Maier, O. (1940). "Über die Verwendbarkeit von Leichtmetallen in der Chirurgie (metallisches Magnesium als Reizmittel zur Knochenneubildung)." Deutsche Zeitschrift für Chirurgie **253**(8-9): 552-556.

Mavrogenis, A., Dimitriou, R., Parvizi, J. & Babis, G. C. (2009). "Biology of implant osseointegration." Journal of Musculoskeletal and Neuronal Interactions **9**(2): 61-71.

McBride, E. (1938). "Magnesium screw and nail transfixion in fractures." Southern Medical Journal **31**(5): 508-514.

McIntyre, R. S., Mancini, D. A., Parikh, S. & Kennedy, S. H. (2001). "Lithium revisited." The Canadian Journal of Psychiatry **46**(4): 322-327.

Mueller, P. P., Arnold, S., Badar, M., Bormann, D., Bach, F. W., Drynda, A., Meyer-Lindenberg, A., Hauser, H. & Peuster, M. (2012). "Histological and molecular evaluation of iron as degradable medical implant material in a murine animal model." Journal of Biomedical Materials Research Part A **100**(11): 2881-2889.

Mueller, W.-D., de Mele, M. F. L., Nascimento, M. L. & Zeddies, M. (2008). "Degradation of magnesium and its alloys: dependence on the composition of the synthetic biological media." Journal of Biomedical Materials Research Part A **90**(2): 487-495.

Muhr, G. (1997). Die Bedeutung von Biologie und Biomechanik in der Frakturheilung. Unfallchirurgie in Deutschland, Berlin, Heidelberg, Springer: 128-134.

Müller, P. E., Schrimpf, F., Milz, S., Kircher, J., Roland Dürr, H., Wegener, B., Pellengahr, C. & Jansson, V. (2006). "Repair of osteochondral defects in the knee by resorbable bioimplants in a rabbit model." Acta Orthopaedica **77**(6): 981-985.

Nuss, K. M. & von Rechenberg, B. (2008). "Biocompatibility issues with modern implants in bone-a review for clinical orthopedics." The Open Orthopaedics Journal **2**: 66-78.

Oryan, A., Alidadi, S., Moshiri, A. & Maffulli, N. (2014). "Bone regenerative medicine: classic options, novel strategies, and future directions." Journal of Orthopaedic Surgery and Research **9**(1): 18.

Oryan, A., Monazzah, S. & Bigham-Sadegh, A. (2015). "Bone injury and fracture healing biology." Biomedical and Environmental Sciences **28**(1): 57-71.

Parfitt, A. M., Drezner, M. K., Glorieux, F. H., Kanis, J. A., Malluche, H., Meunier, P. J., Ott, S. M. & Recker, R. R. (1987). "Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols, and units: report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee." Journal of Bone and Mineral Research **2**(6): 595-610.

Pauwels, F. (1960). "Eine neue Theorie über den Einfluß mechanischer Reize auf die Differenzierung der Stützgewebe." Zeitschrift für Anatomie und Entwicklungsgeschichte **121**(6): 478-515.

Pawelec, K. & Planell, J. A. (2019). Bone Repair Biomaterials: Regeneration and Clinical Applications, Duxford, Woodhead Publishing.

Payr, E. (1900). "Beiträge zur Technik der Blutgefäß- und Nerven- naht nebst Mittheilungen die Verwendung eines Resorbierbaren Metalles in der Chirurgie." Arch. Klin. Chir. **62**: 67-71.

Petite, H., Viateau, V., Bensaid, W., Meunier, A., de Pollak, C., Bourguignon, M., Oudina, K., Sedel, L. & Guillemain, G. (2000). "Tissue-engineered bone regeneration." Nature Biotechnology **18**(9): 959-963.

Peuster, M., Hesse, C., Schloo, T., Fink, C., Beerbaum, P. & von Schnakenburg, C. (2006). "Long-term biocompatibility of a corrodible peripheral iron stent in the porcine descending aorta." Biomaterials **27**(28): 4955-4962.

