

# **Modification of Magnesium Surface is changing Degradation significantly?**

**In vivo Micro-CT Untersuchungen und 3D Rekonstruktion von bioresorbierbarem Magnesium (ZX50) versus oberflächenverändertem Magnesium (Magox) am wachsenden Rattenskelett**

Diplomarbeit von  
Michael Weitzendorfer  
Mat.Nr.: 0433024

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der gesamten Heilkunde  
(Dr. med. univ.)

an der  
*MEDIZINISCHEN UNIVERSITÄT GRAZ*

ausgeführt an der  
*Universitätsklinik für Kinderchirurgie*

unter der Anleitung von  
*Assoz.Prof.<sup>IN</sup> Dr.<sup>IN</sup> Annelie- Martina Weinberg*

## **Gutachterinnen**

*Assoz.Prof.<sup>IN</sup> Dr.<sup>IN</sup> Annelie- Martina Weinberg*

Universitätsklinik für Kinderchirurgie, Graz

*Dr.<sup>IN</sup> Tanja Kraus*

Universitätsklinik für Kinderorthopädie, Graz

## **Eidesstattliche Erklärung**

*Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als die angegebenen Quellen nicht verwendet habe und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.*

*Graz, 02.04.2012*

*Michael Weitzendorfer*

## Danksagungen

*Diese Diplomarbeit widme ich meinen Eltern Hans Peter und Daniela Weitzendorfer, die mir immer mit Rat und Tat zur Seite stehen und die mir während meiner Studienzeit die nötige finanzielle und psychische Unterstützung zukommen ließen.*

*Des Weiteren möchte ich Prof. Dr. Annelie – Martina Weinberg danken, die sehr viel Geduld mit mir hatte und die mich bei allen Problemstellungen kompetent und sehr einfühlsam beraten hat.*

*Ein besonderer Dank gilt Dr. Stefan Fischerauer für seine fachliche Unterstützung bei der Erstellung dieser Diplomarbeit, sowie auch Dr. Tanja Kraus. Sie beide haben mich immer mit Rat und Tat unterstützt und die Zusammenarbeit mit ihnen möchte ich niemals missen.*

## Zusammenfassung

Magnesium gilt wegen seiner mechanischen, elektrochemischen und biologischen Eigenschaften als ein attraktives biologisch abbaubares Material. Während sich vorherige Untersuchungen hauptsächlich auf die Biokompatibilität und die Korrosionsbeständigkeit von Magnesium in vitro fokussierten, beschäftigt sich diese Studie mit der Knochen – und Gewebsreaktion auf ein degradierendes Magnesium Implantat im wachsenden Skelett der Ratte.

Drei verschiedene Magnesium – Legierungen wurden zur Beurteilung des Degradationsprozesses, der Gasproduktion und der Knochenantwort in Femora von 21 männlichen Spargue Dawley Ratten beidseitig implantiert. Bei den Magnesium – Legierungen handelte es sich um zwei schnell degradierende (ZX50, „Magox“) und eine langsam abbauende (WZ21). Der Beobachtungszeitraum der Studie betrug hier 24 Wochen.

Die beiden sich schnell abbauenden Magnesium – Legierungen waren von der gleiche Zusammensetzung. Bei Magox wurde jedoch zusätzlich eine elektrochemische Oberflächenbehandlung verwandt, die die Legierung korrosionsbeständiger machen sollte. Die Degradation wurde mittels Micro – Computertomographie beurteilt und die degradierenden Pins anhand der CT Bilder rekonstruiert. Hierzu diente die Software Mimics®.

ZX50 – Pins zeigten einen frühen Abbau unter großem Wasserstoffgasvolumen. Die Pins degradierten innerhalb von 12 Wochen. Der Knochen regenerierte schnell.

„Magox“ – Pins zeigten ebenfalls einen schnellen Abbau, jedoch mit signifikanter Degradationsverzögerung in den ersten 4 Wochen. Auch hier zeigte der Knochen eine gute Kallusbildung sowie eine schnelle und vollständige Knochenregeneration.

WZ21 – Pins behielten ihre Integrität für mehr als 4 Wochen. Innerhalb des Studienzeitraums wurde kein vollständiger Abbau gesehen. Über den gesamten Untersuchungszeitraum zeigte sich eine moderate Wasserstoffgasmenge.

Trotz starker Gasbildung kam es bei den schnell degradierenden Magnesiumlegierungen (Magox und ZX50) zur restitutio ad integrum des Knochens. Die bei Magox verwendete Oberflächenbehandlung führte zu einer initialen signifikanten Änderung im Abbauverhalten.

WZ21 erwies sich als ein vielversprechendes bioresorbierbares Magnesiumimplantat für Osteosynthesen, da die Gasvolumina deutlich geringer waren und eine gute Bioverträglichkeit mit dem menschlichen Knochen gegeben war. Weitere Forschungsarbeit muss aber diesbezüglich noch geleistet werden.

## Abstract

Magnesium is due to its mechanical, electrochemical and biological properties, magnesium as an attractive biodegradable material. While previous research mainly focused on magnesium's in vitro biocompatibility and corrosion resistance, this study investigates the bone and tissue response to a degrading magnesium implant in the growing rat skeleton.

Three different magnesium alloys were implanted bilateral in the femur of 21 male Spargue Dawley rats for evaluating the degradation process, the gas production and the bone response. Among the magnesium alloys we were talking about two fast degrading (ZX50, "Magox") and a slowly degrading (WZ21). The observation period of this study was 24 weeks.

The two quickly depleting magnesium alloys were of the same composition. However at Magox, an electrochemical surface treatment was used in addition, which should make the alloy more resistant to corrosion. The degradation process was evaluated by using micro – computed tomography and the degrading pins were reconstructed by using the CT images. Mimics ® software was used for this purpose.

ZX50 pins exhibited early degradation and released large hydrogen gas volumes. The pins degraded within 12 weeks. The bone regenerated quickly.

" Magox "- Pins also showed rapid degradation, but with significant delay in the degradation process in the first 4 weeks. Here too, the bone showed a good callus formation and a rapid and complete bone regeneration.

WZ21 pins kept their integrity for more than 4 weeks. Within the study period, no complete degradation was seen. Over the entire study period a moderate amount of hydrogen gas has been shown.

Despite excessive gas formation, restitutio ad integrum of the bone at the fast degrading magnesium alloys (Magox and ZX50) occurred. The at Magox used surface treatment only led to a initial significant change in the degradation behavior.

WZ21 proved to be a promising biodegradable magnesium implant for osteosynthesis, because the gas volumes were significantly lower and it was given a good biocompatibility with human bones. Further research will, however, remains to be done in this regard.

# Inhaltsverzeichnis

<b>Gutachterinnen .....</b>	<b>1</b>
<b>Eidesstattliche Erklärung.....</b>	<b>2</b>
<b>Danksagungen .....</b>	<b>3</b>
<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>4</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>6</b>
<b>Inhaltsverzeichnis.....</b>	<b>8</b>
<b>Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>10</b>
<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>12</b>
<b>1. Einleitung.....</b>	<b>13</b>
<b>1.1 Magnesium als osteosynthetisches Material.....</b>	<b>14</b>
1.1.1 Magnesium als Grundsubstanz und dessen experimentielle Anwendung.....	14
1.1.2 Degradationsverhalten von Magnesium.....	17
<b>1.2 Manipulation des Degradationsverhaltens .....</b>	<b>19</b>
1.2.1 Legierung.....	19
1.2.2 Coating.....	21
1.2.3 Micro - arc - Oxidation.....	22
<b>1.3 Physiologie der Knochenheilung.....</b>	<b>23</b>
1.3.1 Knochenregeneration und Modeling/Re-modeling.....	23
1.3.2 Physiologie der Osseointegration und Implantatheilung.....	25
1.3.3 Implantateinheilung.....	26
<b>2. Material und Methodik .....</b>	<b>27</b>
<b>2.1 Implantate.....</b>	<b>27</b>
<b>2.2 Pharmaka .....</b>	<b>28</b>
<b>2.3 Experimentielles Design.....</b>	<b>29</b>
<b>2.4 Präoperatives Vorgehen und Anästhesie .....</b>	<b>30</b>
<b>2.5 Operativer Verlauf.....</b>	<b>31</b>
<b>2.6 Postoperative Behandlung und postoperatives Schmerzmanagement .....</b>	<b>31</b>
<b>2.7 Mikro -CT / Small Animal Imaging .....</b>	<b>32</b>
<b>2.8 Mimics - Auswertung.....</b>	<b>34</b>
<b>2.9 Datenauswertung/Statistik.....</b>	<b>36</b>
<b>3. Resultate .....</b>	<b>37</b>
<b>3.1 Degradationsverlauf .....</b>	<b>37</b>
3.1.1 ZX50.....	38
3.1.2 Magox:.....	38
3.1.3 WZ21 .....	39
<b>3.2 Biologische Reaktion des Knochens.....</b>	<b>44</b>
3.2.1 Biologische Reaktion auf ZX 50 .....	44
3.2.2 Biologische Reaktion auf Magox .....	45
3.2.3 Biologische Reaktion auf WZ21 .....	45
<b>4.Diskussion .....</b>	<b>51</b>
<b>5. Conclusio.....</b>	<b>55</b>

<b>Curriculum Vitae .....</b>	<b>57</b>
<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>59</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Gasproduktion vier verschiedener Magnesiumlegierungen bezogen auf die Einlegezeit in simulierter Körperflüssigkeit.....	21
Abbildung 2: Pin.....	28
Abbildung 3: Bearbeitetes Mimics – CT – Schnittbild: Implantat (gelb) in Knochen (grau), sowie Gasbildung (lila); Links oben: Longitudinalschnitt; Rechts oben: Transversalschnitt; Links unten: Horizontalschnitt; Rechts unten: Segmentierter Pin...	35
Abbildung 4: Pinvolumen in Prozent von ZX50 und Magox, 1. – 4. Woche; Der Abbau des Pinvolumens von ZX50 und Magox in den ersten vier Wochen, wobei der Abbau von Magox mit einer Woche Verzögerung im Vergleich zu ZX50 von statten ging. ....	40
Abbildung 5: Pinoberfläche in Prozent von ZX50 und Magox, 1. – 4. Woche; Hier zeigte sich ein Anstieg der Pinoberfläche bis zur dritten Woche, durch eine Anlagerung von Korrosionsprodukten. Ab Woche vier begann der Abbau der beiden Legierungen in nahezu gleichem Maße. ....	41
Abbildung 6: Gasvolumen absolut von ZX50 und Magox, 1. – 4. Woche; Trotz initialer Verzögerung im Abbau von Magox und geringer Gasfreisetzung kam es ab der dritten Woche zu einem rasanten Abbau mit massiver Gasfreisetzung. ....	42
Abbildung 7: Pinvolumen in Prozent von ZX50, Magox und WZ21, 1. – 24. Woche; Der Abbau von ZX50 und Magox dauerte bis zur zwölften Woche. Bei der WZ21 – Legierung degradierten 50% des Pinvolumens von Woche acht bis 21,5. ....	42
Abbildung 8: Pinoberfläche in Prozent von ZX50, Magox und WZ21, 1. – 24. Woche; Die ZX50 – und die Magox – Legierung zeigten bis zur dritten Woche einen Anstieg der Pinoberfläche und danach begann der Abbau der beiden Legierungen in nahezu gleichem Maße bis zur zwölften Woche. WZ21 zeigte über den Untersuchungszeitraum von 24 Wochen einen Zuwachs der Pinoberfläche. ....	43

Abbildung 9: Gasvolumen absolut von ZX50, Magox und WZ21, 1. – 24. Woche; ZX50 zeigte einen Abbau des Gasvolumens bis zur Woche zwölf. Das Gasvolumen bei der Magox – Legierung stieg bis zur dritten Woche und baute sich ebenfalls bis Woche zwölf ab. Die Gasbildung bei WZ21 war über den gesamten Untersuchungszeitraum moderat. ....	43
Abbildung 10: $\mu$ CT – Rekonstruktion des Degradationsverlaufs sowie der Knochenreaktion von ZX50 und Magox in 2D.a,b: 1.Woche; c,d: 2.Woche; e,f: 3.Woche; g,h: 4.Woche.....	46
Abbildung 11: $\mu$ CT – Rekonstruktion des Degradationsverlaufs sowie der Knochenreaktion von ZX50 in 2D(links) und 3D(rechts). a,b: 1.Woche; c,d: 4.Woche; e,f: 8.Woche; g,h: 12.Woche; i,j:16.Woche; k,l: 20.Woche; m,n: 24.Woche.....	47
Abbildung 12: $\mu$ CT – Rekonstruktion des Degradationsverlaufs sowie der Knochenreaktion von Magox in 2D(links) und 3D(rechts). a,b: 1.Woche; c,d: 4.Woche; e,f: 8.Woche; g,h: 12.Woche; i,j: 16.Woche; k,l: 20.Woche; m,n: 24.Woche.....	48
Abbildung 13: $\mu$ CT – Rekonstruktion des Degradationsverlaufs sowie der Knochenreaktion von WZ21 in 2D(links) und 3D(rechts). a,b: 1.Woche; c,d: 4.Woche; e,f: 8.Woche; g,h: 12.Woche; i,j: 16.Woche; k,l: 20.Woche; m,n: 24.Woche.....	49
Abbildung 14: Degradationsverlauf von ZX50, Magox und WZ21 in Mimics. a,i,g: Basisimplantat; b,i,r: 1.Woche; c,k,s: 4.Woche; d,l,t: 8.Woche; e,m,u: 12.Woche; f,n,v: 16.Woche; g,o,w: 20.Woche; h,p,x: 24.Woche.....	50

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Mechanische Eigenschaften des menschlichen Knochens und von Magnesium.....	15
Tabelle 2: Pindimensionen.....	27
Tabelle 3: Implantatzusammensetzung.....	27
Tabelle 4: Anästhesie.....	28
Tabelle 5: Narkoseantagonisierung.....	29
Tabelle 6: Postoperative Schmerztherapie .....	29
Tabelle 7: Zahl der verwendeten Implantate und Aufteilung in die entsprechende Gruppe.....	30

# 1. Einleitung

In den letzten Jahren ist das Interesse an Magnesium und seinen Legierungen als bioresorbierbare Materialien für Osteosynthesen stark gestiegen. (1;2;3;4;5;6;7). Dies liegt vor allem an der mechanischen Belastbarkeit von Magnesium und der somit verbundenen Eignung als tragendem Implantat bei der Versorgung von Knochenbrüchen.

Das dem menschlichen Knochen ähnlich große Elastizitätsmodul von Magnesium führt weiterhin dazu, dass das „Stress-Shielding“-Phänomen vermieden werden kann und der Knochen die Möglichkeit erhält in Ruhe zu regenerieren(1;2). Außerdem zeigen Magnesium – Legierungen eine gute Biokompatibilität ohne systemische Entzündungsreaktionen oder Veränderungen der zellulären Blutbestandteile (3;4;5;6). Nach Einsatz von Magnesium konnte ausserdem eine Erhöhung der Knochenwachstumsrate sowie eine erhöhte Anlagerung von Mineralien in der Umgebung von degradierten Magnesium – Implantaten nachgewiesen werden (7;8).

Könnte man Magnesium als degradierbares Osteosynthesematerial nutzen, würde eine Operation zur Entfernung der Implantate nicht mehr notwendig sein (1;2;3). Dies wäre vor allem in der Kindertraumatologie ein enormer Vorteil, um den ohnehin schon gestressten kleinen Patienten eine zusätzliche Operation, einen zweiten Krankenhausaufenthalt, sowie eine zweite Narkose zu ersparen.

Aber gerade hier gelten für biodegradierbare Materialien, die als Implantat in Frage kommen, Kriterien, die eingehalten werden sollten, damit das noch wachsende Skelett keinen Schaden nimmt:

(i) eine adäquate Stabilität der Legierung ohne Degradation während der Frakturheilung(4-6 Wochen), um die reponierten Knochen in der richtigen Position zu halten;

(ii) ein homogener Degradierungsprozess im Knochen, um die Knochenheilung nicht zu stören und eine vollständige Regeneration der Knochenstruktur innerhalb von 12 – 15 Monaten zu ermöglichen;

(iii) gute Biokompatibilität des Implantatmaterials.

Ziel dieser Studie war es, das Degradationsverhalten von verschiedenen neuentwickelten Magnesium – Legierungen zu testen. Es handelte sich um zwei schnell degradierbare Legierungen ( ZX50 und Magox), sowie eine Legierung mit langsamen Degradationseigenschaften (WZ21). Eine Legierung (Magox) wurde mit einer elektrochemischen Oberflächenbehandlung versehen, was die Degradation vor allem zu Beginn verhindern sollte. Neben der Degradation wurde die Umgebungsreaktion beurteilt (9;10).

Mittels Micro- Computertomographie ( $\mu$ CT) wird der Verlauf des Degradationsprozesses analysiert. Die Verwendung eines Micro CTs hat zum Vorteil, dass eine Beobachtung der Degradation im selben lebenden Tier erfolgen kann und so die Zahl der Versuchstiere niedrig gehalten werden kann und es können adäquate Aussagen über die Degradation eines Implantates getroffen werden.