Peuster, M., Wohlsein, P., Brüggemann, M., Ehlerding, M., Seidler, K., Fink, C., Brauer, H., Fischer, A. & Hausdorf, G. (2001). "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 **86**(5): 563-569.

Probst, A. & Spiegel, H.-U. (1997). "Cellular mechanisms of bone repair." Journal of Investigative Surgery **10**(3): 77-86.

Purnama, A., Hermawan, H., Couet, J. & Mantovani, D. (2010). "Assessing the biocompatibility of degradable metallic materials: state-of-the-art and focus on the potential of genetic regulation." Acta Biomaterialia **6**(5): 1800-1807.

Reifenrath, J., Krause, A., Bormann, D., Von Rechenberg, B., Windhagen, H. & Meyer-Lindenberg, A. (2010). "Profound differences in the in-vivo-degradation and biocompatibility of two very similar rare-earth containing Mg-alloys in a rabbit model." Materialwissenschaft und Werkstofftechnik **41**(12): 1054-1061.

Revell, P. A., Damien, E., Zhang, X., Evans, P. & Howlett, C. R. (2004). The effect of magnesium ions on bone bonding to hydroxyapatite coating on titanium alloy implants. Key Engineering Materials **254**: 447-450

Ritman, E. L. (2011). "Current status of developments and applications of micro-CT." Annual Review of Biomedical Engineering **13**: 531-552.

Roach, P., Eglin, D., Rohde, K. & Perry, C. C. (2007). "Modern biomaterials: a review—bulk properties and implications of surface modifications." Journal of Materials Science: Materials in Medicine **18**(7): 1263-1277.

Robertson, D. M., St. Pierre, L. & Chahal, R. (1976). "Preliminary observations of bone ingrowth into porous materials." Journal of Biomedical Materials Research **10**(3): 335-344.

Romeis, B. (1989). Mikroskopische Technik, München, Urban & Schwarzenberg.

Rössig, C., Angrisani, N., Besdo, S., Damm, N. B., Badenhop, M., Fedchenko, N., Helmecke, P., Seitz, J. M., Meyer-Lindenberg, A. & Reifenrath, J. (2014). "Magnesium-based intramedullary nailing system in a sheep model: Biomechanic evaluation and first in vivo results." Journal of Veterinary Science & Medical Diagnosis **3**(3): 1-12.

Rössig, C., Angrisani, N., Helmecke, P., Besdo, S., Seitz, J.-M., Welke, B., Fedchenko, N., Kock, H. & Reifenrath, J. (2015). "In vivo evaluation of a magnesium-based degradable intramedullary nailing system in a sheep model." Acta Biomaterialia **25**: 369-383.

Rüegsegger, P., Koller, B. & Müller, R. (1996). "A microtomographic system for the nondestructive evaluation of bone architecture." Calcified Tissue International **58**(1): 24-29.

Ryan, G., Pandit, A. & Apatsidis, D. P. (2006). "Fabrication methods of porous metals for use in orthopaedic applications." Biomaterials **27**(13): 2651-2670.

Sachse, A., Wagner, A., Keller, M., Wagner, O., Wetzel, W.-D., Layher, F., Venbrocks, R.-A., Hortschansky, P., Pietraszczyk, M. & Wiederanders, B. (2005). "Osteointegration of hydroxyapatite-titanium implants coated with nonglycosylated recombinant human bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) in aged sheep." Bone **37**(5): 699-710.

Salgado, A. J., Coutinho, O. P. & Reis, R. L. (2004). "Bone tissue engineering: state of the art and future trends." Macromolecular Bioscience **4**(8): 743-765.

Sanchez, A. H. M., Luthringer, B. J., Feyerabend, F. & Willumeit, R. (2015). "Mg and Mg alloys: how comparable are in vitro and in vivo corrosion rates? A review." Acta Biomaterialia **13**: 16-31.

Santavirta, S., Konttinen, Y. T., Saito, T., Gronblad, M., Partio, E., Kemppinen, P. & Rokkanen, P. (1990). "Immune response to polyglycolic acid implants." The Journal of Bone and Joint Surgery. British volume **72**(4): 597-600.

Schindeler, A., McDonald, M. M., Bokko, P. & Little, D. G. (2008). "Bone remodeling during fracture repair: The cellular picture." Seminars in Cell & Developmental Biology **19**(5): 459-466

Schmitz, J. P. & Hollinger, J. O. (1986). "The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions." Clinical Orthopaedics and Related Research(205): 299-308.

Seeger, J. (2010). Histologische Übungen für die Tiermedizin, Hannover, Schlütersche.

Sen, M. & Miclau, T. (2007). "Autologous iliac crest bone graft: should it still be the gold standard for treating nonunions?" Injury **38**(1): 75-80.

Shadanbaz, S., Walker, J., Woodfield, T. B., Staiger, M. P. & Dias, G. J. (2014). "Monetite and brushite coated magnesium: in vivo and in vitro models for degradation analysis." Journal of Materials Science: Materials in Medicine **25**(1): 173-183.

Shaw, B. A. (2003). "Corrosion resistance of magnesium alloys." ASM handbook **13**: 692-696.

Shils, M. E. & Shike, M. (2006). Modern nutrition in health and disease, Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins.

Sinowatz, F. & Rodler, D. (2017). Histologie Kurs, München, Eigenverlag.

Song, G. (2007). "Control of biodegradation of biocompatible magnesium alloys." Corrosion Science **49**(4): 1696-1701.

Song, G. & Atrens, A. (2003). "Understanding magnesium corrosion—a framework for improved alloy performance." Advanced Engineering Materials **5**(12): 837-858.

Song, G. & Song, S. (2007). "A possible biodegradable magnesium implant material." Advanced Engineering Materials **9**(4): 298-302.

Song, G. L. & Atrens, A. (1999). "Corrosion mechanisms of magnesium alloys." Advanced Engineering Materials **1**(1): 11-33.

Song, Y., Zhang, S., Li, J., Zhao, C. & Zhang, X. (2010). "Electrodeposition of Ca–P coatings on biodegradable Mg alloy: in vitro biomineralization behavior." Acta Biomaterialia **6**(5): 1736-1742.

Staiger, M. P., Pietak, A. M., Huadmai, J. & Dias, G. (2006). "Magnesium and its alloys as orthopedic biomaterials: a review." Biomaterials **27**(9): 1728-1734.

Stürmer, K. (1987). Histomorphologie der Frakturheilung im Vergleich der Fixationsverfahren am Tibiaschaft. Die Tibiaschaftfraktur beim Erwachsenen, Berlin, Heidelberg, Springer.

Suska, F., Emanuelsson, L., Johansson, A., Tengvall, P. & Thomsen, P. (2008). "Fibrous capsule formation around titanium and copper." Journal of Biomedical Materials Research Part A **85**(4): 888-896.

Thomann, M., Krause, C., Angrisani, N., Bormann, D., Hassel, T., Windhagen, H. & Meyer-Lindenberg, A. (2010). "Influence of a magnesium-fluoride coating of magnesium-based implants (MgCa0.8) on degradation in a rabbit model." Journal of Biomedical Materials Research Part A **93**(4): 1609-1619.

Thomann, M., Krause, C., Bormann, D., Von der Höh, N., Windhagen, H. & Meyer-Lindenberg, A. (2009). "Comparison of the resorbable magnesium alloys LAE442 und MgCa0.8 concerning their mechanical properties, their progress of degradation and the bone-implant-contact after 12 months implantation duration in a rabbit model." Materialwissenschaft und Werkstofftechnik: Entwicklung, Fertigung, Prüfung, Eigenschaften und Anwendungen technischer Werkstoffe **40**(1-2): 82-87.