Die quantitative Auswertung der Degradation (Volumenabnahme, Oberflächenverhalten und Gasbildung) erfolgt mit der Software „Mimics ®“

## **1.1 Magnesium als osteosynthetisches Material**

### **1.1.1 Magnesium als Grundsubstanz und dessen experimentielle Anwendung**

Magnesium ist ein Leichtmetall und weist einen ähnlichen Elastizitätsmodul, sowie vergleichbare Kompressionsstärkewerte wie der menschliche Knochen auf (1). Des Weiteren entspricht die Dichte von Magnesium annähernd der des menschlichen Knochens, wobei die Bruchfestigkeit besser ist, als jene des Knochens (1). Siehe Tabelle 1.

	Dichte (g/cm <sup>3</sup> )	E- Modul (GPa)	Kompression sstärke (MPa)	Bruchzähigkeit (MPa)
<b>Menschlicher Knochen</b>	1,8-2,1	3-20	130-180	3-6
<b>Magnesium</b>	1,74-2,0	41-45	65-100	15-40

TABELLE1: MECHANISCHE EIGENSCHAFTEN DES MENSCHLICHEN KNOCHENS UND VON MAGNESIUM

Magnesium ist ausserdem an mehr als 300 Enzymreaktionen beteiligt (11), es ist das viert-häufigste gebundene Kation im menschlichen Körper und triggert zudem den ATP-Stoffwechsel, die Proteinbildung und die neuromuskuläre Reizleitung (12).

Mehrere Studien berichten darüber, dass Magnesium osteinduktive und / oder osteokonduktive Eigenschaften aufzuweisen scheint. Gezeigt werden konnte, dass sowohl Osteoblastenproliferation (13), sowie auch die Osteoblastenadhäsionsrate (14), gesteigert wird, was wiederum eine verstärkte Knochenneubildung ermöglicht. Einige Studien konnten zeigen, dass die Magnesiumaufnahme über die Nahrung mit der Zunahme der Knochendichte positiv korreliert (15;16). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass sich die Knochendichte nach der Menopause bei Frauen durch zugeführtes Magnesium erhöhte (17). Bei Männern führte die vermehrte Magnesiumzufuhr zu einer Drosselung der Knochenresorption und ebenfalls zu einer Erhöhung der Knochendichte. (18). Magnesium ist ein wichtiges Element in unserem Körper.

### **Geschichtlicher Hintergrund:**

Die erste Verwendung der Substanz Magnesium beschrieb Lambotte 1907 (19). Er versuchte einen Unterschenkelbruch mittels einer Ostesyntheseplatte mit einer Kombination aus purem Magnesium und vergoldeten Stahlnägeln zu

versorgen. Dabei korrodierte das Magnesiummetall sehr schnell und es bildeten sich große Mengen an Gas. Das Verfahren erwies sich als für die Praxis nicht geeignet.

McBride benutzte 1938 Platten, Schrauben und Bänder aus einem Magnesium-Aluminium-Mangan-Gemisch an 20 Frakturen (20). Es zeigten sich hierbei keine lokalen oder systemischen Entzündungszeichen. Ganz im Gegenteil: es trat ein Knochenzuwachs am Periost auf, was wiederum für die osteoinduktiven Eigenschaften des Magnesiums sprach.

Znamenskii et al. fügte 1945 Magnesiumlegierungen einen 10%igen Anteil an Aluminium bei und behandelte damit 2 Männer mit Schussverletzungen an den Knochen (21). Bei beiden korrodierte das Magnesium nach 6 Wochen. Im selben Zeitraum kam es zu einer Konsolidierung der zerbrochenen Knochen.

Der Insulin-like growth factor (IGF) ist ein wichtiger Faktor für die Osteoproliferation. Liu et. al konnten 1988 in einer tierexperimentellen Studie zeigen, dass die Osteoblastenproliferation durch Magnesium in gleichem Maße wie durch den Insulin-like growth factor(IGF) stimuliert wird (13). Die Ratten, die Futter mit normalem Magnesiumgehalt erhalten hatten, zeigten signifikante Unterschiede in der Größe und der Anzahl der Osteoblasten im Bereich der distalen Femurdiaphyse im Vergleich zu jenen Tieren, die Futter mit erniedrigtem Magnesiumgehalt erhalten hatten. Die magnesiumarme Diät sorgte für eine Verringerung der Größe und der Anzahl der Osteoblasten bei jenen Tieren, die die Diät erhalten hatten. Die Ergebnisse einer anschließenden in vitro Untersuchung, bei der die Proliferationsraten von Osteosarkoma – Zellen der Ratte in Lösungen mit unterschiedlicher Magnesiumkonzentration gemessen wurden, untermauerten die Ergebnisse der vorherigen in vivo Studie (13): die Proliferation der Osteosarkomzellen wurde durch das in den Lösungen vorhandene Magnesium klar stimuliert.

Gegen Ende des 20. Jahrhunderts wurden Magnesiumlegierungen für die Wissenschaftler erneut interessant. Ab diesem Zeitpunkt gelang es einfacher, die Magnesiumlegierungen mit anderen Materialien zu versetzen und zu

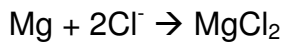
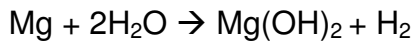
kombinieren, um so die Korrosionsbeständigkeit zu erhöhen und eine biokompatible und bioresorbierbare Magnesiumlegierung zu schaffen (23).

Witte et al. (7) führten eine Untersuchung an Meerschweinchen mit 4 verschiedenen Magnesiumlegierungen und Polylactid-Implantaten (SR-PLA96) durch. Diese Forschungsgruppe konnte feststellen, dass nach 6 bzw. 18 Wochen postoperativ mehr mineralisiertes Knochengewebe um Mg-Legierungs-Implantate zu finden war, als um die Polylactid Implantate. Im Rahmen der Studie kam die Frage auf, ob eine erhöhte Magnesium-Konzentration zu einer Erhöhung der Proteintranslation von Kollagenproteinen( z.B. Kollagen Typ I), führen könnte, da Magnesium entscheidend bei der Translation von m-RNA in Polypeptide beteiligt ist. Eine vermehrte Osteoidanlagerung um das zerfallende Mg-Implantat könnte hiermit erklärt werden.

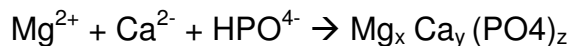
### **1.1.2 Degradationsverhalten von Magnesium**

Magnesium als bioresorbierbares Material wird im Körper abgebaut. Es wird im Körper verstoffwechselt und seine Bestandteile anschließend über z.B. Urin wieder ausgeschieden (24). Dabei spielen mehrere Eigenschaften des Materials wie die kristalline Struktur, die Porosität, die Reinheit, die Geometrie sowie das Molekulargewicht eine entscheidende Rolle (23;24). Auch das Milieu, in welches das Implantat in vitro oder in vivo eingebracht wird, ist von großer Bedeutung. Durch das Milieu kann die Reaktionsgeschwindigkeit, mit der bioresorbierbare Materialien abgebaut werden (23;24), beeinflusst werden. In einem weniger gut vaskularisiertem Gebiet (z.B. Knorpel) kommt es zu einem weniger schnellen Abbau als in gut durchblutetem Gewebe (z.B. Markraum des Knochens).

Staiger et al. beschrieben den Korrosionsprozess von reinem Magnesium in chlorhaltiger, wässriger Lösung in vitro durch folgende chemische Formeln(1):



Zhang et al. (22) und Xu et al.(25), untersuchten das Korrosionsverhalten von Mg-Mn-Zn Implantaten im Rattenfemur und nahmen an, dass sich Magnesium, wenn es mit Blut in Kontakt getreten ist, beginnt aufzulösen, was sich durch den pH – Wert des Blutes (7,4 bis 7,6) erklären lässt. Ein pH – Wert unter 11,5 erhöht nämlich die Korrosion von Magnesium in wässriger Lösung, so wie Blut es eine ist (26). Durch die steigende  $\text{Mg}^{2+}$ - Konzentration im Blut ( enthält  $\text{Ca}^{2+}$  -,  $\text{PO}_4$  - und  $\text{Cl}^-$  - Ionen) in der Umgebung des Implantates bildete sich in weiterer Folge ein Kalziumphosphatniederschlag auf der Magnesiumoberfläche. Die chemische Reaktion dahinter lautet wie folgt:



Somit kommt es zur Knochenneubildung durch die Anlagerung von biologischem Kalziumphosphat an der Oberfläche des Implantates (22;25).

In einigen früheren Studien untersuchte man die Bildung von Hydroxylapatiten ( $\text{Ca}_5[\text{OH}](\text{PO}_4)_3$ ), die als Ca-haltige Schichten auf Titanoberflächen gebildet wurden (27). Auch bei Magnesiumlegierungen war es denkbar, dass sich Hydroxylapatite durch die im Blut befindlichen Ionen bilden und anlagern konnten. Witte et al. konnten dies schon mit einer Studie im Jahr 2005 nachweisen (7).

Hydroxylapatite haben die Eigenschaft chemische oder physiologische Vorgänge positiv stimulierend zu beeinflussen, was sich positiv auf die Knochenregeneration auswirkt. Als Beispiel ist hier die Oberflächenbeschichtung von Titan-Implantaten mit Hydroxylapatiten anzuführen: bewirkt durch die Hydroxylapatitschichten, führt die Erhöhung der Osseointegration zu einem

bindegewebsfreien Verbund zwischen menschlichem Knochen und Implantatoberfläche, einer sogenannten Verbundosteogenese (28;29;30).

Auch am Rand der Magnesiumpins kann sich eine Abbau – Schichte aus Kalziumphosphat und daran adhärierenden Hydroxylapatitkristallen bilden. Dieser Komplex, der mittels Element - Analyse nachgewiesen wurde, vermag die Korrosionsrate herabzusetzen (7).

Die Abbaufragmente im Rahmen der Magnesiumdegradation werden von Riesenzellen und Makrophagen resorbiert und das resorbierte Magnesium wird anschließend dem Blut oder Lymphsystem zugeführt. Danach erfolgt die Einlagerung in Knochen oder Muskel. Die Regulation des Magnesiumhaushaltes erfolgt in der Niere. Ein Überschuss wird über den Harn ausgeschieden, während die Wiederaufnahme in der Henle´schen Schleife der Niere erfolgt und über die Plasmakonzentration der Magnesiumionen gesteuert wird (31).

## **1.2 Manipulation des Degradationsverhaltens**

Welche Möglichkeiten gibt es, um die mechanischen Eigenschaften von Magnesium zu verbessern, damit es für die Forschung, sowie für die mögliche spätere klinische Anwendung korrosionsbeständiger wird?

### **1.2.1 Legierung**

Gu X. et al. zeigten 2009 in einer Untersuchung, dass der Zusatz von Silizium(Si), Zinn(Sn), Zink(Zn), Aluminium(Al) oder Zirkonium(Zr) zu einer Erhöhung der mechanischen Belastbarkeit führten und, dass Aluminium(Al), Mangan(Mn), Zink(Zn), Zirkonium(Zr), sowie auch Yttrium(Y) die Korrosionsbeständigkeit in simulierter Körperflüssigkeit sowie Hank´scher Lösung verbesserten(32).

Hierzu gibt es auch Daten von Hänzi et al. , ebenfalls aus dem Jahr 2009 (33;34): Es wurden Mg-Y-Zn Legierungen mit Kalzium – Anteilen untersucht (WZ21). Man zeigte nicht nur, dass diese Legierungen eine hohe Dehnbarkeit von

17-20% aufzuweisen hatten, sondern auch, dass sie, bedingt durch die Zusammensetzung, über eine hohe Zugfestigkeit(250 – 270 MPa) und ein gutes Degradationsverhalten verfügten (34). Genannte Legierungen wurden mit Mg – Zn Legierungen, die Spuren von Kalzium und Mangan (ZX50) enthielten, verglichen. Es wurde festgestellt, dass ZX50 ebenso wie WZ21 eine parabolische Abnahme der Korrosionsrate aufzuweisen – dennoch gab es einige Unterschiede (34):

Die WZ21 Legierung war wesentlich korrosionsbeständiger im Vergleich zu ZX50. WZ21 zeigte in den ersten 7 Tagen ein homogenes Erscheinungsbild, wo hingegen ZX50 schon korrosionsbedingte Unterschiede zu erkennen gab. Die Korrosionsbeständigkeit von WZ21 wurde durch eine Anlagerung von Korrosionsprodukten rund um das Implantat bedingt, wodurch der Abbau weniger schnell von statten ging, als bei ZX50. Noch beachtenswerter ist jedoch die Tatsache, dass ZX50 in etwa 5x mehr Wasserstoffgas produzierte als WZ21. Hier zeigte sich ,dass es unter anderem die Beimengung von Yttrium bei der WZ21 – Legierung war, die dessen Korrosionsresistenz erhöhte und die Bildung von Wasserstoffgas reduzierte (34;35)( siehe Abbildung 1). Diese Tatsache ist besonders für eine mögliche klinische Anwendung der Legierung relevant, da die Gasbildung hierfür so klein als irgendwie möglich sein sollte.

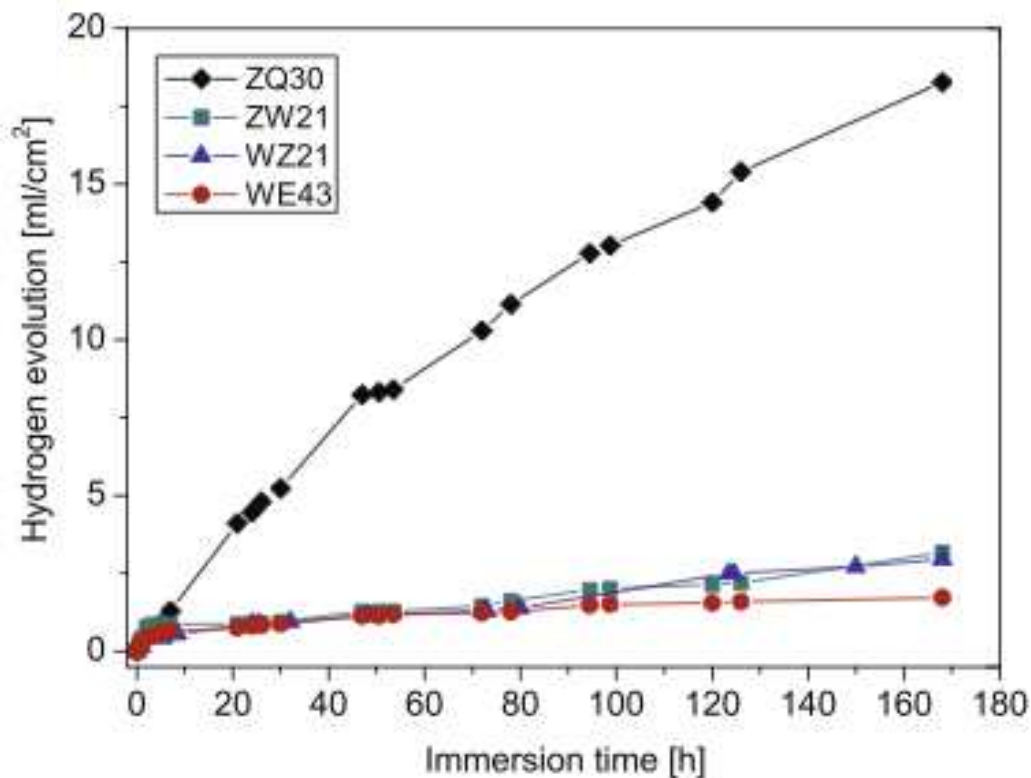


ABBILDUNG 1: GASPRODUKTION VIER VERSCHIEDENER MAGNESIUMLEGIERUNGEN BEZOGEN AUF DIE EINLEGEZEIT IN SIMULIRTER KÖRERFLÜSSIGKEIT (5)

### 1.2.2 Coating

Eine weitere Möglichkeit die Korrosionsbeständigkeit von Magnesium – Legierungen zu erhöhen ist „Protektives Ummanteln“ oder auch „Coating“ genannt(35). Dies kann mit verschiedensten Substanzen erfolgen. Hier sind das Polymer – Coating (36;37), das Phospaht – Coating (38), das Hydroxylapatit – Coating(39) und das Fluorid – Coating(40) zu erwähnen. Bei all diesen Verfahren kommt es durch Verdickung und Zunahme der Porengröße der jeweiligen obersten Materialsicht zu einer Erhöhung der biomechanischen Belastbarkeit, sowie der Korrosionsbeständigkeit der Magnesium-Legierungen (36;37;38;39;40).

### **1.2.3 Micro – arc – Oxidation**

Ein wiederum anderes Verfahren um Magnesium – Legierungen biomechanisch stabiler und korrosionsbeständiger zu machen nennt sich „Micro-arc Oxidation“, oder „MAO“ (41;42;43).

Zhang et al. zeigten in einer Untersuchung an einer AZ91D – Magnesiumlegierung, dass eine Micro-arc Oxidation in Hank´scher Lösung die Abriebfestigkeit, sowie das Korrosionsverhalten positiv zu beeinflussen vermochte(41).

Yang et al fügten einer AZ91D – Legierung Calcium(Ca) und Phosphor(P) hinzu und zeigten nach stattgefunder MAO, dass diese Oberflächenmodifikation ebenfalls zu einer Erhöhung der Korrosionsbeständigkeit und Dichte der untersuchten Magnesiumlegierung geführt hatte(42).

Bei den in dieser Studie verwendeten Magox – Pins handelt es sich um ZX50 – Pins, deren Oberfläche mittels MAO modifiziert wurde.

#### **Darstellung der Micro – arc – Oxidation an einer Magnesium – Legierung?**

Bei der Micro – arc – Oxidation handelt es sich um eine elektrochemische Oberflächenbehandlung, bei der Oxide-Coatings an Metalloberflächen entstehen (42). Bereits Zhang et al. (41) behandelten eine AZ91D – Magnesiumlegierung in ihrer Versuchsreihe mittels MAO.

Mittels 2er Elektroden werden Spannungen über 300 Volt an die Legierung angelegt, bis das dielektrische Durchschlagspotential der oberflächlichen Oxidschicht der Magnesiumlegierung überschritten wird und es so zum Ausstoß von Ladungen kommt (44;45). Diese Entladungen führen zu lokalisierten Plasma – Reaktionen, die die Oxid – Schicht im Zuge von Schmelz – und Reorganisationsprozessen dicker und korrosionsbeständiger macht (35;46).

## 1.3 Physiologie der Knochenheilung

Grundsätzlich ist man in der Traumatologie und der Orthopädie bestrebt, Bohrlöcher möglichst passgenau zu wählen, um so bei der enossalen Implantation eine optimale Stabilität des Implantates zu gewährleisten. Im bestmöglichen Fall müssen dann nur wenige  $\mu\text{m}$  bis mm Knochen neu gebildet werden, um Knochen und Implantat zu verbinden.

### 1.3.1 Knochenregeneration und Modeling/Re-modeling

In Untersuchungen von Johner (47) wurde gezeigt, dass kleine kortikale Knochendefekte unter 0,5 mm Durchmesser durch konzentrische Lagen von Lamellenknochen verschlossen werden, welcher bis zu 1  $\mu\text{m}/\text{Tag}$  durch appositionelles Wachstum gebildet werden kann. Bei allen Defekten, die größere Durchmesser aufweisen, muss zuerst aus Stabilisierungsgründen ein Gerüst aus Geflechtknochen gebildet werden. Die Bildung von Geflechtknochen erfolgt jedoch schneller – es kann mit einer Zuwachsrate von über 4  $\mu\text{m}/\text{Tag}$  gerechnet werden kann.

Die Unterschiede zwischen Lamellenknochen und Geflechtknochen bestehen – neben der unterschiedlichen Wachstumsgeschwindigkeit - darin, dass der Geflechtknochen weniger mineralisiert ist als der Lamellenknochen. Der Geflechtknochen verfügt darüber hinaus über eine regelmäßige, fast parallele Anordnung von Kollagenfibrillen. Sein intratrabekulärer Raum wird anschließend durch den lamellären Knochen aufgefüllt und erhält schließlich durch Remodelingprozesse seine belastungsfähige Struktur (48).

#### **Was bedeutet Modeling bzw. Re-modeling?**

Beim Begriff Modeling handelt es sich um Knochenbildungsvorgänge an Orten, an denen zuvor noch kein Knochen vorhanden war (49).

Entwicklungsbedingt wird an vorbestimmten Orten des menschlichen Körpers mineralisiertes Gewebe abgelagert und zur Form eines Knochens modelliert (50;51). Modeling kann jedoch auch im Erwachsenenalter auftreten. Dabei kommt

es bei biomechanischen Belastungen zu einer Änderung der Knochenform oder einzelner Knochenstrukturen (52).

Unter dem Begriff Re-modeling werden Knochenbildungsprozesse an Stellen verstanden, wo zuvor schon einmal Knochengewebe zu finden war. Neue, frisch mineralisierte Knochensubstanz ersetzt hierbei altes, abgenutztes oder zerstörtes Knochengewebe (50). Beim Re-modeling wird durch die Erneuerung des Knochens die Funktionalität aufrecht erhalten. Es kommt hierbei aber zu keiner Veränderung in der Größe oder Form des Knochens (52;53).

Prinzipiell können zwei Arten von Re-modeling unterschieden werden:

1) primäres Re-modeling: Hierbei ersetzt ein höherorganisierter Lamellenknochen den ursprünglich gebildeten Geflechtknochen.

2) sekundäres Re-modeling: Beim sekundären Re-modeling wird ein beschädigter Knochen durch neu gebildetes Knochengewebe ersetzt. Hiermit soll die Funktionalität aufrecht erhalten werden (54). Dieser Prozess existiert zeitlebens mit abnehmender Geschwindigkeit. Knochen wird an Orten der Belastung aufgebaut und an Orten ohne Belastung abgebaut - entsprechend dem Wolff – Roux`schen Gesetz.

Beispiel für ein sekundäres Re-modeling ist eine einfache Fraktur eines Röhrenknochens. Im Rahmen der Fraktur kommt es zu einer Unterbrechung der Blutversorgung und dadurch zur Nekrose der Knochensubstanz.

Im Reparationsprozess wird zunächst die Blutung durch Ausbildung eines Koagulums sowie durch die Ausbildung von Granulationsgewebe gestillt (56). Neue Gefäße bilden sich. Dann erfolgt eine Aktivierung der an der Knochenheilung beteiligten Zellen. Hierbei werden sowohl Osteoklasten – die das nekrotische Gewebe wegräumen - als auch Osteoblasten - die für den Aufbau von neuem Knochen verantwortlich sind - aktiviert. Die gemeinsame Arbeit von Osteoblasten und Osteoklasten wird als „basic multicellular unit“ oder BMU bezeichnet (57). Nach der Differenzierung von Osteoklasten – Vorläuferzellen zu reifen Osteoklasten, heften sich diese an die Knochenoberfläche um alten,

nekrotischen Knochen zu resorbieren. Altes Knochengewebe wird dann durch frisches ersetzt. Dies geschieht mit einer Geschwindigkeit von bis zu 5µm/Tag (51).

Es entsteht ein sogenannter „cutting cone“, eine zylindrische Resorptionslakune mit 300 – 500 µm Länge und 200 µm im Durchmesser. Danach folgt die Apoptose der Osteoklasten. Jetzt treten die Osteoprogenitor Zellen (Osteoblasten-Vorläuferzellen) in den Vordergrund, die ebenfalls über Blutgefäße in das zu organisierende Knochengebiet transportiert worden sind. Sie differenzieren sich zu reifen Osteoblasten und beginnen mit der Bildung von Osteoid (nicht mineralisierte Knochenmatrix). Osteoid wird im kortikalen Knochen lamellär entlang der Kanalwand angelagert. Reifer Lamellenknochen entsteht hier innerhalb von 8-10 Tagen, wobei eine vollständige Mineralisation Jahre dauern kann. Ein Teil der Osteoblasten wird in die extrazelluläre Matrix eingebaut und es entstehen Osteozyten (Osteoblasten ohne Osteoid- Sezernierung). In weiterer Folge kommt es zur Bildung von „bone lining Zellen“( Osteoblasten, die zur Aufrechterhaltung der Homöostase, bei kleinen Knochendefekten und bei Remodelingprozessen eingesetzt werden können). Der Signalaustausch von bone lining Zellen und Osteozyten erfolgt über gap-junctions und das so entstandene Gesamtgebilde für den kortikalen Knochen wird als Haversches System bezeichnet (49).

### **1.3.2 Physiologie der Osseointegration und Implantatheilung**

Der Begriff „Osseointegration“ bedeutet, dass es zur Bildung einer direkten funktionellen und strukturellen Verbindung zwischen der Oberfläche des Implantats und des lebenden Knochens kommt (58). Der entstandene Knochendefekt wird durch die Bildung neuen Knochens behoben. Die stattfindenden Anpassungs- und Reifungsprozesse führen dazu, dass die Knochen trabekel und Fibrillenfasern der Situation entsprechend modelliert werden und damit eine optimale Belastungsfähigkeit erhalten (59).

### 1.3.3 Implantateinheilung

Bei der Einheilung von Implantaten sind zwei wichtige Mechanismen von Bedeutung: Kontaktosteogenese und Distanzosteogenese. Bei der Distanzosteogenese geht die Osseointegration des Implantats lediglich von der Seite der Defektwand aus (z.B. bei Implantaten aus reinem Titan). Es erfolgt die Bildung einer bindegewebigen Kapsel mit parallel zur Implantatoberfläche verlaufender Faserordnung.

Bei der Kontaktosteogenese wird der vorhandene Defekt sowohl von der Implantat- als auch von der Defekt-Seite her aufgefüllt. Osteoblasten dringen dabei bis zur Implantatoberfläche vor. Anschließend wird Knochenmatrix sezerniert (60).

Die Defektheilung bei der Kontaktosteogenese läuft nach folgendem Schema ab (61;62):

Nach dem Bohren eines Implantatbettes und der Entstehung eines Koagulums, adhären Blutplättchen an die Oberfläche des Implantats und werden dabei aktiviert. Es kommt dann, durch die Aktivierung der Blutplättchen, zu einer Freisetzung verschiedener Mediatorsubstanzen (Wachstumsfaktoren wie z.B. PDGF, EGF, vasoaktive Substanzen wie Histamin bzw. Serotonin). Durch diese Substanzen wird der gesamte Prozess der Kontaktosteogenese gesteuert.

Die Proliferation und Differenzierung von Osteoblasten und Knochenmark – Stammzellen wird über Wachstumsfaktoren stimuliert. Die Bildung neuer Blutgefäße wird durch die vasoaktiven Substanzen getriggert. Chemotaktisch wirkende Substanzen führen zu einer Anhäufung von z.B. neutrophilen Granulozyten und Mastzellen an der „beschädigten“ Stelle am Knochen. Die mesenchymalen Zellen, sowie die Osteoblastenvorläuferzellen, welche zuvor durch den von den Stoffwechselprodukten entstandenen Dichtegradient angelockt wurden, fangen an, an den Fibrinfäden entlang zu wandern. Diese hier erwähnten Fäden, welche am Implantat angewachsen sind, können immensen Zugkräften standhalten. Dadurch ist es den Osteoprogenitor – Zellen möglich, bis an die Implantatoberfläche zu wandern wo sie - nach ihrer Differenzierung zu Osteoblasten - mit der Sezernierung von Osteoid beginnen. Dabei wird der Defekt

nun wie bereits oben beschrieben von der Implantat- bzw. von der Defektseite her behoben.

## 2. Material und Methodik

### 2.1 Implantate

In dieser Studie wurden drei zylindrisch geformte, kristalline, glatte Pins ohne Gewinde verwendet. Die Implantat – Typen waren von gleicher Dimension (siehe Tabelle 2). Alle drei Implantattypen gehören zu einer Gruppe bioresorbierbarer Magnesiumlegierungen, deren genaue Zusammensetzung in Tabelle 3 ersichtlich ist. Die Implantate sind mit WZ21, ZX50 und „Magox“ (ZX 50 behandelt mit Micro-arc – Oxidation) bezeichnet.

	Länge	Durchmesser
ZX50	8mm	1,6mm
WZ21	8mm	1,6mm
Magox	8mm	1,6mm

TABELLE 2: PINDIMENSIONEN

	Magnesium	Zink	Kalzium	Mangan	Yttrium
LV1	94,60%	5%	0,25%	0,15%	-
WZ21	96,60%	1%	0,25%	0,15%	2%
Magox	Dieselbe Legierungszusammensetzung wie ZX50 aber mit Micro-arc Oxidation behandelt				

TABELLE 3: IMPLANTATZUSAMMENSETZUNG

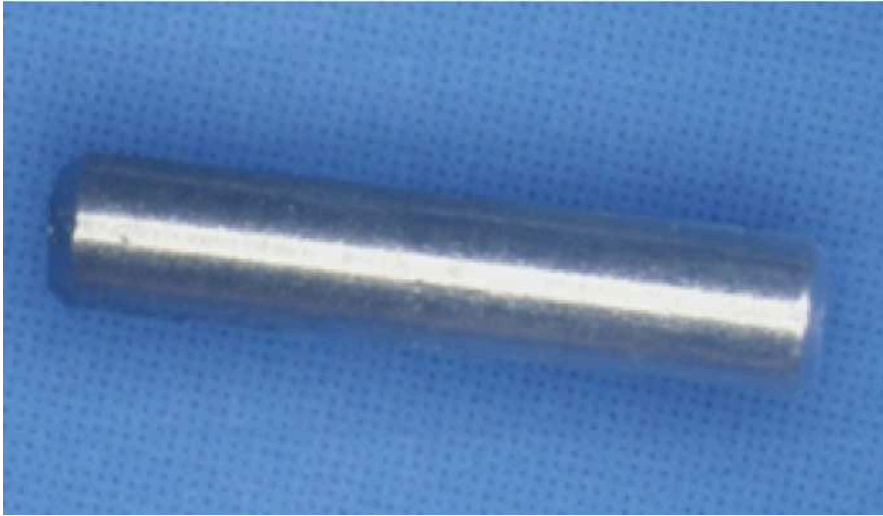


ABBILDUNG 2: PIN

## 2.2 Pharmaka

Alle verwendeten Pharmaka sind in den folgenden Tabellen ersichtlich.

Name	Wirkstoff	Dosierung	Hersteller
<b>Fentanyl®</b>	Fentanyl	50µg/ml	Janssen-Cilag GmbH, Neuss, Germany
<b>Midazolam Delta®</b>	Midazolam	1mg/ml	Deltaselect GmbH, Dreieich, Germany
<b>Domitor®</b>	Medetomedin	1mg/ml	Pfizer Corp. Austria GmbH, Vienna, Austria
<b>Auqatears®</b>	Carbomer 974P		Ciba Vision, Wien
<b>Forane®</b>	Isofluran		Abbot Laboratories Ltd, Kent, England

TABELLE 4: ANÄSTHESIE

Name	Wirkstoff	Dosierung	Hersteller
<b>Narcanti</b> ®	Naloxon	400µg/ml	Torrex Chiesi Pharma GmbH, Vienna, Austria
<b>Anexate</b> ®	Flumazenil	100µg/ml	Roche Austria GmbH, Vienna, Austria
<b>Antisedan</b> ®	Atipamazol	5mg/ml	Pfizer Corp. Austria GmbH, Vienna, Austria

TABELLE5: NARKOSEANTAGONISIERUNG

Name	Wirkstoff	Dosierung	Hersteller
<b>Dipidolor</b> ®	Piritramid	4: 50 Glucose 5% : 150	Janssen-Cilag GmbH, Neuss,
<b>Rimadyl</b> ®	Carprofen	0,5ml; 1 : 50 Nacl	Pfizer Corporation Austria

TABELLE 6: POSTOPERATIVE SCHMERZTHERAPIE

## 2.3 Experimentielles Design

Insgesamt wurden 21 (Drop-out Rate: 3 Tiere) männliche Sprague – Dawley Ratten zur Versuchsdurchführung verwendet. Die Tiere wurden alle vom Institut für Labortierkunde und Genetik in Himberg (Medizinische Universität Wien) geliefert und waren bei ihrer Aufnahme in das biomedizinische Forschungsinstitut Hahnhof 5 Wochen alt. Sie hatten ein Gewicht von 175g bis 245g. Die Zulieferung der Tiere erfolgte 7 Tage vor Operationsbeginn, damit die Tiere genug Zeit hatten sich zu aklimatisieren. Die Tierversuche wurden vom österreichischen Bundesministerium für Wissenschaft und Forschung (Zulassungsnummer: BMWF-66.010/0113-II/10b/2009) gemäß BGBl. genehmigt.

Die Tiere waren während des Studienzeitraums im Tier – Labor des Instituts für Biomedizinische Forschung (Medizinische Universität Graz) untergebracht. Die Haltung erfolgte jeweils zu viert in einem Käfig. Ein 12:12 Stunden Licht – Dunkel – Zyklus simulierte den Wach – Schlaf – Rhythmus.

Die Unterteilung der 21 Sprague – Dawley – Ratten erfolgte randomisiert in drei Gruppen:

Die Ratten aller drei Gruppen erhielten links und rechts einen Pin aus der jeweiligen Legierungsgruppe transcortical metadiaphysär in den distalen Femur implantiert. Die Gruppeneinteilung ist Tabelle 7 zu entnehmen.

	Implantat	Anzahl
Gruppe 1	WZ21	7
Gruppe 2	ZX50	7
Gruppe 3	„Magox“	7

TABELLE 7: ZAHL DER VERWENDETEN IMPLANTATE UND AUFTEILUNG IN DIE ENTSPRECHENDE GRUPPE

## 2.4 Präoperatives Vorgehen und Anästhesie

Die Operationsvorbereitung der Tiere erfolgte im Kleintier – OP des Biomedizinischen Forschungsinstituts der Medizinischen Universität Graz.