Thomas, P., Thomas, M., Summer, B., Dietrich, K., Zauzig, M., Steinhauser, E., Krenn, V., Arnholdt, H. & Flaig, M. J. (2011). "Impaired wound-healing, local eczema, and chronic inflammation following titanium osteosynthesis in a nickel and cobalt-allergic patient: a case report and review of the literature." Journal of Bone and Joint Surgery **93**(11): e61.

Tian, L., Sheng, Y., Huang, L., Chow, D. H.-K., Chau, W. H., Tang, N., Ngai, T., Wu, C., Lu, J. & Qin, L. (2018). "An innovative Mg/Ti hybrid fixation system developed for fracture fixation and healing enhancement at load-bearing skeletal site." Biomaterials **180**: 173-183.

Tomford, W. (1981). "Immunogenicity of frozen osteoarticular allografts." Transplantation Proceedings **13**: 888-890.

Ullmann, B., Reifenrath, J., Dziuba, D., Seitz, J.-M., Bormann, D. & Meyer-Lindenberg, A. (2011). "In Vivo Degradation Behavior of the Magnesium Alloy LANd442 in Rabbit Tibiae." Materials **4**(12): 2197-2218.

Ullmann, B., Reifenrath, J., Seitz, J.-M., Bormann, D. & Meyer-Lindenberg, A. (2013). "Influence of the grain size on the in vivo degradation behaviour of the magnesium alloy LAE442." Journal of Engineering in Medicine **227**(3): 317-326.

Van Der Elst, M., Patka, P. & Van der Werken, C. (2000). "Biodegradable implants in fracture fixation: state of the art." Der Unfallchirurg **103**(3): 178-182.

van der Pol, U., Mathieu, L., Zeiter, S., Bourban, P.-E., Zambelli, P.-Y., Pearce, S. G., Bouré, L. & Pioletti, D. P. (2010). "Augmentation of bone defect healing using a new biocomposite scaffold: an in vivo study in sheep." Acta Biomaterialia **6**(9): 3755-3762.

Van Oosterwyck, H., Duyck, J., Sloten, J. V., Perre, G. V., Jansen, J., Wevers, M. & Naert, I. (2000). "The use of microfocus computerized tomography as a new technique for characterizing bone tissue around oral implants." Journal of Oral Implantology **26**(1): 5-12.

Verbrugge, J. (1934). "Le Matériel métallique résorbable en chirurgie osseuse." Presse Méd **23**: 460-465.

Vojtěch, D., Kubásek, J., Čapek, J. & Pospíšilová, I. (2014). Magnesium, zinc and iron alloys for medical applications in biodegradable implants. Proceedings of the 23rd International Conference on Metallurgy and Materials, Brno, Czech Republic.

Wade, R., Shah, S., Sujith, B., Shah, K., Raj, A. & Marathe, N. (2020). "High tibial osteotomy in a lax knee: A review of current concepts." Journal of Orthopaedics **19**: 67-71.

Wang, J., Tang, J., Zhang, P., Li, Y., Wang, J., Lai, Y. & Qin, L. (2012). "Surface modification of magnesium alloys developed for bioabsorbable orthopedic implants: a general review." Journal of Biomedical Materials Research Part B **100**(6): 1691-1701.

Wang, M. L., Nesti, L. J., Tuli, R., Lazatin, J., Danielson, K. G., Sharkey, P. F. & Tuan, R. S. (2002). "Titanium particles suppress expression of osteoblastic phenotype in human mesenchymal stem cells." Journal of Orthopaedic Research **20**(6): 1175-1184.

Wang, W., Nune, K. C., Tan, L., Zhang, N., Dong, J., Yan, J., Misra, R. D. K. & Yang, K. (2019). "Bone regeneration of hollow tubular magnesiumstrontium scaffolds in critical-size segmental defects: Effect of surface coatings." Materials Science & Engineering C **100**: 297-307.