Jedes Tier wurde zunächst gewogen und erhielt dann eine Inhalationsnarkose mit Forane ®. Nach dem Einschalfen wurde zusätzlich eine subkutane Narkose mit Midazolam Delta ® sowie eine Analgesierung mit Fentanyl ® und Dormitor ® durchgeführt.

Der zu operierende Bereich des Oberschenkels wurde mit einem Elektrorasierer (Siemens ®) vorbereitet und die Augen der Tiere zum Lichtschutz mit AquaTears ® eingetrofft. Um die Tiere intraoperativ gegen eine Auskühlung zu schützen erfolgte die Operation auf einer abgedeckten Styropor –Unterlage.

## **2.5 Operativer Verlauf**

Ein ca. 2cm langer Hautschnitt quer zum Femur der Ratte wurde am distalen lateralen Femur angelegt. Mit einer Präparierschere wurden anschließend die dem Femur entlang verlaufenden Muskeln (Extensoren und Flexoren) des Kniegelenks in Längsrichtung gespalten, bis der Knochen im Bereich des meta – diaphysären Endes einsehbar war.

Der Knochen wurde dann mit 2 Pinzetten gefasst und fixiert. Jetzt erfolgte die transkortikale Bohrung mit einem 1,5mm Knochenbohrer (Synthes ®) mit aufsteigendem Durchmesser senkrecht zur Längsachse der Femurdiaphyse. Die Bohrungen wurden bei niedriger Drehzahl von 200 Umdrehungen pro Minute und reichlicher Wasserkühlung mit physiologischer Kochsalzlösung mittels einer Spritze durchgeführt, um Reibungswärme und thermische Nekrosen zu minimieren. Das zylindrische Implantat wurde durch leichtes Klopfen eingeführt, was zu einem einheitlichen Sitz führte. Nach der transkortikalen Platzierung wurde darauf geachtet, dass das OP-Feld gründlich mit physiologischer Kochsalzlösung gespült und die Wunde anschließend schichtweise verschlossen wurde. Danach wurde die contra-laterale Seite in der gleichen Weise und unter Verwendung der gleichen Art des Implantats operiert.

Die operierte Ratte wurde anschließend auf ein Wärmekissen(37°C) gebettet, damit es zu keiner Unterkühlung des Tieres kommen konnte. Auf dem Wärmekissen erfolgte die Antagonisierung der Narkose intraperitoneal mit einer Mischung aus Antisedan ®, Narcanti ® und Anexate ® .

## **2.6 Postoperative Behandlung und postoperatives Schmerzmanagement**

Nach dem Abklingen der Narkosewirkung wurden die Ratten in deren Kleintierkäfig gesetzt und anschließend in den Tierstall zurückgebracht. Zur postoperativen Schmerzbehandlung erhielten die Tiere einmalig Rimadyl ® und für weitere 7 Tage Dipidolor ® ins Trinkwasser. Postoperativ war es den Ratten erlaubt, sich frei in den Käfigen unter uneingeschränkter Belastung zu bewegen.

Eine tägliche klinische Beobachtung der Tiere wurde während der gesamten Studiendauer durchgeführt.

## **2.7 Mikro –CT / Small Animal Imaging**

Die Scans mit dem Inveon Mikro – CT der Firma Siemens ® erfolgten im 1. Monat in einem wöchentlichen Abstand. Der erste Scan wurde am 7. postoperativen Tag durchgeführt. Weitere Scans folgten am 14. postoperativen Tag, und am 21. postoperativen Tag sowie am 28. postoperativen Tag. .Anschließend wurden die Scans nur mehr monatlich durchgeführt (2., 3., 4. 5. Und 6. Postoperativer Monat).

Zur Durchführung des Mikro-CTs erhielten die Ratten eine kurze neuerliche Inhalationsnarkose mit einem Isofluran – Sauerstoff – Gemisch (2%Flurane mit 2% Sauerstoff bei einem Flow von 2l/min).

Die Microfocus Computertomographie ( $\mu$ CT) ist eine neue Technologie, die sowohl nicht-invasive gewebeerhaltende Bildgebung und quantitative Morphometrie der Knochenstruktur in 3D ermöglicht (63;64).

Die Ratten wurden mit Hilfe des Inveon Acquisition Workplace 1.2.2.2 gescannt. Die Scans wurden bei 70kV Spannung, 500  $\mu$ A Strom und mit einer Belichtungszeit von 1000 ms durchgeführt. Rotationen von 210 Grad bei 180 Rotationsschritten machten eine Abbildung des ganzen Oberschenkelknochens mit einer effektiven Auflösung von 35,55  $\mu$ m möglich.

Die Mikro – CT – Bilder wurden durchgesehen, um für die weitere Datenauswertung mit der Mimics – Bildverarbeitungssoftware ® (Version14.0, Materialise, Leuven, Belgium) die am besten geeigneten Bilder zu finden. Folgende Kriterien über die Pins und ihrer Lage im Knochen waren Voraussetzung für die Bildbearbeitung mit Mimics®:

- Keine Knochenfraktur und mediale und laterale Corticalis intakt.

( Hintergrund: Da ein frakturierter Knochen zu einer Knochenfehlstellung führen kann und immer zu Kallusbildung führt. Somit kommt es zu geänderten Degradationsbedingungen für den Pin. Zusätzlich sind Resorptionsverhalten des Pins und die Gasbildung aus den erstellten CT – Bildern schlecht bis kaum ersichtlich).

- Keine Bewegungsartefakte in den Bildern, da sonst keine weitere exakte Auswertung möglich ist.
- Keine Verwendung von vollständig dislozierten Pins. (der Pin liegt außerhalb des Knochens).
- Keine Verwendung von monokortikal gelegenen Pins (der Pin durchdringt nur eine Kortikalis).

## 2.8 Mimics – Auswertung

Mimics ® (Version 14.0, Materialise, Leuven, Belgium) ist eine Bildverarbeitungssoftware, die in der 3D Reconstruction medizinischer Abbildungen (CT, MRT, Micro-CT etc.) Anwendung findet. Mit ihr ist es möglich 2D – Daten mit höchster Präzision in 3D anzuzeigen. Es besteht die Möglichkeit der Einzelbearbeitung von Bilderserien, der Segmentierung einzelner Pixelbereiche, Flächen – sowie die Möglichkeit von Volums – Berechnungen.

Das verwendete Datenformat ist ein DICOM – file ( Digital Imaging and Communications in Medicine). Dieses Datenformat enthält ein Kommunikations – Protokoll um zwischen den verschiedenen Systemen einen Datenaustausch zu ermöglichen. Aber auch das Einlesen von z.B. JPEG ( Synonym für Joint Photographic Experts Group ®) – und BMP( Bitmap Image File ®) – Files ist möglich.

Von den Mikro – CT – Bildern, die den Beurteilungskriterien am besten entsprachen, wurden - unter Zuhilfenahme des Inveon Research Workplace 3.0 ® (Siemens Medical Solutions, USA) - DICOM (Digital Imaging and Communications in Medicine) – Files erstellt und auf eine externe Festplatte exportiert. Von der externen Festplatte wiederum erfolgte der Transport auf den Mimic´s Datenserver.

Durch die Mimics ® – Bildverarbeitungssoftware (Version 14.0, Materialise, Leuven, Belgium) war es wiederum möglich erneut auf die Daten zuzugreifen und bearbeitbare Schnittbilder zu erstellen. Als Beispiel für ein solches Bild dient Abbildung 5.

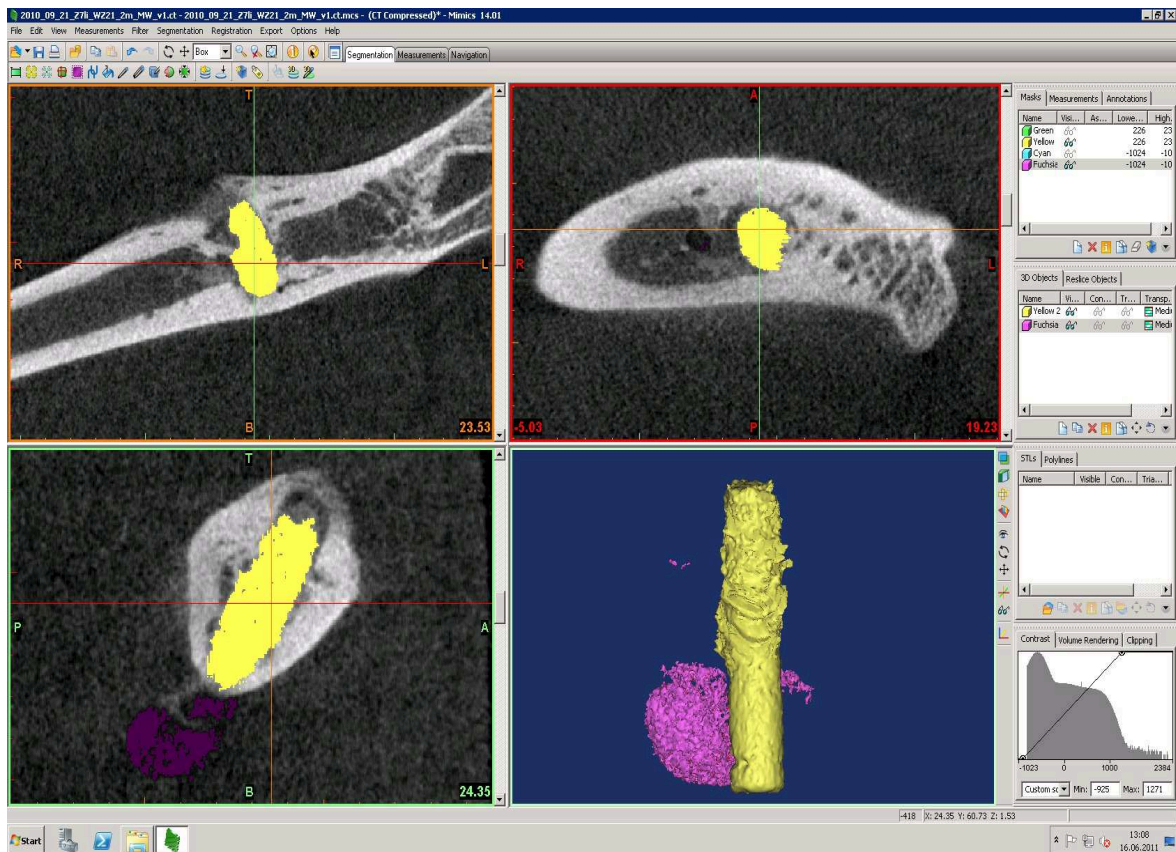


ABBILDUNG 3: BEARBEITETES MIMICS – CT – SCHNITTBILD: IMPLANTAT(gelb) IN KNOCHEN(grau), sowie GASBILDUNG(lila); Links oben: LONGITUDINALSCHNITT; Rechts oben: TRANSVERSALSCHNITT; Links Unten: HORIZONTALSCHNITT; Rechts Unten: SEGMENTIERTER PIN

Der Auswertungsvorgang gestaltete sich wie folgt:

Nach dem Datenimport der CT – Schnittbilder( ca. 250 Schichten pro CT – Bild) wurden zunächst Achsen in das Bild hineingelegt, wobei „medial“ der Femurinnenseite entsprach bzw. „lateral“ der Femuraussenseite. Dem Femurkopf hin zustrebend wurde als „posterior“ bezeichnet. „Anterior“ wurde als dem Kniegelenk hin zustrebend bezeichnet. Anschließend wurde ein „Treshold“ (engl. für „Schwelle“) für das gesamte Bild festgelegt, umso alle Gewebe mit der gleichen Dichte markieren zu können. Dem Treshold konnte eine beliebige Farbe

zugewiesen werden. Der Treshold wurde in Hounsfield – Einheiten(HU), angegeben und betrug 226 bis 3071 HU, was der Dichte des Knochens entsprach.

Mit Hilfe des Tresholds wurden jetzt alle Bereiche mit gleicher Dichte erfasst und vom Programm mit der vorher gewählten Farbe markiert. Gleiche Dichte hatten sowohl Knochen – Gewebe als auch Pinmaterial. Um jetzt Pin und Knochen voneinander unterscheiden zu können, war es notwendig, die Schnittbilder Schicht für Schicht zu bearbeiten.

In jedem einzelnen Schnittbild musste daher Knochengewebe vom Pin „entfernt“ werden. Hierzu diente die Funktion „Edit Mask“.

Mit „Region Growing“, einem Bildsegmentierungsverfahren, welches es möglich macht verschiedene Bildelemente über mehrere Schichten zu Regionen zu verschmelzen, wurde der Pin als Ganzes markiert.

Über „Calculate 3D“ , war es dann möglich ein dreidimensionales Bild des markierten Pins zu erstellen und Fläche und Volumen des Implantates(Pins) abzulesen.

Über diese genannten Einzelschritte wurden aber nicht nur die Daten des Implantates errechnet, sondern auch das extra- und intramedulläre Gasvolumen, welches durch die Abbauvorgänge entstanden war.

Für die Gasvolumenbestimmung war allerdings ein anderer „Treshold“ über dem gesamten Bild erforderlich. Sein Wert betrug -1024 bis -1000 HU; (der Wert von Luft liegt bei -1000 HU). Alle intra- und extramedullären Gasvolumina wurden durch alle Schichten hindurch markiert. Mit „Edit Mask“ war es anschließend möglich, das „gekennzeichnete“ Gas herauszufiltern. Das Ablesen des Gas-Volumens bzw. der Gas-Oberfläche wurde ebenso wie bei den Implantaten nach dem „Calculate 3D“ – Vorgang vorgenommen.

## **2.9 Datenauswertung/Statistik**

Für eine statistische Analyse der  $\mu$ CT-Daten wurden sechs femorale Ratten-Knochen für jede Legierung ausgewählt. Die statistischen Auswertungen

wurden mit SPSS 19,0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) durchgeführt und die Daten (Gasvolumen, Pinvolumen, Oberfläche) als Mittelwerte mit Standardabweichungen dargestellt. Die Unterschiede zwischen den Gruppen wurden mit einer multivarianten ANOVA mit wiederholten Messungen und dem Duncan post hoc Test analysiert. Die statistische Signifikanz wurde bei p-Werten < 0,05 festgelegt.

### **3. Resultate**

In 21 Ratten wurden 42 Pins implantiert. 1 von 21 Tieren verstarb wegen intraoperativer Komplikationen, 2 Tiere (4 Pins) wurden wegen Pindislokation nicht in die Auswertung miteinbezogen, so dass 18 Tiere verblieben. Aus den verbliebenen Tieren wurden letztendlich pro Legierung 6 Pins ausgewählt, da die anderen Pins entweder monokortikal gelegen waren oder es zu einer Knochenfraktur gekommen war. Beides war für die weitere Auswertung ungeeignet.

Sechs Pins pro Legierung (ZX50, WZ21 und Magox) wurden für die kontinuierlichen  $\mu$ CT – Untersuchungen zu definierten Zeitpunkten über einen Zeitraum von 24 Wochen herangezogen. Die gezeigten Abbildungen sind repräsentative Beispiele für die durchgeführten Untersuchungen.

Die angeführten Daten über WZ21 sind rein deskriptiv zu betrachten. Es werden lediglich ZX50 und Magox statistisch miteinander verglichen. Dies erwies sich als sinnvoll, da WZ21 zu langsam degradierte um direkt mit den beiden anderen Legierungen verglichen werden zu können.

#### **3.1 Degradationsverlauf**

Die Volums – und Oberflächenänderungen der Implantate, sowie die Gas – Produktion aller 3 Legierungen konnte mittels  $\mu$ CT – Analyse über die gesamte Studienzeit von 24 Wochen dargestellt werden (siehe Abbildungen 13 a-n; 14 a-

n;15 a-n). Es zeigten sich unterschiedliche Degradationsraten zwischen allen drei Legierungen.

### 3.1.1 ZX50

Pins mit der ZX50 – Legierung begannen sofort nach der Implantation zu korrodieren. Es bildeten sich Gruben und Vertiefungen in der Oberfläche innerhalb der ersten Woche. (siehe Abbildungen 12b;12d;12f;12h ). Gleichzeitig kam es innerhalb der ersten drei Wochen zu einer degradationsbedingten Vergrößerung der Pinoberfläche (siehe Abbildung 7), was wiederum zu einer stärkeren Korrosion führte. Ab der vierten. Woche begann der Abbau der Implantatoberfläche womit auch eine Reduktion des Pinvolumens vergesellschaftet war. Die durchschnittliche Abbaurate des Pinvolumens betrug 1,1% pro Tag, wobei 50% der durchschnittlichen Degradation nach 6.5 Wochen erreicht wurden. Simultan zum Abbau des Pinvolumens bzw. der Pinoberfläche kam es innerhalb kurzer Zeit zur Bildung von intra- und extramedullärem Gas (siehe Abbildungen 13 a-f).

Aus der elektrochemischen Reaktion  $Mg + 2H_2O \rightarrow Mg(OH)_2 + H_2$  (1) ist ersichtlich, dass ein Molekül Gas aus einem Atom Magnesium(Mg) entsteht. Das sind  $920 \text{ mm}^3 \text{ H}_2$  pro Degradation von 1mg Mg (64). Innerhalb der ersten 12 Wochen wurden im Durchschnitt  $270 \text{ mm}^3 \text{ H}_2$  pro Tag bei der Degradation eines ZX50 – Pins frei. Da der Pin nach vier Monaten bereits vollständig degradiert war, wurden keine Gasblasen oder Pinbestandteile mehr mit dem  $\mu\text{CT}$  detektiert (siehe Abbildung 13m).

### 3.1.2 Magox:

Ähnlich dem ZX 50 sah der Verlauf der Pin – Degradation bei der „Magox“– Legierung aus. Unmittelbar postoperativ gab es keinen signifikanten Unterschied im Pinvolumen zwischen ZX50 und Magox ( $p=0,054$ ). Verglichen mit ZX50 begann der Magox Pin mit einer Woche Verzögerung zu ZX50 zu

korrodieren(siehe Abbildung 6). Ab Woche zwei gab es keinen signifikanten Unterschied beim Volumsverlust zwischen ZX50 und Magox ( $p = 0,08$ ). Es kam ebenso innerhalb der ersten drei Wochen zu einer degradationsbedingten Vergrößerung der Pinoberfläche und zu einer stärkeren Korrosion, wobei es hier einen signifikanten Unterschied von ZX50 zu Magox beim Pinabbau gab ( $p=0,008$ ).

Ab der vierten Woche reduzierte sich die Implantatoberfläche, wobei hier kein signifikanter Unterschied zwischen ZX50 und Magox mehr nachweisbar war (siehe Abbildung 7). Der Abbau der beiden Legierungen erfolgte bis zum Ende des Untersuchungszeitraums in ähnlicher Weise. Die durchschnittliche Abbaurate der Implantatoberfläche bei Magox betrug 1,8% pro Tag. 50% der durchschnittlichen Degradation wurden bereits nach vier Wochen erreicht.

Übereinstimmend mit den Degradationsverläufen der beiden Legierungen zeigten auch die Oberflächenveränderungen eine Signifikanz von ZX50 zu Magox in den ersten vier Wochen. (Woche 1 (O 1w):  $p = 0,014$ ; Woche zwei (= O 2w):  $p = 0,008$ ; Woche drei (O 3w):  $p = 0,009$ ; Woche 4 (O 4w):  $p = 0,002$ )

Ebenso kam es bei der „Magox“ – Legierung zu einer Gasbildung von durchschnittlich  $270 \text{ mm}^3$  pro Tag innerhalb der ersten 12 Wochen. Auch hier zeigten sich signifikante Werte zwischen den beiden Legierungen innerhalb der ersten vier Wochen. ZX50 zu Magox: (Woche eins (GV 1w):  $p=0,012$ ; Woche zwei (GV 2w):  $p=0,007$ ; Woche drei (GV 3w):  $p=0,004$ , Woche vier (GV 4w):  $p= 0,002$ ). Im Gegensatz zur ZX50 – Legierung stieg die Gasbildung bis zur dritten Woche stark an und fiel dann wieder ab (siehe Abbildung 8). Nach vier Monaten wurden keine Gasblasen oder Pinbestandteile mehr mit dem  $\mu\text{CT}$  detektiert (siehe Abbildung 14m).

### **3.1.3 WZ21**

Bei Pins mit einer WZ21 – Legierung kam es, im Vergleich zu Magox oder ZX 50, innerhalb der ersten Wochen und Monaten zu einer moderaten Degradierung. 2,3% des ursprünglichen Pin – Volumens degradierte innerhalb der

ersten zwei Monate (siehe Abbildung 9). Eine kleine und kurzfristige Zunahme des Pinvolumens wurde innerhalb der vierten Woche festgestellt. Die Degradierung ging mit 0,5% pro Tag merklich langsamer als bei den anderen beiden Legierungen vor sich.

Bei WZ21 – Implantaten ist erwähnenswert, dass das umgebende Gewebe einen entscheidenden Einfluss auf das Degradationsverhalten hat. Pin – Bestandteile, welche in Weichteil - Gewebe gelagert waren, degradierten am schnellsten. Danach folgten um die 16. Woche herum die intramedullären Pin – Anteile. Kortikal gelegene Pin–Bestandteile begannen erst nach der 24. Woche zu degradieren. 50% des Pinvolumens degradierten von Woche acht bis Woche 21.5 mehr oder weniger linear, wobei  $130 \text{ mm}^3 \text{ H}_2$  pro Tag gebildet wurden.

Das Gasvolumen über den gesamten Zeitraum der Beobachtung war eher moderat und betrug im Durchschnitt in etwa  $7 \text{ mm}^3$ . Daraus kann geschlossen werden, dass das umliegende Gewebe in der Lage war, in etwa  $130 \text{ mm}^3 \text{ H}_2$  pro Tag abzubauen (siehe Abbildung 11).

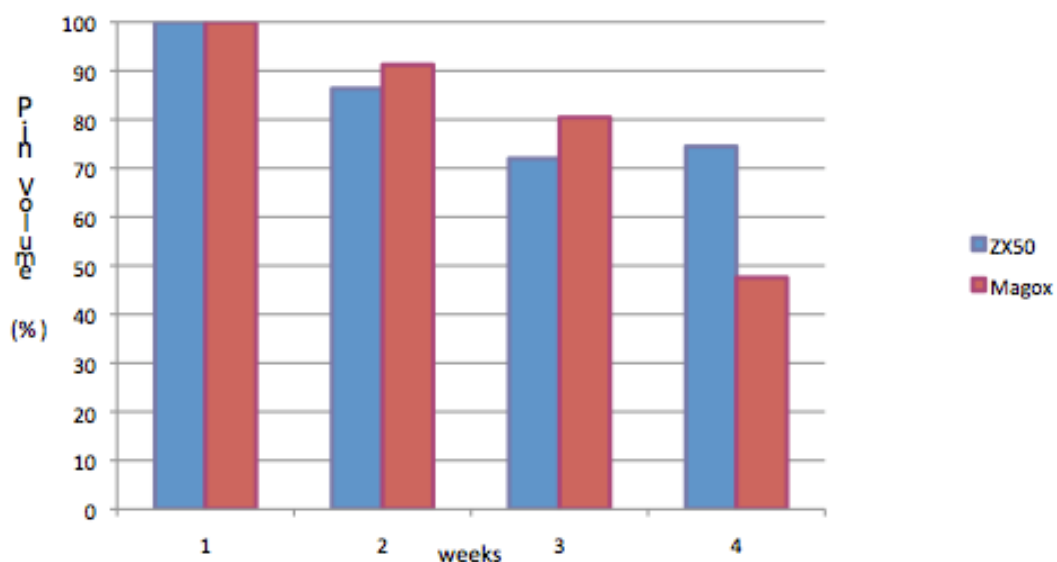


ABBILDUNG 4: PINVOLUMEN IN PROZENT VON ZX50 UND MAGOX, 1. – 4. WOCHE; Der Abbau des Pinvolumens von ZX50 und Magox in den ersten vier

Wochen, wobei der Abbau von Magox mit einer Woche Verzögerung im Vergleich zu ZX50 von statten ging.

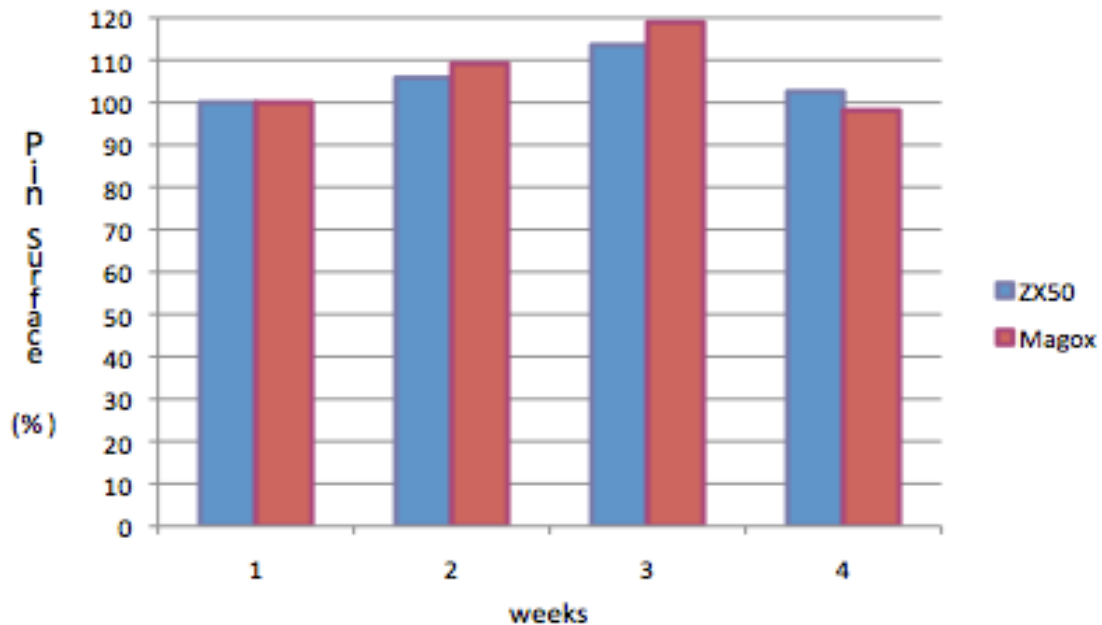


ABBILDUNG 5: PINOBERFLÄCHE IN PROZENT VON ZX50 UND MAGOX, 1. – 4. WOCHE; Hier zeigte sich ein Anstieg der Pinoberfläche bis zur dritten Woche, durch eine Anlagerung von Korrosionsprodukten. Ab Woche vier begann der Abbau der beiden Legierungen in nahezu gleichem Maße.

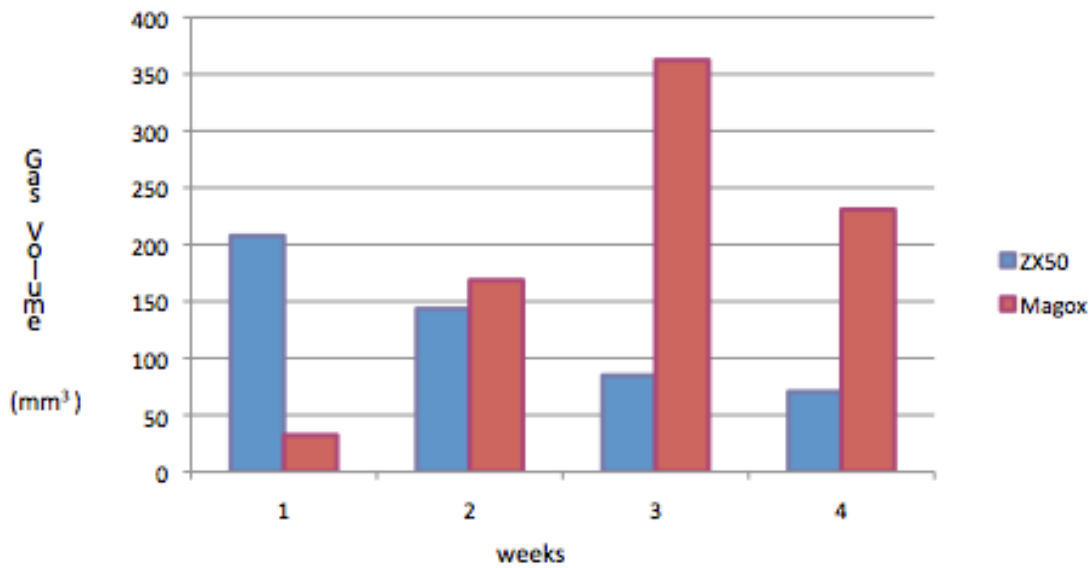


ABBILDUNG 6: GASVOLUMEN ABSOLUT VON ZX50 UND MAGOX, 1. – 4. WOCHE; Trotz initialer Verzögerung im Abbau von Magox und geringer Gasfreisetzung kam es ab der dritten Woche zu einem rasanten Abbau mit massiver Gasfreisetzung.

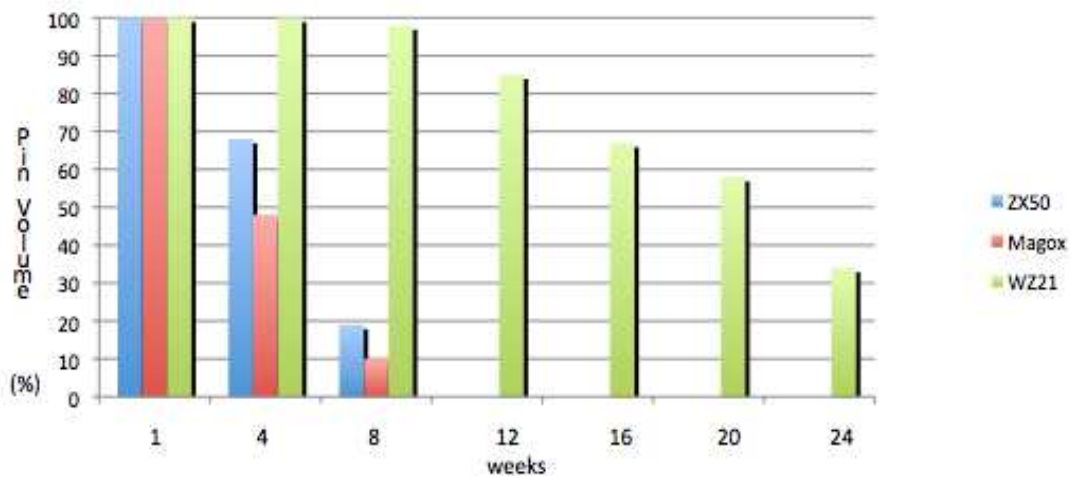


ABBILDUNG 7: PINVOLUMEN IN PROZENT VON ZX50, MAGOX UND WZ21, 1. – 24. WOCHE; Der Abbau von ZX50 und Magox dauerte bis zur zwölften Woche. Bei der WZ21 – Legierung degradierten 50% des Pinvolumens von Woche acht bis 21,5.

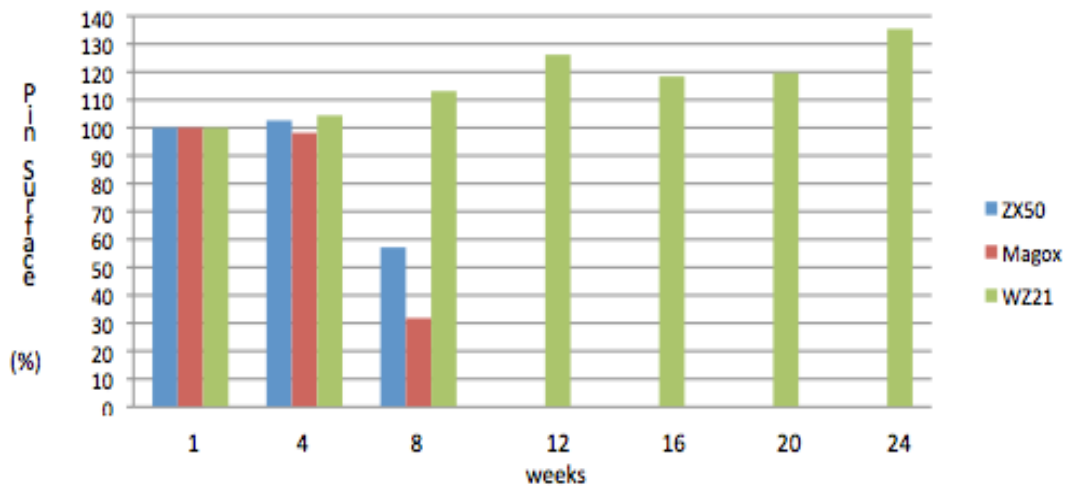


ABBILDUNG 8: PINOBERFLÄCHE IN PROZENT VON ZX50, MAGOX UND WZ21, 1. – 24. WOCHE; Die ZX50 - und die Magox – Legierung zeigten bis zur dritten Woche einen Anstieg der Pinoberfläche und danach begann der Abbau der beiden Legierungen in nahezu gleichem Maße bis zur zwölften Woche. WZ21 zeigte über den Untersuchungszeitraum von 24 Wochen einen Zuwachs der Pinoberfläche.