Waterman, J., Birbilis, N., Dias, G., Woodfield, T. & Staiger, M. (2012). "Improving in vitro corrosion resistance of biomimetic calcium phosphate coatings for Mg substrates using calcium hydroxide layer." Corrosion Engineering, Science and Technology **47**(5): 340-345.

Waterman, J., Pietak, A., Birbilis, N., Woodfield, T., Dias, G. & Staiger, M. (2011). "Corrosion resistance of biomimetic calcium phosphate coatings on magnesium due to varying pretreatment time." Materials Science and Engineering: B **176**(20): 1756-1760.

Wegener, B., Sichler, A., Milz, S., Sprecher, C., Pieper, K., Hermanns, W., Jansson, V., Nies, B., Kieback, B. & Müller, P. E. (2020). "Development of a novel biodegradable porous iron-based implant for bone replacement." Scientific Reports **10**(1): 9141.

Welch Fossum, T. (2020). Chirurgie der Kleintiere, München, Elsevier.

Welsch, U. & Kummer, W. (2018). Histologie. Das Lehrbuch, München, Elsevier (Urban& Fischer).

Wieding, J., Lindner, T., Bergschmidt, P. & Bader, R. (2015). "Biomechanical stability of novel mechanically adapted open-porous titanium scaffolds in metatarsal bone defects of sheep." Biomaterials **46**: 35-47.

Willbold, E., Gu, X., Albert, D., Kalla, K., Bobe, K., Brauneis, M., Janning, C., Nellesen, J., Czayka, W. & Tillmann, W. (2015). "Effect of the addition of low rare earth elements (lanthanum, neodymium, cerium) on the biodegradation and biocompatibility of magnesium." Acta Biomaterialia **11**: 554-562.

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

Windhagen, H., Radtke, K., Weizbauer, A., Diekmann, J., Noll, Y., Kreimeyer, U., Schavan, R., Stukenborg-Colsman, C. & Waizy, H. (2013). "Biodegradable magnesium-based screw clinically equivalent to titanium screw in hallux valgus surgery: short term results of the first prospective, randomized, controlled clinical pilot study." BioMedical Engineering OnLine **12**(62): 1-10.

Witte, F., Fischer, J., Nellesen, J., Crostack, H.-A., Kaese, V., Pisch, A., Beckmann, F. & Windhagen, H. (2006). "In vitro and in vivo corrosion measurements of magnesium alloys." Biomaterials **27**(7): 1013-1018.

Witte, F., Fischer, J., Nellesen, J., Vogt, C., Vogt, J., Donath, T. & Beckmann, F. (2010). "In vivo corrosion and corrosion protection of magnesium alloy LAE442." Acta Biomaterialia **6**(5): 1792-1799.

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

Witte, F., Kaese, V., Haferkamp, H., Switzer, E., Meyer-Lindenberg, A., Wirth, C. & Windhagen, H. (2005). "In vivo corrosion of four magnesium alloys and the associated bone response." Biomaterials **26**(17): 3557-3563.

Witte, F., Podolsky, C., Hassel, T. & Lucas, A. (2004). "Fertigung von magnesium-implantaten." Werkstattstechnik **94**: 692-696.

Witte, F., Reifenrath, J., Müller, P., Crostack, H. A., Nellesen, J., Bach, F., Bormann, D. & Rudert, M. (2006). "Cartilage repair on magnesium scaffolds used as a subchondral bone replacement." Materialwissenschaft und Werkstofftechnik **37**(6): 504-508.

Witte, F., Ulrich, H., Palm, C. & Willbold, E. (2007). "Biodegradable magnesium scaffolds: Part II: Peri-implant bone remodeling." Journal of Biomedical Materials Research Part A **81**(3): 757-765.

Witte, F., Ulrich, H., Rudert, M. & Willbold, E. (2007). "Biodegradable magnesium scaffolds: Part 1: appropriate inflammatory response." Journal of Biomedical Materials Research Part A **81**(3): 748-756.

Witting, L., Waselau, A.-C., Feichtner, F., Wurm, L., Julmi, S., Klose, C., Gartzke, A.-K., Maier, H., Wriggers, P. & Meyer-Lindenberg, A. (2020). "Influence of coatings on degradation and osseointegration of open porous Mg scaffolds in vivo." Materialia **14**: 100949.

Wolf, E., Röser, K., Hahn, M., Welkerling, H. & Delling, G. (1992). "Enzyme and immunohistochemistry on undecalcified bone and bone marrow biopsies after embedding in plastic: a new embedding method for routine application." Virchows Archiv A **420**(1): 17-24.

Wong, H. M., Yeung, K. W., Lam, K. O., Tam, V., Chu, P. K., Luk, K. D. & Cheung, K. M. (2010). "A biodegradable polymer-based coating to control the performance of magnesium alloy orthopaedic implants." Biomaterials **31**(8): 2084-2096.

Wu, G., Fan, Y., Gao, H., Zhai, C. & Zhu, Y. P. (2005). "The effect of Ca and rare earth elements on the microstructure, mechanical properties and corrosion behavior of AZ91D." Materials Science and Engineering: A **408**(1-2): 255-263.

Wu, G., Ibrahim, J. M. & Chu, P. K. (2013). "Surface design of biodegradable magnesium alloys - a review." Surface and Coatings Technology **233**: 2-12.

Wu, Y., Wang, Y., Zhao, D., Zhang, N., Li, H., Li, J., Wang, Y., Zhao, Y., Yan, J. & Zhou, Y. (2019). "In vivo study of microarc oxidation coated Mg alloy as a substitute for bone defect repairing: degradation behavior, mechanical properties, and bone response." Colloids and Surfaces B: Biointerfaces **181**: 349-359.

Xu, L. & Yamamoto, A. (2012). "Characteristics and cytocompatibility of biodegradable polymer film on magnesium by spin coating." Colloids and Surfaces B: Biointerfaces **93**: 67-74.

Xu, L., Zhang, E., Yin, D., Zeng, S. & Yang, K. (2008). "In vitro corrosion behaviour of Mg alloys in a phosphate buffered solution for bone implant application." Journal of Materials Science: Materials in Medicine **19**(3): 1017-1025.

Yeom, H., Blanchard, S., Kim, S., Zunt, S. & Chu, T.-M. G. (2008). "Correlation between micro-computed tomography and histomorphometry for assessment of new bone formation in a calvarial experimental model." Journal of Craniofacial Surgery **19**(2): 446-452.

Yuen, C. K. & Ip, W. Y. (2010). "Theoretical risk assessment of magnesium alloys as degradable biomedical implants." Acta Biomaterialia **6**(5): 1808-1812.

Yusop, A., Bakir, A., Shaharom, N., Abdul Kadir, M. & Hermawan, H. (2012). "Porous biodegradable metals for hard tissue scaffolds: a review." International Journal of Biomaterials **2012**: 1-10.

Zhang, E., Chen, H. & Shen, F. (2010). "Biocorrosion properties and blood and cell compatibility of pure iron as a biodegradable biomaterial." Journal of Materials Science: Materials in Medicine **21**: 2151-2163.

Zhang, N., Zhao, D., Liu, N., Wu, Y., Yang, J., Wang, Y., Xie, H., Ji, Y., Zhou, C. & Zhuang, J. (2018). "Assessment of the degradation rates and effectiveness of different coated Mg-Zn-Ca alloy scaffolds for in vivo repair of critical-size bone defects." Journal of Materials Science: Materials in Medicine **29**(9): 138.

Zhao, D., Witte, F., Lu, F., Wang, J., Li, J. & Qin, L. (2017). "Current status on clinical applications of magnesium-based orthopaedic implants: A review from clinical translational perspective." Biomaterials **112**: 287-302.