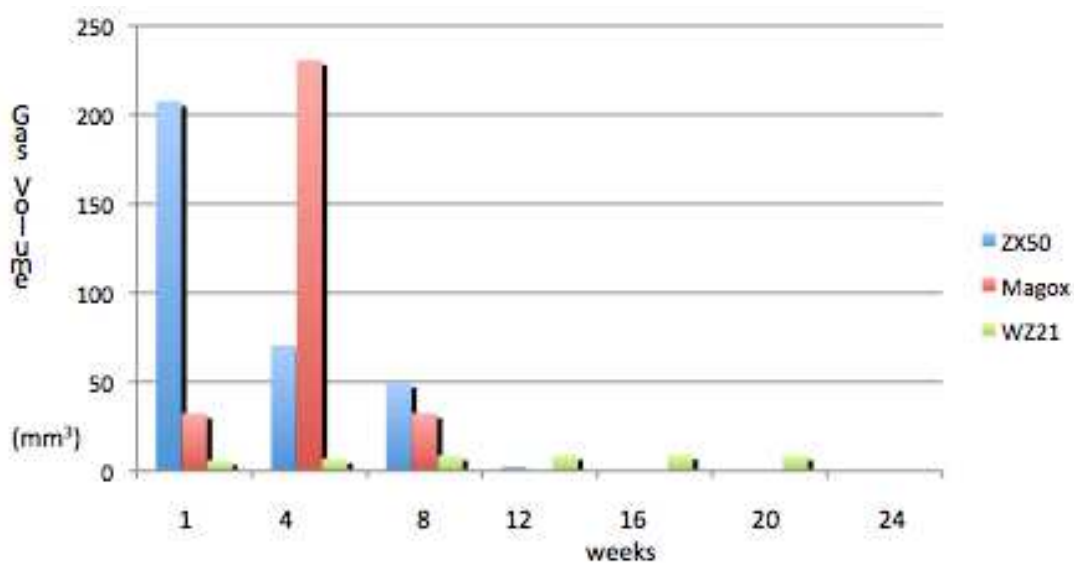


ABBILDUNG 9: GASVOLUMEN ABSOLUT VON ZX50, MAGOX UND WZ21, 1. – 24. WOCHE; ZX50 zeigte einen Abbau des Gasvolumens bis zur Woche zwölf. Das Gasvolumen bei der Magox – Legierung stieg bis zur dritten Woche und baute sich ebenfalls bis Woche zwölf ab. Die Gasbildung bei WZ21 war über den gesamten Untersuchungszeitraum moderat.

## **3.2 Biologische Reaktion des Knochens**

Alle drei Implantattypen wurden von den Ratten gut toleriert. Die postoperativ physiologische Schwellung im OP Gebiet war ab dem dritten postoperativen Tag nicht mehr nachweisbar. Eine Rötung trat nicht auf. Auch kam es postoperativ es zu keiner Wundinfektion. Die biologische Reaktion des Körpers war auf alle drei Implantatarten in den  $\mu$ CT – Rekonstruktionsbildern im gesamten Studienzeitraum von 24 Wochen ersichtlich (siehe Abbildungen 13 a-n;14 a-n;15 a-n).

### **3.2.1 Biologische Reaktion auf ZX 50**

Die biologische Reaktion des Ratten – Knochens auf die eingebrachten ZX50 Implantate war vor allem von der schnellen Magnesiumionen – Freisetzung geprägt. Es kam dadurch zu einer gesteigerten Neu – Formation des Knochens um das Implantat herum, aber auch zu intramedullärer, sowie extraossärer Gasbildung. Dies ist in den  $\mu$ CT – Abbildungen gut ersichtlich (siehe Abbildungen 13 a-n).

Trotz dieser massiven Umbauvorgänge blieben Entzündungsreaktionen makroskopisch aus. Ab der 12. Woche war der Großteil des Pin – Volumens degradiert und es gab daher auch keine Gasbildung mehr. In weiterer Folge kam es zu einer zügigen Resorption der vorhandenen Gasblasen. Die kortikalen Defekte am Knochen verheilten bis zur 16. Woche fast vollständig und die medullären Knochenveränderungen regenerierten nach 24 Wochen zu einem beinahe normalen Zustand (siehe Abbildungen 13i-n).

### **3.2.2 Biologische Reaktion auf Magox**

Die Reaktion des Knochens auf die eingebrachten „Magox“ – Implantate war ebenfalls von der schnellen Freisetzung der Magnesiumionen und einer starken Gasbildung gekennzeichnet. Auch hier kam es zu einem Remodeling des Knochens um das Implantat herum. Bis zur dritten Woche war ausserdem eine zunehmende Gasbildung ersichtlich (siehe Abbildung 8). Das Gas und die Pin – Bestandteile wurden hier bis zur achten Woche abgebaut (siehe Abbildungen 14 a-f).

### **3.2.3 Biologische Reaktion auf WZ21**

Bei WZ21 kam es ebenfalls zu einer gesteigerten Knochenbildung um den Pin herum, insbesondere von Woche vier bis acht. Die im Laufe des Degradationsprozesses produzierte Gasmenge beeinflusste die Knochenregeneration jedoch nicht. Die Neubildung der Knochensubstanz fand vor allem im medullären Bereich und im Bereich der medial gelegenen Kortikalis statt.

Ein enger Kontakt des Implantats mit dem neugebildeten Knochen war in den ersten 12 Wochen (siehe Abbildungen 15 a-h) erkennbar. Danach kam es zu einem gleichzeitigen Auftreten von Knochenresorption und Remodeling, wobei die Verbindung zwischen dem Implantat und der Kortikalis eng blieb und es hier kaum zu Korrosionserscheinungen kam (siehe Abbildungen 15 a-n).

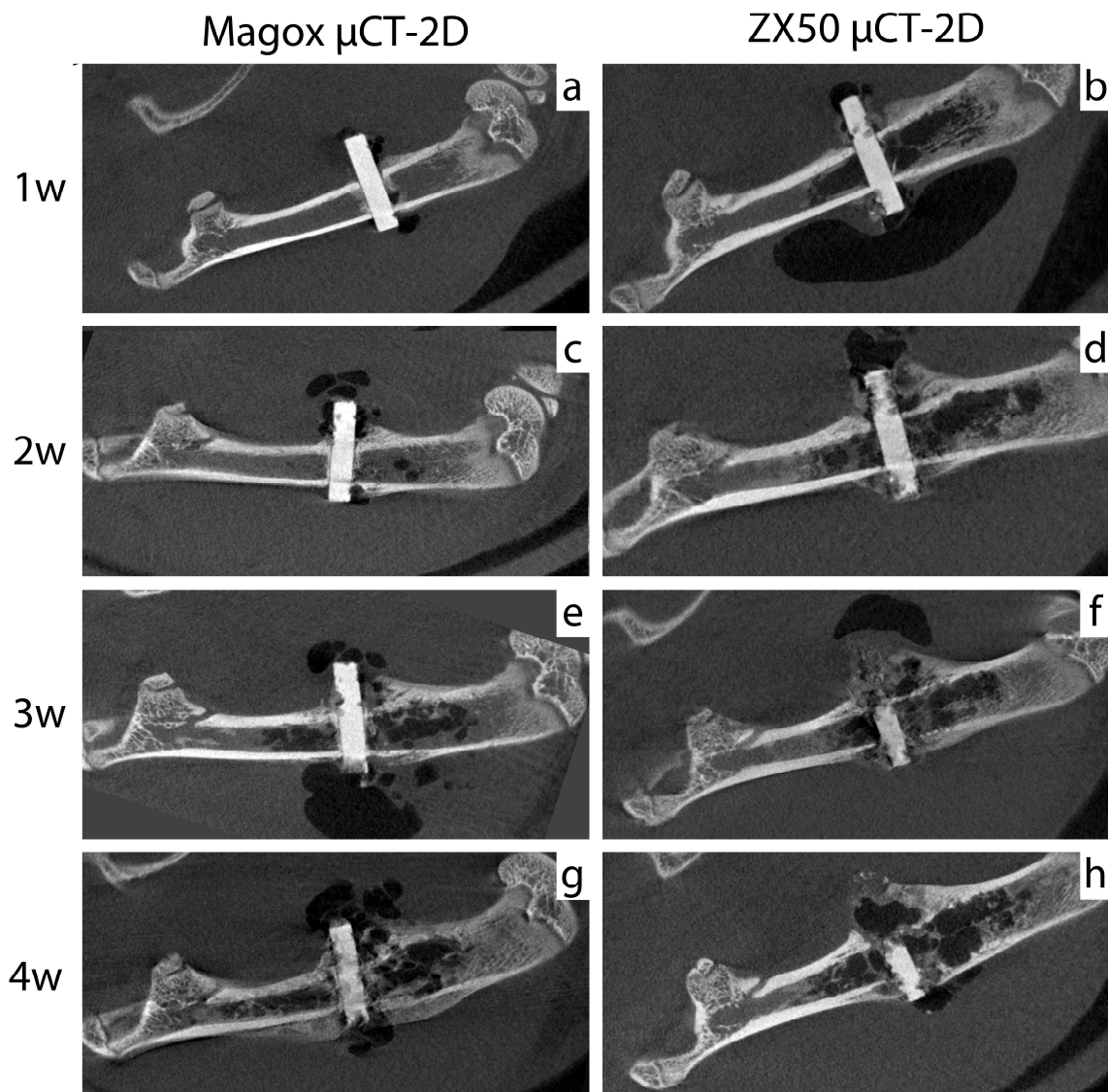


ABBILDUNG 10:  $\mu$ CT – REKONSTRUKTION DES DEGRADATIONSVERLAUFS SOWIE DER KNOCHENREAKTION VON ZX50 UND MAGOX IN 2D. a,b: 1.WOCHE; c,d: 2. WOCHE; e,f: 3.WOCHE; g,h: 4.WOCHE.

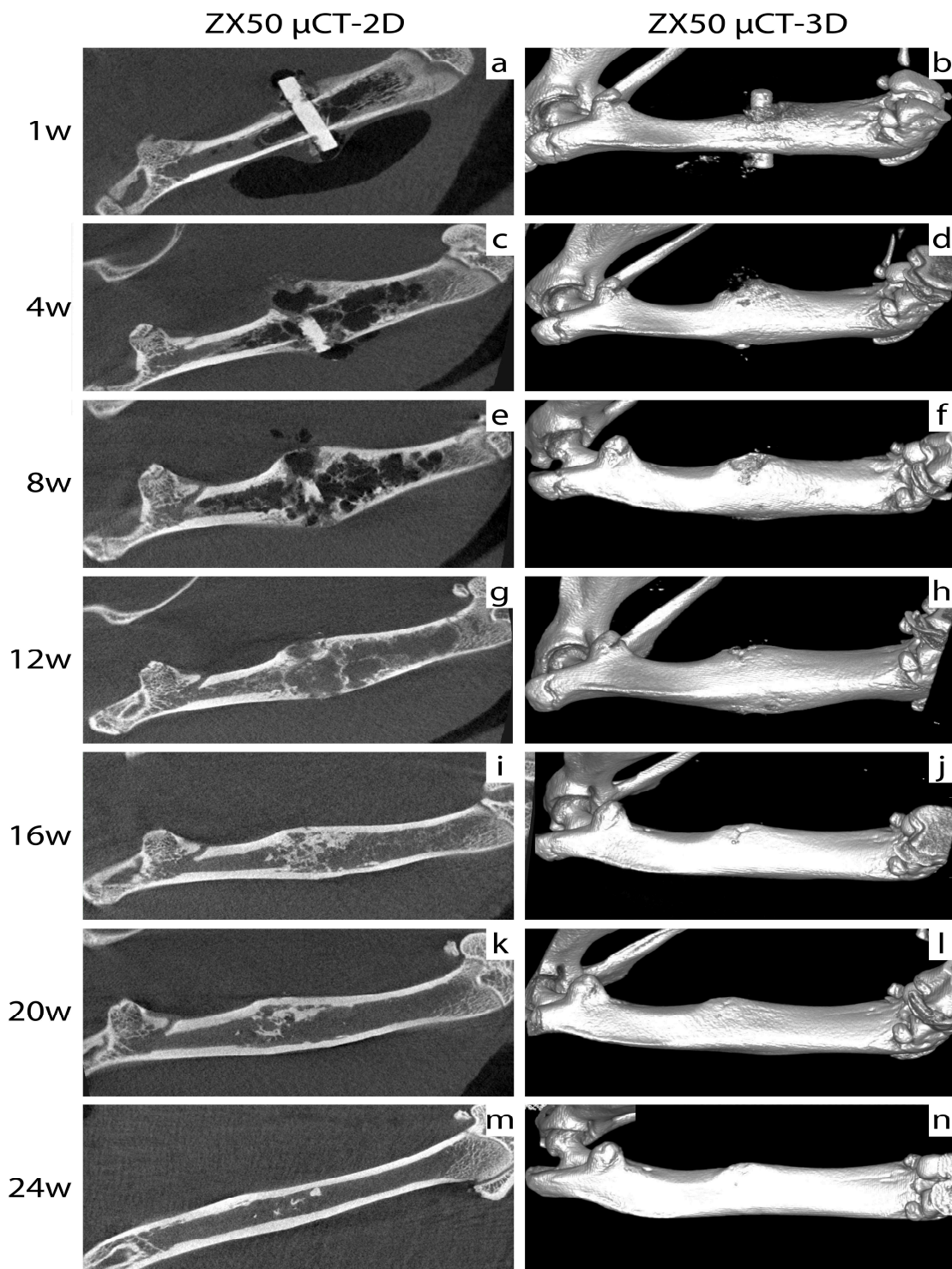


ABBILDUNG 11:  $\mu$ CT – REKONSTRUKTION DES DEGRADATIONSVERLAUFS SOWIE DER KNOCHENREAKTION VON ZX50 IN 2D(LINKS) UND 3D(RECHTS). a,b: 1.WOCHE; c,d: 4. WOCHE; e,f: 8.WOCHE; g,h: 12.WOCHE; i,j: 16.WOCHE; k,l: 20.WOCHE; m,n: 24.WOCHE.

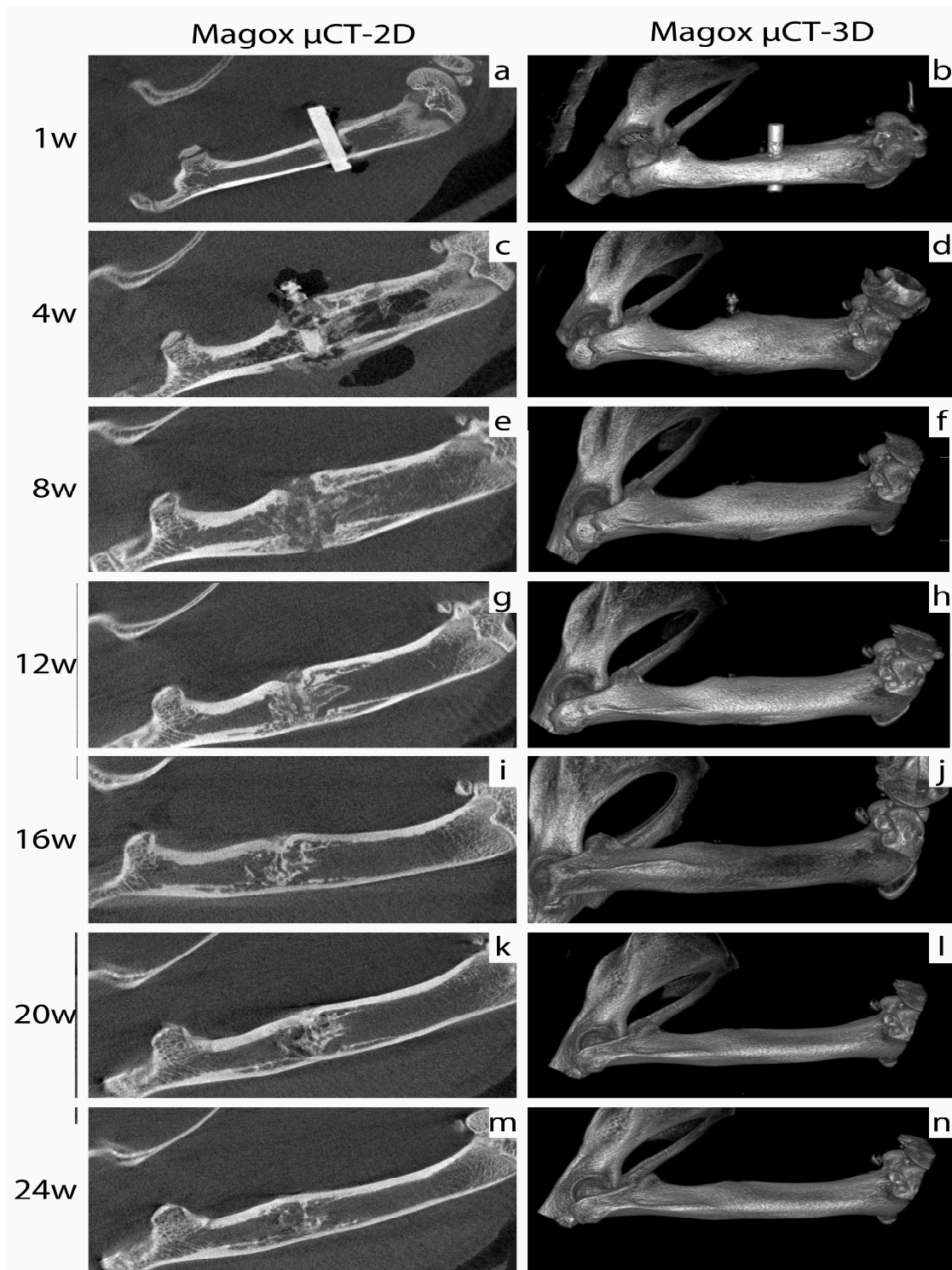


ABBILDUNG 12:  $\mu$ CT – REKONSTRUKTION DES DEGRADATIONSVERLAUFS SOWIE DER KNOCHENREAKTION VON MAGOX IN 2D(LINKS) UND 3D(RECHTS). a,b: 1.WOCHE; c,d: 4. WOCHE; e,f: 8.WOCHE; g,h: 12.WOCHE; i,j: 16.WOCHE; k,l: 20.WOCHE; m,n: 24.WOCHE.

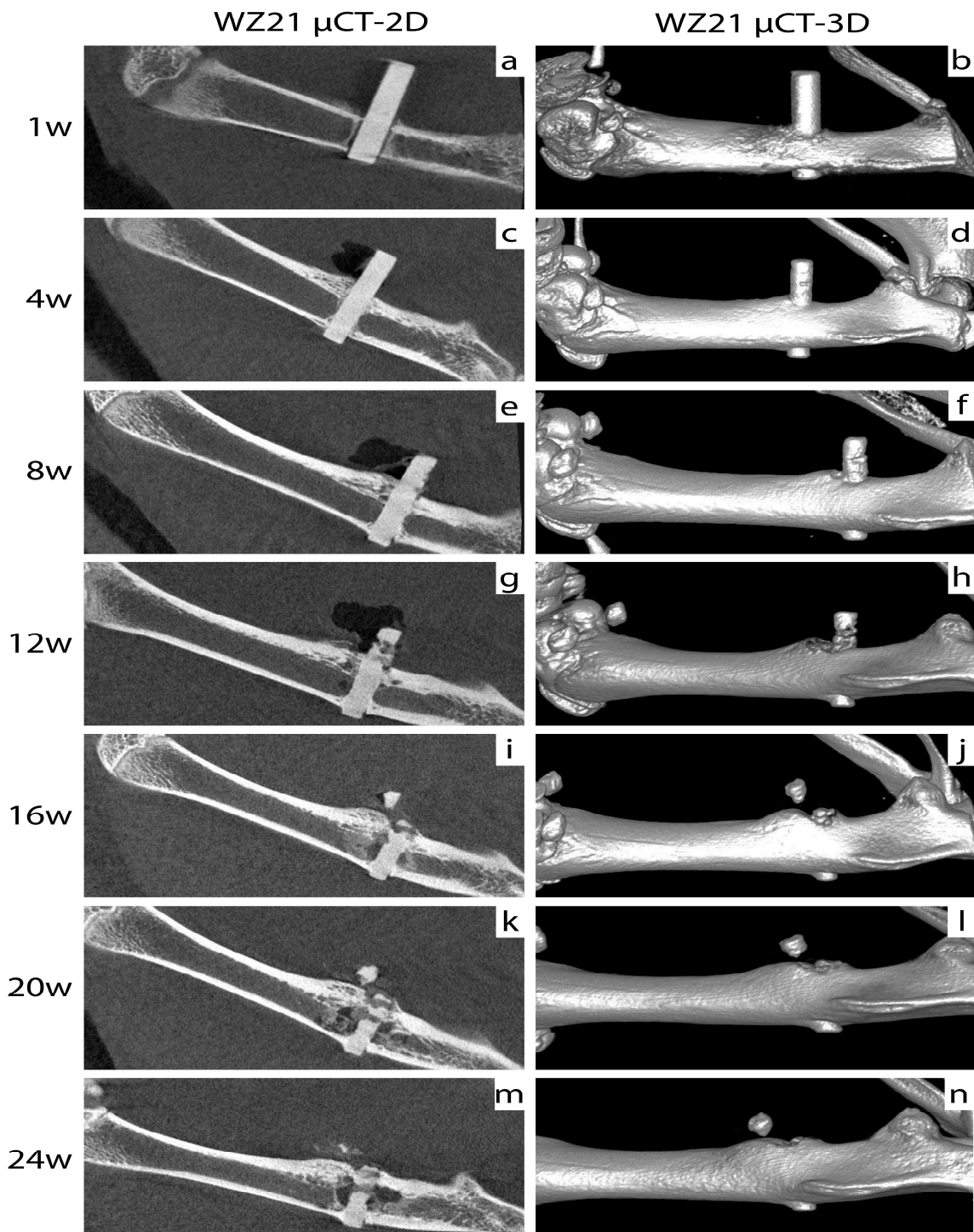


ABBILDUNG 13:  $\mu$ CT – REKONSTRUKTION DES DEGRADATIONSVERLAUFS SOWIE DER KNOCHENREAKTION VON WZ21 IN 2D(LINKS) UND 3D(RECHTS). a,b: 1.WOCHE; c,d: 4. WOCHE; e,f: 8.WOCHE; g,h: 12.WOCHE; i,j: 16.WOCHE; k,l: 20.WOCHE; m,n: 24.WOCHE.

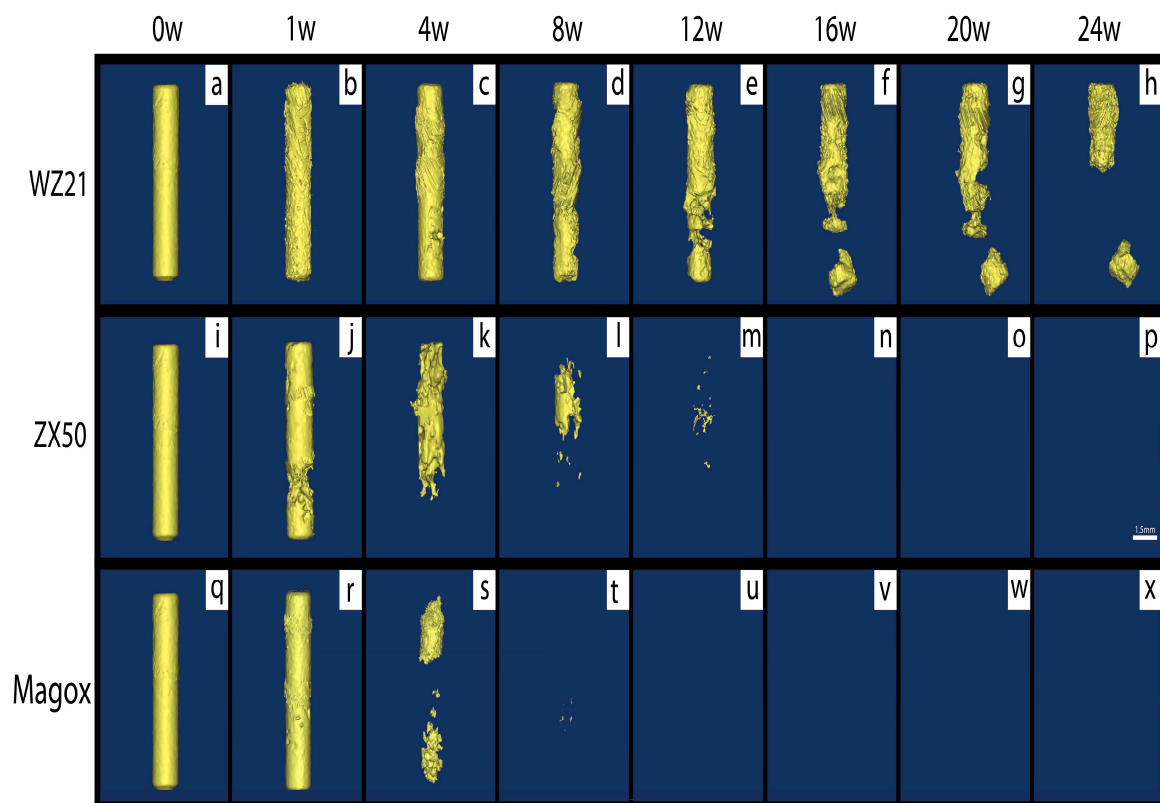


ABBILDUNG 14: DEGRADATIONSVERLAUF VON ZX50, MAGOX UND WZ21 IN MIMICS. a,i,q: BASISIMPLANTAT; b,j,r: 1.WOCHE; c,k,s: 4.WOCHE; d,l,t: 8.WOCHE; e,m,u: 12.WOCHE; f,n,v: 16.WOCHE; g,o,w: 20.WOCHE; h,p,x: 24.WOCHE.

## 4. Diskussion

Die Inzidenz kindlicher Frakturen liegt bei 21-25 Brüchen pro 1000 Kinder; 70 % der Frakturen können konservativ behandelt werden, 30 % müssen operiert werden (65). Im Rahmen der operativen Behandlung werden zur Frakturstabilisierung heutzutage vornehmlich Stahl und Titan („konventionelle Materialien“) verwendet. Nach der Frakturheilung müssen diese Osteosynthesematerialien entfernt werden, wofür ein neuer operativer Eingriff erforderlich ist.

Bioresorbierbare Materialien gelten als attraktive Alternative, da es durch sie möglich ist, operative Eingriffe einzusparen. Dies ist besonders in der Kindertraumatologie und Kinderorthopädie von Vorteil, da eine zusätzliche Operation mit einer zusätzlichen Narkose verhindert werden kann und insgesamt ein weiterer Krankenhausaufenthalt vermieden werden kann. Obwohl die Metallentfernung elektiv planbar ist, werden Familie und Umfeld durch den neuerlichen Krankenhausaufenthalt des Kindes erheblich beeinträchtigt: Vater und/oder Mutter müssen Urlaub nehmen, andere Kinder untergebracht werden – es kommt ausserdem zu erheblichen volkswirtschaftlichen Kosten, die mit einem sich selbstauflösenden Implantat eingespart werden könnten.

Weiterhin kann ein Ziel in der kindgerechten Forderung nach effizienter Behandlung - bestmögliches Ergebnis (frühzeitige Mobilität ohne Bewegungseinschränkung mit möglichst geringen postoperativen Wachstumsstörungen, Bewegungseinschränkungen Instabilitäten) mit geringst möglichem Aufwand (an Röntgendiagnostik, Narkosen, operativen Eingriffen und stationärer Behandlungszeit) durch bioresorbierbare Materialien erreicht werden.

Der Einsatz von bioresorbierbaren Materialien ermöglicht weiterhin die Vermeidung von Spätfolgen durch im Körper belassene Metallimplantate, wie Ermüdungsbrüche, Spätinfektionen etc.(66).

Als vielversprechende Kandidaten der bioresorbierbaren Metalle gelten vor allem Magnesiumlegierungen, welche aufgrund ihrer mechanischen,

elektrochemischen und biologischen Eigenschaften stark in den Interessensfokus rücken (1).

In dieser Studie wurde die in vivo Korrosion, sowie die Gasbildung als auch die hervorgerufene Knochenveränderung von drei verschiedenen Magnesiumlegierungen( Magox, ZX50, WZ21) über Micro CT-Verlaufskontrolle untersucht und die Daten mittels Mimics ® – Bildverarbeitungssoftware ausgewertet. Es gab Unterschiede im Degradationsverhalten, der Gasbildung, sowie der Knochenreaktion.

### **Degradation**

Es zeigte sich, dass bei der Magox – Legierung die Degradation in den ersten vier Wochen verzögert verlief, es danach aber innerhalb von weiteren acht Wochen zu einem vollständigen Abbau des Pins kam. Somit war die Korrosionsbeständigkeit der Legierung vorhanden, aber von den Zeitparametern her nicht ideal. Die Magox – Legierung wird in dieser Form keinen Einsatz im klinischen Alltag finden, da eine Verzögerung von acht bis zwölf Wochen forciert wird.

Der Degradationsverlauf der Magox – Implantate zeigte sich ähnlich inhomogen wie der Degradationsverlauf von ZX 50. Die Korrosion begann jedoch mit einer Verzögerung von rund einer Woche im Gegensatz zu den ZX50 – Implantaten. Da die Zusammensetzung von ZX 50 und Magox ident war, die Magox Pins zusätzlich aber oberflächenbehandelt waren, kann die Oberflächenbehandlung für die Degradationverzögerung dienen. Dieser Korrosionsschutz ist bereits in anderen Studien beschrieben worden(35;46).

Der Degradationsprozess bei der ZX50 Legierung beginnt bereits in den ersten Tagen. Sie imitiert jedoch ein „worst case“ Szenario an Degradation und Gasbildung, so dass einige grundlegende Erkenntnisse gewonnen werden können.

Die Degradation von ZX50 beginnt mit oberflächlichen Korrosionen, hauptsächlich an den Pinenden. Dies ist auf die größere Kontaktfläche mit Blutbestandteilen in diesem Bereich zurückzuführen. Danach verlagert sich der Abbau aber auf die intramedullär gelegenen Pinbestandteile, da der Markraum stärker durchblutet wird als die Corticalis. In gut durchblutetem Gewebe kommt es also zu einer schnelleren Korrosion, wie es schon Zhang et al. gezeigt hatten (22). Verantwortlich gemacht dafür werden der gesteigerte Austausch von Körperflüssigkeiten, da der Austausch die Sättigung mit Magnesium – Ionen und den lokalen pH – Wert gering hält. Der Korrosionsverlauf der ZX50 – Implantate ist also nicht homogen. Der vollständige Degradationsprozess dauerte bis zur 12. Woche (siehe Abbildungen 16 i-p).

Bei WZ21 wurde versucht, durch beifügen verschiedenster Metalle eine möglichst korrosionsbeständige, aber gleichzeitig bioresorbierbare Legierung zu schaffen (33;34). Zu WZ21 wurde Yttrium hinzugefügt, das die Polarisationsresistenz erhöht und so zu einer Verminderung von spontan auftretenden Korrosionen führt (33).

Die WZ21 – Implantate behielten ihre Integrität für vier Wochen, was weiterhin auch auf die Schicht von Korrosionsprodukten zurückzuführen ist, die sich an der Implantat – Oberfläche angelagert hatte. Von solchen Schichten ist bekannt, dass sie einen zusätzlichen Schutz gegen die Degradation bieten (7).

Die kortikal gelegenen Pin – Anteile der WZ21 – Legierung blieben mehr als 36 Wochen unaufgelöst, was auch auf eine mögliche tight junction zwischen dem Implantat und dem Cortex zurückzuführen ist (5;33). Die WZ21 – Legierung kombiniert gute mechanische Eigenschaften und eine passende Degradationsrate(siehe Abbildungen 16 a-h).

### **Gasbildung und Knochenveränderung**

Die Gasproduktion und die Neuformation des Knochens zeigen ebenfalls Unterschiede bei allen drei Legierungen:

ZX50 – Implantate zeigten eine Gasbildung von  $270\text{mm}^3$  pro Tag, wobei davon ca.  $130\text{mm}^3$  pro Tag wieder resorbiert wurden und die vollständige Resorption nach 12 Wochen abgeschlossen war (siehe Abbildung 11).

Mg – Zn – Ca Legierungen, wie ZX50 oder „Magox“ tendieren dazu schnell in gepufferten physiologischen Lösungen zu degradieren (5). Dabei werden eine Vielzahl von Mg – Ionen in das umliegende Gewebe abgegeben, woraus Mg – Hydroxid entsteht (28;29;30). Mg – Hydroxid wiederum reagiert mit den im Blut vorhandenen Kalzium - und Phosphationen. Dieses führte zur Bildung von Calciumphosphat rund um die Implantate und in weiterer Folge zu einer Knochenneubildung (7;22;25).

Zur selben Zeit konnte durch die schnelle Korrosion eine massive Gasbildung beobachtet werden. Eine massive Gasbildung kann die Verbindung der Osteozyten mit der Pinoberfläche verhindern, woraus eine verminderte Knochenheilung und auch eine mögliche Dislokation der Frakturrenden entstehen kann (19;20;21).

Nach vier Wochen begann die Knochenneubildung rund um die ZX50 – Implantate. Nachdem der jeweilige Pin vollständig degradiert war, begann sich der Knochen zu remodelieren. Ab der 20. Woche war die Knochenheilung schon zum Großteil abgeschlossen (siehe Abbildungen 13 a-l). Bei allen drei Legierungen kam es zu einer „restitutio ad integrum“.

Wie bei der ZX 50 Legierung betrug die Gasbildung bei den „Magox“ – Implantaten ebenfalls  $270\text{mm}^3$  und es kam auch hier zu einer Resorption des produzierten Wasserstoffgases durch das umliegende Gewebe. Im Gegensatz zu ZX50 nahm die Gasbildung bis zur dritten Woche stark zu und erst anschliessend kam es zur Gas - Resorption. Auch diese Beobachtung könnte auf die Micro – arc – Oxidation zurückzuführen sein. Die Resorption des Gases war bis zur achten Woche hin abgeschlossen (siehe Abbildung 11).

Die Knochenheilung bei „Magox“ – Implantaten verlief identisch wie bei ZX50 – Implantaten (siehe Abbildungen 14 a-n).

Die Gasbildung bei WZ21 – Implantaten dagegen war sehr moderat über den gesamten Zeitraum hinweg.