Zheng, Y., Gu, X. & Witte, F. (2014). "Biodegradable metals." Materials Science and Engineering **77**: 1-34.

Zhu, J.-M., Huffer, W. & Alfrey, A. C. (1990). "Effect of aluminum on bone matrix inductive properties." Kidney International **38**(6): 1141-1145.

Zreiqat, H., Howlett, C., Zannettino, A., Evans, P., Schulze-Tanzil, G., Knabe, C. & Shakibaei, M. (2002). "Mechanisms of magnesium-stimulated adhesion of osteoblastic cells to commonly used orthopaedic implants." Journal of Biomedical Materials Research **62**(2): 175-184.

VIII. DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt meiner Doktormutter Frau Prof. Andrea Meyer-Lindenberg für die Überlassung des interessanten Dissertationsthemas und für die gute persönliche und fachliche Betreuung dieser Arbeit.

Weiterhin geht ein großes Dankeschön an Dr. Anja-Christina Waselau und an Franziska Feichtner Ph.D. sowie auch an Lisa Wurm für ihre Mithilfen beim Auswerten der Daten und ihrer zahlreichen Korrekturen.

Ebenso geht mein Dank an Beatrix Limmer und Cristiane Meneghelli Rudolph für die hervorragende technische Unterstützung während dieses Dissertationsvorhabens.

Für die schöne gemeinsame Zeit bedanke ich mich bei Julia Augustin, Katharina Kowalewicz, Sophia Hiepe und Elke Hemmerlein und im Besonderen danke ich Nadine Kleer und Laura Witting für die Ausbildung im Bereich der Kaninchen-Anästhesie.

Unseren Tierpflegern Angi, Fatma, Jan, Petra und Marion möchte ich für die gute Betreuung der Kaninchen danken.

Weiter geht mein Dank an die Mitarbeiter des Institutes für Werkstoffkunde der Leibniz Universität Hannover und unseren Projektpartnern Prof. Dr.-Ing. Hans Jürgen Maier und Dr.-Ing. Christian Klose. Insbesondere möchte ich Stefan Julmi für die Herstellung der Scaffolds und für die Erstellung der Röntgenmikroskopscans sowie der REM-/EDX-Analysen danken.

Bei Frau Prof. Brigitte von Rechenberg möchte ich mich für die kompetente Unterstützung während der histologischen Auswertung bedanken. Auch bei Herrn Yury Zablotzki Ph.D. möchte ich mich für die Hilfe bei der statistischen Auswertung bedanken.

Ich möchte auch ein großes Dankeschön an meine jetzige Arbeitgeberin Dr. Josefa Eisenreich aussprechen. Durch eine vorläufige Teilzeiteinstellung ermöglichte Sie mir die Fertigstellung dieser Dissertation. Ich danke dir, dass du mir eine so gute Lehrmeisterin in meinem neuen Tätigkeitsfeld bist.

Ein herzlicher Dank geht an meine Eltern Astrid und Dr. Fritz Schmidt, an meinen Stiefvater Jürgen Hilpert, an meinen Bruder Richard Schmidt, an meine Großeltern Walter Eller und Ursula Schmidt sowie auch an Martina und Thomas Friedrich. Ohne eure finanzielle und mentale Unterstützung sowie der leckeren Beköstigung zur Stärkung wäre dieses Vorhaben vermutlich gründlich schiefgelaufen.

Außerdem möchte ich meinem Freund Sebastian Friedrich für die guten Korrekturen, die Hilfe bei der Erstellung der Figures und vor allem für seine zahlreichen aufbauenden Worte danken. Entschuldige bitte, dass du mich ertragen musstest und ich danke dir, dass du es hast.

Und als letztes mag ich dem kleinen Charly danken, dafür dass er mich zu jeder Uhrzeit auf Arbeit begleitet hat und mir immer ein Lächeln in mein Gesicht gezaubert hat. Danke dir, dass du immer für gute Laune auf Arbeit gesorgt hast.