Die Knochenneubildung wurde bei WZ 21 besonders am medialen Periost beobachtet. Diesem einseitigen Anbau liegt möglicherweise zugrunde, dass der Knochen hier versucht Defekte an der Kortikalis mit einem verstärkten Anbau auszugleichen.

Für einen möglichen klinischen Gebrauch zeigt sie sich somit am meisten geeignet als Osteosynthesematerial (siehe Abbildung 11).

## 5. Conclusio

In dieser Studie wurde der Degradationsprozess von drei verschiedenen Magnesium – Legierungen und die biologische Reaktion des Knochens am Model der wachsenden Ratte in vivo mit dem  $\mu$ CT – Monitoring untersucht und mit der quantitativen Bildverarbeitung Mimics® ausgewertet. Zwei schnell degradierende Magnesium – Legierungen („Magox“, ZX50), mit sehr starker Gasbildung innerhalb von kurzer Zeit und eine langsam degradierende Legierung (WZ21), mit moderater Gasbildung. Zusammenfassend kann gesagt werden:

(i) Die „Magox“ – Legierung zeigte im Gegensatz zu ZX50 eine Verzögerung der Degradation in den ersten vier Wochen, was auf den Prozess der Micro – arc – Oxidation zurückzuführen ist.

(ii) WZ21 – Implantate behielten ihre Integrität für 4 Wochen und korrodierten im Mittel mit ca. 0,5% Volumenverlust pro Tag bei moderater Gasbildung; ZX50 – Implantate begannen sofort zu degradieren mit 1,2% Volumenverlust im Schnitt pro Tag bei starker Gasbildung innerhalb der ersten Wochen; „Magox“ – Implantate hatten einen durchschnittlichen Volumenverlust von 1,8% pro Tag zu verzeichnen mit ebenfalls starker Gasbildung.

(iii) Die limitierenden Faktoren von ZX50 und „Magox“ für den Einsatz als osteosynthetisches Material sind die geringe Korrosionsresistenz und die hohe

Wasserstoffgasbildungsrate von beiden Legierungen. Die WZ21 – Legierung zeigte jedoch geeignete Korrosionseigenschaften und eine moderate Gasbildung und ist wohl das vielversprechendste Material für den Einsatz als osteosynthetisches Material.

(iv) Die Knochenregeneration erfolgte bei allen drei Legierungen „restitutio ad integrum“, trotz der massiven Gasbildung bei „Magox“ und ZX50.

(v) Das  $\mu$ CT – Monitoring ist eine gute Methode, um das Degradationsverhalten von Implantaten und die biologische Reaktion des Knochens in vivo zu untersuchen.

# Curriculum Vitae

## 1. PERSÖNLICHE DATEN

Name:	Michael Weitzendorfer
Geburtsdaten:	04.01.1985
Geburtsort:	Voitsberg
Staaatsbürgerschaft	Österreich
Familienstand	ledig
Adresse:	Muggauberg 121 8152 Stallhofen
Telefon	0664/1057504
Email:	<u><a href="mailto:michael.weitzendorfer@aon.at">michael.weitzendorfer@aon.at</a></u>

## 2. SCHULBILDUNG

09/1991 – 07/1995	Volksschule Voitsberg
09/1995 – 07/2003	Bundesrealgymnasium Köflach
01/2004 – 09/2004	Grundwehrdienst

## 3. AKADEMISCHE AUSBILDUNG

seit 10/2004 Medizinische Universität Graz: Humanmedizin  
Ende des 3. Abschnitts: 11/2010

## 4. FAMULATUREN

08/2006	Allgemeinchirurgie LKH Voitsberg
07/2008	Innere Medizin LKH Voitsberg
09/2008	Plastische Chirurgie Universitätsklinikum Graz
08/2009	Allgemeinchirurgie Krankenhaus der Barmherzigen Brüder Graz

## 5. KLINISCH – PRAKTISCHES JAHR

03/2010 – 04/2010	Allgemeinmedizin Dr. Alf – Torbjörn Matschiner, Bad Gleichenberg
04/2010 – 07/2010	Allgemeinchirurgie LKH Voitsberg
08/2010 – 09/2010	Hepatologie und Gastroenterologie Charité Universitätsklinikum Berlin
10/2010 – 11/2010	Kinderchirurgie Universitätsklinikum Graz

## Literaturverzeichnis

- (1) Staiger MP, Pietak AM, Huadmai J, Dias G. Magnesium and its alloys as orthopedic biomaterials: a review. *Biomaterials* 2006;27:1728-34.
- (2) Claes L. Mechanical Characterization of Biodegradable Implants. *Clinical Materials* 1992;10:41-6.
- (3) Witte F, Hort N, Vogt C, Cohen S, Kainer KU, Willumeit R, et al Degradable biomaterials based on magnesium corrosion. *Curr Opin Solid State Mater Sci* 2008;12:63-72
- (4) Krause A, von der Höh N, Bormann D, Krause C, Bach F-W, Windhagen H, et al. Degradation behaviour and mechanical properties of magnesium implants in rabbit tibiae. *J Mater Sci Mater Med* 2010;45:624-32.
- (5) Hanzi AC, Gerber I, Schinhammer M, Löffler JF, Uggowitzer PJ. On the in vitro and in vivo degradation performance and biological response of new biodegradable Mg-Y-Zn alloys. *Acta Biomater* 2010;6:1824-33.
- (6) Huan ZG, Leeflang MA, Zhou J, Fratila-Apachitei LE, Duszczyk J. In vitro degradation behavior and cytocompatibility of Mg-Zn-Zr alloys. *J Mater Sci Mater Med* 2010;21:2623-35.
- (7) Witte F, Kaese V, Haferkamp H, Switzer E, Meyer-Lindenberg A, Wirth CJ, et al. In vivo corrosion of four magnesium alloys and the associated bone response. *Biomaterials* 2005;26:3557-63.
- (8) Castellani C, Lindtner RA, Hausbrandt P, Tschegg E, Stanzl-Tschegg SE, Zanoni G, et al. Bone-implant interface strength and osseointegration: Biodegradable magnesium alloy versus standard titanium control. *Acta Biomater* 2011;7:432-40.
- (9) Erbel R, Di Mario C, Bartunek J, Bonnier J, de Bruyne B, Eberli FR, et al. Temporary scaffolding of coronary arteries with bioabsorbable magnesium stents: a prospective, non-randomised multicentre trial. *Lancet* 2007;369:1869–75.

- (10) Heublein B, Rohde R, Kaese V, Niemeyer M, Hartung W, Haverich A. Biocorrosion of magnesium alloys: a new principle in cardiovascular implant technology? *Heart* 2003;89:651–6.
- (11) Hartwig A. Role of magnesium in genomic stability. *Mutat Res* 2001 Apr 18;475(1- 2):113-21.
- (12) Dr. Burgerstein L. *Burgersteins Handbuch Nährstoffe*. 10.Auflage. Haug Verlag; 2002;127.
- (13) Liu CC, Yeh JK, Aloia JF. Magnesium directly stimulates osteoblast proliferation. *J Bone Miner Res* 1988;3:104.
- (14) Zreiqat H, Howlett CR, Zannettino A, Evans P, Schulze-Tanzil G, Knabe C, et al. Mechanisms of magnesium-stimulated adhesion of osteoblastic cells to commonly used orthopaedic implants. *J Biomed Mater Res* 2002 Nov;62(2):175-84.
- (15) Tucker KL, Hannan MT, Chen H, Cupples LA, Wilson PW, Kiel DP. Potassium, magnesium, and fruit and vegetable intakes are associated with greater bone mineral density in elderly men and women. *Am J Clin Nutr*. 1999;69(4):727-36.
- (16) New SA, Bolton-Smith C, Grubb DA, Reid DM. Nutritional influences on bone mineral density: a cross-sectional study in premenopausal women. *Am J Clin Nutr*. 1997;65(6):1831-9.
- (17) Stendig-Lindberg G, Tepper R, Leichter I. Trabecular bone density in a two year controlled trial of peroral magnesium in osteoporosis. *Magnes Res*. 1993;6(2):155-63.
- (18) Dimai HP, Porta S, Wirnsberger G, Lindschinger M, Pamperl I, Dobnig H, Wilders- Truschnig M, Lau KH. Daily oral magnesium supplementation suppresses bone turnover in young adult males. *J Clin Endocrinol Metab*. 1998;83(8):2742-8.
- (19) Lambotte A. L'utilisation du magnésium comme matériel perdu dans l'osteosynthese. *Bull Mem Soc Nat Chir* 1932;28:1325-34.
- (20) McBride ED. Absorbable metal in bone surgery. *J Am Med Assoc* 1938;111:2464-7.
- (21) Znamenskii MS. Metallic osteosynthesis by means of an apparatus made of resorbing metal. *Khirurgiia* 1945;12:60-3.

- (22) Zhang E, Xu L, Yu G, Pan F, Yang K. In vivo evaluation of biodegradable magnesium alloy bone implant in the first 6 months implantation. *J Biomed Mater Res A*. 2009;90(3):882-93.
- (23) Bostman O, Pihlajamäki H. Clinical biocompatibility of biodegradable orthopaedic implants for internal fixation: a review. *Biomaterials*. 2000;21(24):2615-21.
- (24) van der Elst M, Patka P, van der Werken C. [Biodegradable implants in fracture fixation: state of the art]. *Unfallchirurg* 2000 Mar;103(3):178-82.
- (25) Xu L, Yu G, Zhang E, Pan F, Yang K. In vivo corrosion behavior of Mg-Mn-Zn alloy for bone implant application. *J Biomed Mater Res A*. 2007;1;83(3):703-11.
- (26) Pourbaix M. Electrochemical corrosion of metallic biomaterials. *Biomaterials*. 1984;5(3):122-34.
- (27) Narayanan R, Seshadri SK, Kwon TY, Kim KH. Calcium phosphate-based coatings on titanium and its alloys. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2008;85(1):279-99.
- (28) Lin A, Wang CJ, Kelly J, Gubbi P, Nishimura I. The role of titanium implant surface modification with hydroxyapatite nanoparticles in progressive early bone-implant fixation in vivo. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2009;24(5):808-16.
- (29) Gondolph-Zink B. Effect of hydroxyapatite layering on the osteo-integration of weightbearing and non-weightbearing implants. Comparison to other microporous surfaces in animal experiments. *Orthopade*. 1998;27(2):96-104.
- (30) Søballe K, Overgaard S, Hansen ES, Brokstedt-Rasmussen H, Lind M, Bünger C. A review of ceramic coatings for implant fixation. *J Long Term Eff Med Implants*. 1999;9(1- 2):131-51.
- (31) Saris NE, Mervaala E, Karppanen H, Khawaja JA, Lewenstam A. Magnesium. An update on physiological, clinical and analytical aspects. *Clin Chim Acta* 2000 Apr;294(1-2):1-26.
- (32) Gu X, Zheng Y, Cheng Y, Zhong S, Xi T. In vitro corrosion and biocompatibility of binary magnesium alloys. *Biomaterials* 2009 Feb;30(4):484-98.
- (33) Hänzi AC, Sologubenko AS, Uggowitzer PJ. Design strategy for new biodegradable Mg-Y-Zn alloys for medical applications. *Int J Mater Res* 2009;100:1127-36.

- (34) Hänzi AC, Dalla Torre FH, Sologubenko AS. Design strategy for microalloyed ultra- ductile magnesium alloys. *Phil Mag Lett* 2009;89:377-90.
- (35) Grey JE, Luan B. Protective coatings on magnesium and its alloys - a critical review. *J Alloys Compounds* 2002;336:88-113.
- (36) Wong HM, Yeung KMK, Lam KO, Tam V, Chu PK, Luk KDK, et al. A biodegradable polymer-based coating to control the performance of magnesium alloy orthopedic implants. *Biomaterials* 2010;31:2084–96.
- (37) Gu XN, Zheng YF, Lan QX, Cheng Y, Zhang ZX, Xi TF, et al. *Biomed Mater* 2009;4:044109.
- (38) Xu L, Zhang E, Yang K. Phosphating treatment and corrosion properties of Mg– Mn–Zn alloy for biomedical application. *J Mater Sci: Mater Med* 2009;20(4):859–67.
- (39) Wang HX, Guan SK, Wang X, Ren CX, Wang LG. In vitro degradation and mechanical integrity of Mg–Zn–Ca alloy coated with Ca-deficient hydroxyapatite by the pulse electrodeposition process. *Acta Biomater* 2010;6(5):1743–8.
- (40) Pereda MD, Alonso C, Burgos-Asperilla L, del Valle JA, Ruano OA, Perez P, et al. Corrosion inhibition of powder metallurgy Mg by fluoride treatments. *Acta Biomater* 2010;6(5):1772–82.
- (41) Zhang XP, Zhao ZP, Wu FM, Wang YL, Wu J. Corrosion and wear resistance of AZ91D magnesium alloy with and without microarc oxidation coating in Hank’s solution. *J Mater Sci* 2007;42:8523–8.
- (42) Yao Z, Li L, Jiang Z. Adjustment of the ratio of Ca/P in the ceramic coating on Mg alloy by plasma electrolytic oxidation. *Appl Surf Sci* 2009;255:6724–8.
- (43) Yerokhin AL, Nie X, Leyland A, Matthews A, Dowey SJ. Plasma electrolysis for surface engineering. *Surf Coatings Tech* 1999;122:73–93.
- (44) Sul YT, Johansson CB, Petronis S, Krozer A, Jeong Y, Wennerberg A, et al. *Biomaterials* 2002;23:491501.
- (45) Liang J, Hu L, Hao J. Characterization of microarc oxidation coatings formed on AM60B magnesium alloy in silicate and phosphate electrolytes. *Appl Surf Sci* 2007;253:4490–6.
- (46) Guo HF, An MZ. Growth of ceramic coatings on AZ91D magnesium alloys by micro-arc oxidation in aluminate-fluoride solutions and evaluation of corrosion science. *Appl surf Sci* 2005;246:229–38.

- (47) Johner R. Zur Knochenheilung in Abhängigkeit von der Defektgröße, *Helv Chir Acta*. 1972;39:409
- (48) Junqueira L, Carneiro J, Kelley R. *Histologie*. Berlin Heidelberg: Springer Verlag. 2002.
- (49) Schenk RK. Bone Regeneration: Biologic basis. In: Buser D, Dahlin Ch, Schenk R. *Guided Bone Regeneration in Implant Dentistry*. Chicago: Quintessence. 1994;49-100.
- (50) Raisz L. Physiology and pathophysiology of bone remodeling. *Clin. Chem*. 1999;45(8B), 1353-8.
- (51) Hollinger JO. Bone Dynamics: Morphogenesis, Growth, Modeling and Remodeling. In: Liebermann JR, Friedlaender GE. *Bone Regeneration and Repair: Biology and Clinical Applications*. Humana Press. 2005;1-19.
- (52) Geddes A. Animal models of bone disease. In: *Principles of Bone Biology*. Bilezikian J, Raitz L, Rodan G. San Diego: Academic Press. 1996;1343-1354.
- (53) Frost HM. *Intermediary Organization of the Skeleton*. Vol 1. Boca Raton FL: CRC Press. 1986;1-365.
- (54) Hollinger J, Wong ME. The integrated processes of hard tissue regeneration with special emphasis on fracture healing. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 1996;82(6):594-606.
- (55) Wolff J. *Das Gesetz der Transformation der Knochen*. Berlin: Hirschwalk. 1892.
- (56) Pueleo DA, Nanci A. Understanding and controlling the bone-implant-interface, *Biomaterials*. 1999(20):2311-21.
- (57) Frost HM. *Bone Remodeling Dynamics*. Springfield, IL: Charles C Thomas. 1966.
- (58) Brånemark PI, Adell R, Breine U, Hansson BO, Lindström J, Ohlsson A. Intra-osseous anchorage of dental prostheses. I. Experimental studies. *Scand J Plastic Reconstr Surg*. 1969;3(2): 81-100.
- (59) Roberts WE, Bone Tissue Interface. *J Dent Educ*. 1988;52,804-9.
- (60) Osborn JF, Newesley H. Dynamics aspects of the implant-bone interface. In: Heimke G. *Dental Implants-Materials and Systems*. Carl Hanser. 1980;111-23.
- (61) Davies JE. Mechanisms of endosseus Integration. *Int Jour Prosthodont*. 1998;11(5):391- 401.

- (62) Davies JE. Understanding Peri-implant Endosseus Healing. Journal of dental education. 2003;(67):8:932-49.
- (63) Feldkamp LA, Goldstein SA, Parfitt AM, Jesion G, Kleerekoper M. The direct examination of three-dimensional bone architecture in vitro by computed tomography. J Bone Miner Res 1989;4:3-11.
- (64) Kinney JH, Lane NE, Haupt DL. In vivo, three-dimensional microscopy of trabecular bone. J Bone Miner Res 1995;10:264-70.
- (65) Kraus R, Schneidmüller D, Röder C: Häufigkeit von Frakturen der langen Röhrenknochen im Wachstumsalter, Deutsches Ärzteblatt März 2005
- (66) Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Unfallchirurgie zur Implantatentfernung: <http://www.uni-duesseldorf.de/AWMF/II/012-004.htm>  
(10.09.2011)